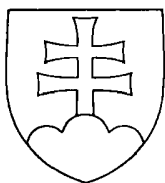


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania: 07.02.97
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 60/011 620
(32) Dátum priority: 14.02.96
(33) Krajina priority: US
(40) Dátum zverejnenia: 11.06.99
(86) Číslo PCT: PCT/US97/02043, 07.02.97

(21) Číslo dokumentu:

1091-98

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁶:

C 07H 21/04

(71) Prihlasovateľ: ISIS PHARMACEUTICALS, INC., Carlsbad, California, US; NOVARTIS AG, Basel, CH;

(72) Pôvodca vynálezu: Cook Phillip D., Lake San Marcos, CA, US;
Monia Brett P., La Costa, CA, US;
Altmann Karl-Heinz, Reinach, CH;
Martin Pierre, Rheinfelden, CH;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Sacharidmi modifikované prerušované oligonukleotidy**

(57) Anotácia:

Opisujú sa oligonukleotidy schopné špecifickej hybridizácie s DNA alebo RNA, ktoré obsahujú lineárnu sekvenciu kovalentne viazaných nukleozidových jednotiek, pričom sekvencia obsahuje prvú nukleozidovú subsekvenciu, ktorá má 2'-O-CH₂-CH₂-O-CH₃ sacharidové časti, a druhú nukleozidovú subsekvenciu, ktorá má 2'-deoxy sacharidové časti; a nukleozidové jednotky prvej a druhej subsekvencie sú kovalentne viazané fosfodiesterovými alebo fosforotioátovými väzbami. V týchto oligonukleolidoch aspoň niektoré nukleozidové jednotky nukleotidov sú určené na to, aby boli odolné proti nukleáze, aspoň niektoré nukleozidové jednotky nukleotidov obsahujú substituent, ktorý podporuje hybridizáciu oligonukleotidu ku komplementárnemu vláknenu nukleovej kyseliny, a aspoň niektoré nukleozidové jednotky nukleotidov obsahujú 2'-deoxy-cryptopentofuranozyl sacharidovú časť.

Sacharidmi modifikované prerušované oligonukleotidy

Oblasť techniky

Predložený vynález sa týka syntézy a použitia oligonukleotidov na vybudenie aktivity RNázy H na štiepenie protilahlého reťazca. Vo vynáleze sú zahrnuté oligonukleotidy, pričom aspoň niektoré nukleozidové jednotky nukleotidov sú určené na to, aby boli odolné voči nukleáze, aspoň niektoré nukleozidové jednotky nukleotidov obsahujú substituent, ktorý podporuje hybridizáciu oligonukleotidu ku komplementárnemu vláknu nukleovej kyseliny, a aspoň niektoré nukleozidové jednotky nukleotidov obsahujú 2'-deoxy-erythro-pentofuranozyl sacharidovú časť. Oligonukleotidy sú použiteľné v terapii, diagnostike a ako reagenty vo výskume.

Doterajší stav techniky

Je známe, že oligonukleotidy hybridizujú s jednovláknovými DNA alebo RNA molekulami. Hybridizácia je sled vodíkových väzieb medzi špecifickými báзовými pármí nukleobáz oligonukleotidov a nukleobáz cieľovej DNA alebo RNA. Takéto páry nukleobáz sa označujú ako navzájom komplementárne.

Pri určovaní rozsahu hybridizácie oligonukleotidu s komplementárnou nukleovou kyselinou môže byť porovnávaná relatívna schopnosť oligonukleotidu viazať sa s komplementárnou nukleovou kyselinou s teplotou topenia zistenou pre určitý hybridizačný komplex. Teplota topenia T_m , charakteristická fyzikálna vlastnosť dvojzávitnice, označuje teplotu (v stupňoch Celzia), pri ktorej sa vytvára 50 % špirály (hybridizovaná) k závit (nehybridizovaný). T_m je meraná použitím UV spektra, za účelom determinácie vytvorenia a rozpadnutia (roztopenia) hybridizačného komplexu. Usporiadavanie báz, ktoré nastáva počas hybridizácie je sprevádzané znížením UV absorpcie (hypochromicita). Takže zníženie UV absorpcie naznačuje vyššiu T_m . Čím vyššia je T_m , tým väčšia je sila väzieb medzi vláknami.

Oligonukleotidy môžu byť použité na ovplyvnenie enzymatického štiepenia cieľovej RNA použitím intracelulárneho enzýmu RNázy H. Verí sa, že mechanizmus takéhoto RNáza H štiepenia vyžaduje, aby sa s cieľovou RNA hybridizoval 2'-deoxyribofuranozylový oligonukleotid. Výsledný DNA-RNA duplex aktivuje RNáza H

enzým a aktivovaný enzým štiepi RNA vlákno. Štiepenie RNA vlákna deštruuje normálnu funkciu RNA. Verí sa, že týmto mechanizmom pracujú fosforotioátové nukleotidy. Avšak na to, aby DNA oligonukleotidy boli použiteľné na bunkovú aktiváciu RNázy H, musia byť tieto výhodne pomerne stabilné voči nukleázam, aby prežili v bunke počas doby postačujúcej na aktiváciu RNázy H. Takáto nukleázová stabilita nemusí byť nevyhnutná pri nebunkových použitíach, napríklad pri použití oligonukleotidov ako reagentov vo výskume.

Niekoľko publikácií popisuje interakciu RNázy H a oligonukleotidov. Hlavne: (1) Dagle et al., *Nucleic Acids Research*, 1990, 18, 4751; (2) Dagle et al., *Antisense Research And Development*, 1991, 1, 11; (3) Eder et al., *J. Biol. Chem.*, 1991, 266, 6472; a (4) Dagle et al., *Nucleic Acids Research*, 1991, 19, 1805. V súlade s týmito publikáciami, DNA oligonukleotidy, ktoré majú tak nemodifikované fosfodiesterové medzinukleozidové väzby, ako aj modifikované fosfortionátové medzinukleozidové väzby sú substrátmi pre štiepenie cieľovej RNA Rnázou H. Avšak autori ďalej poznamenávajú, že v *Xenopus* embryách dochádza tiež k exenukleáznej degradácii tak fosfodiesterových ako aj fosfortionátových väzieb. Takáto nukleázová degradácia je nežiadúca, pretože rýchlo odčerpáva dostupné oligonukleotidy na aktiváciu RNázy H.

Ako je popísané v publikáciách (1), (2) a (4), boli konštruované 2'-deoxy oligonukleotidy majúce krátku sekciu nukleozidov spojených fosfodiesterovou väzbou, ktorá je umiestnená medzi sekciami s fosforamidovou, alkyl fosfátovou alebo fosfortriesterovou väzbou, za účelom stabilizácie oligonukleotidov voči nukleázovej degradácii, pričom aby tieto stále fungovali ako aktivátory RNázy H. Hoci boli fosforamidát obsahujúce oligonukleotidy stabilné voči exonukleázam, v publikácii (4) autori poznamenávajú, že výsledkom každej fosforamidátovej väzby bol pokles o 1,6 °C v meranej hodnote T_m fosforamidát obsahujúcich oligonukleotidov. Takýto pokles hodnoty T_m indikuje pokles hybridizácie medzi oligonukleotidom a jeho cieľovým vláknom.

Iní autori tiež publikovali, že môže dôjsť k takejto strate hybridizácie medzi oligonukleotidom a jeho cieľovým vláknom. Saison-Behmoaras et al. (*EMBO Journal*, 1991, 10, 1111) zistili, že hoci oligonukleotid aj mohol byť substrátom pre RNázu H,

účinnosť štiepenia RNázou H bola nízka kôli slabej hybridizácii s mRNA. Autori tiež poznamenávajú, že začlenenie akridínovej substitúcie na 3' koniec oligonukleotidu ochránilo oligonukleotid voči exonukleázam.

US patent č. 5 013 830 vydaný 07.05.1991 popisuje zmiešané oligoméry obsahujúce RNA oligomér alebo jeho derivát, konjugovaný s DNA oligomérom cez fosfodiesterovú väzbu. RNA oligoméry tiež nesú 2'-O-alkyl substituenty. Avšak, tým, že oligoméry majú fosfodiesterovú väzbu, sú prístupné nukleázovému štiepeniu.

Európska patentová prihláška č. 339 842 podaná 03.04.1989 popisuje 2'-O-substituované fosforotioátové oligonukleotidy, vrátane derivátov 2'-O-metylribooligonukleotid fosforotioátu. Vyššie uvedená prihláška tiež popisuje 2'-O-metyl fosfodiesterové oligonukleotidy, ktoré nie sú rezistentné voči nukleáze.

US patent č. 5 149 797 vydaný 22.09.1992 popisuje zmiešané oligonukleotidy s fosfátovým skeletom, ktoré obsahujú vnútornú časť z deoxynukleotidov spojených fosfodiesterovými väzbami a ohraničenú z každej strany časťami modifikovaných DNA alebo RNA sekvencií. Ohraničujúce sekvencie obsahujú metyl fosfonátové, fosforomorfolidátové, fosforopiperazidátové alebo fosforoamidátové väzby.

US patent č. 5 256 775 vydaný 26.10.1993 popisuje zmiešané oligonukleotidy, ktoré obsahujú fosforamidátové väzby a fosforotioátové alebo fosforoditioátové väzby.

Hoci je známe, že štiepenie cieľového RNA vlákna použitím oligonukleotidu a RNázy H by bolo užitočné, je vo vývoji terapeutických oligonukleotidov veľmi dôležitá odolnosť nukleotidov voči nukleázam a presnosť hybridizácie. V súlade s tým, pretrvávajú už dlho pocitovaná potreba spôsobov a metód, ktoré by mohli aktivovať RNázy H a naproti tomu udržiavať alebo zlepšovať hybridizačné vlastnosti a poskytnúť rezistenciu voči nukleázam. Takéto oligonukleotidy sú tiež žiadané ako reagenty vo výskume a ako diagnostické činidlá.

Podstata vynálezu

V súlade s jedným uskutočnením vynálezu sú poskytnuté oligonukleotidy vytvorené zo sekvencie nukleozidových jednotiek. Oligonukleotidy obsahujú aspoň

jednu nukleozidovú jednotku, ktorá je určená na zvýšenie nukleázovej rezistencie oligonukleotidov. Navyše aspoň niektoré nukleozidové jednotky oligonukleotidov sú so substitučnými skupinami určené na zvýšenie väzobnej afinity oligonukleotidov k cieľovým RNA, a aspoň niektoré nukleozidové jednotky majú 2'-deoxy-erythro-pentofuranozylové sacharidové časti.

Vo výhodných oligonukleotidoch podľa predloženého vynálezu, nukleozidové jednotky, ktoré sú určené na zvýšenie väzobnej afinity, obsahujú 2'-substitučné skupiny. Vo výhodných uskutočneniach 2'-substitučné skupiny zahŕňajú fluoro, C₁-C₂₀ alkoxy, C₁-C₉ aminoalkoxy, vrátane aminopropoxy alkoxy, imidazolyalkoxy a polyetylén glykol. Výhodné alkoxy substituenty zahŕňajú metoxy, etoxy a propoxy. Výhodná aminoalkoxy jednotka je aminopropoxy. Výhodný imidazolyalkoxy substituent je imidazolylpropoxy. Výhodný polyetylén glykol substituent je -O-etyl-O-metyl alebo metoxyetoxi (-O-CH₂-CH₂-O-CH₃).

Oligonukleotidové jednotky podľa predloženého vynálezu obsahujú nukleozidové jednotky spojené nábojovými fosforovými väzbami vybranými zo skupiny pozostávajúcej z fosfodiesterových a fosforotioátových väzieb.

Oligonukleotidy podľa predloženého vynálezu obsahujú množstvo zviazaných nukleozidových jednotiek nesúcich substitučné skupiny, ktoré zvyšujú väzobnú afinitu oligonukleotidov ku komplementárnemu vláknu nukleovej kyseliny. V určitých výhodných uskutočneniach oligonukleotidová sekvencia, ktorá má nukleozidové jednotky, ktoré nesú takéto substituenty, môže byť rozdelená na prvú subsekvenciu a druhú subsekvenciu. Prvá subsekvencia má spojené nukleozidové jednotky nesúce 2'-substituované-erythro-pentofuranozyl sacharidové časti. Druhá subsekvencia má spojené nukleozidové jednotky nesúce 2'-deoxy-erythro-pentofuranozyl sacharidové časti. Výhodne má druhá subsekvencia aspoň tri nukleozidové jednotky a výhodnejšie aspoň päť nukleozidových jednotiek. V ďalších výhodných uskutočneniach existuje tretia subsekvencia nukleozidových jednotiek, ktoré sú vybrané z tých, z ktorých možno vyberať prvú subsekvenciu. Výhodné je, aby druhá subsekvencia bola umiestnená medzi prvou a treťou subsekvenciou. Takéto oligonukleotidy podľa predloženého vynálezu sú tiež označované ako "chiméry" alebo "chimerické" alebo "prerušované" oligonukleotidy.

V ďalších výhodných oligonukleotidoch podľa vynálezu sú nukleozidové jednotky nesúce substituenty, ktoré zvyšujú väzobnú afinitu, umiestnené na jednom alebo na oboch z 3' alebo 5' konci oligonukleotidu. Môže tam byť od jednej do ôsmich nukleozidových jednotiek, ktoré sú substituované substitučnými skupinami. Výhodne aspoň päť nukleozidových jednotiek nesie 2'-deoxy-erytro-pentofuranozyl sacharidové časti.

Nukleozidové jednotky oligonukleotidov podľa predloženého vynálezu obsahujú nukleobázy spojené s 2'-substituovanými a 2'-deoxy-erytro-pentofuranozyl sacharidovými časťami fosforovými väzbami, ako napríklad fosfodiesterovými a fosforotiónátovými väzbami. Výhodné nukleobázy podľa vynálezu zahŕňajú puríny a pyrimidíny ako napríklad adenín, guanín, cytozín, uridín a tymín, ako aj iné syntetické a prirodzené nukleobázy ako xantín, hypoxantín, 2-aminoadenín, 6-metyl a iné alkyl deriváty adenínu a guanínu, 2-propyl a iné alkyl deriváty adenínu a guanínu, 5-halouracil a cytozín, 5-propynyl uracil a cytozín, 6-azo uracil, cytozín a tymín, 5-uracil (pseudouracil), 4-fluoruracil, 8-halo, amino, tiol, tioalkyl, hydroxyl a iné 8-substituované adeníny a guaníny, 5-trifluorometyl a iné 5-substituované uracily a cytozíny, a 7-metylguanín. Ďalšie puríny a pyrimidíny zahŕňajú tie, ktoré sú popísané v US patente č. 3 687 808, tie, ktoré sú popísané v *Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, str. 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley and Sons, 1990, a tie, ktoré sú popísané v English et al., *Angewandte Chemie*, medzinárodné vydanie, 1991, 30, 613.

Vynález tiež poskytuje spôsob na liečbu organizmu, ktorý má chorobu, pre ktorú je charakteristická produkcia neželaného proteínu. Tieto spôsoby zahŕňajú kontaktovanie organizmu s oligonukleotidom, ktorý má sekvenciu nukleozidových jednotiek schopných špecificky hybridizovať s komplementárnym vláknom nukleovej kyseliny, pričom aspoň jedna nukleozidová jednotka je určená na zvýšenie nukleázovej rezistencie oligonukleotidu, a oligonukleotid tiež obsahuje substitučnú skupinu na zvýšenie väzobnej afinity oligonukleotidu ku komplementárnemu vláknou nukleovej kyseliny, a kde množstvo nukleozidových jednotiek má 2'-deoxy-erytro-pentofuranozyl sacharidové časti.

Predložený vynález ďalej poskytuje kompozície obsahujúce farmaceuticky účinné množstvo oligonukleotidu, ktorý má sekvenciu nukleozidových jednotiek schopných špecificky hybridizovať s komplementárnym vláknom nukleovej kyseliny, pričom aspoň jedna nukleozidová jednotka je určená na zvýšenie nukleázovej rezistencie oligonukleotidu, a množstvo nukleozidových jednotiek má substitučnú skupinu na zvýšenie väzobnej afinity oligonukleotidu ku komplementárnemu vláknú nukleovej kyseliny, a kde množstvo nukleozidových jednotiek má 2'-deoxy-erythro-pentofuranozyl sacharidové časti. Kompozície navyše obsahujú farmaceuticky prijateľné riedidlo alebo nosič.

Vynález ďalej poskytuje spôsob *in vitro* modifikácie sekvenčne špecifickej nukleovej kyseliny, ktorý zahŕňa kontaktovanie testovacieho roztoku obsahujúceho enzým RNáza H a uvedenú nukleovú kyselinu, s oligonukleotidom, ktorý má sekvenciu nukleozidových jednotiek schopných špecificky hybridizovať s komplementárnym vláknom nukleovej kyseliny, pričom aspoň jedna nukleozidová jednotka je určená na zvýšenie nukleázovej rezistencie oligonukleotidu, a množstvo nukleozidových jednotiek má substitučnú skupinu na zvýšenie väzobnej afinity oligonukleotidu ku komplementárnemu vláknú nukleovej kyseliny, a kde množstvo nukleozidových jednotiek má 2'-deoxy-erythro-pentofuranozyl sacharidové časti.

Tiež sú poskytnuté spôsoby na súčasné zosilnenie hybridizácie a aktiváciu RNáza H enzýmu v organizme, ktoré zahŕňajú kontaktovanie organizmu s oligonukleotidom, ktorý má sekvenciu nukleozidových jednotiek schopných špecificky hybridizovať s komplementárnym vláknom nukleovej kyseliny, pričom aspoň jedna nukleozidová jednotka je určená na zvýšenie nukleázovej rezistencie oligonukleotidu, a množstvo nukleozidových jednotiek má substitučnú skupinu na zvýšenie väzobnej afinity oligonukleotidu ku komplementárnemu vláknú nukleovej kyseliny, a kde množstvo nukleozidových jednotiek má 2'-deoxy-erythro-pentofuranozyl sacharidové časti.

Vynález ďalej poskytuje diagnostické spôsoby na detekciu prítomnosti alebo absencie abnormálnych RNA molekúl, alebo abnormálnej alebo nevhodnej expresie normálnych RNA molekúl v organizmoch alebo v bunkách.

Podrobný popis vynálezu

V súlade s predmetom vynálezu sú poskytnuté oligonukleotidy, ktoré majú zvýšenú nukleázovú rezistenciu, zvýšenú väzobnú afinitu ku komplementárnemu vláknenu nukleových kyselín, a ktoré sú substrátom pre RNázu H. Oligonukleotidy podľa vynálezu sú poskaldané z množstva nukleozidových jednotiek. Každý oligonukleotid podľa vynálezu obsahuje aspoň jednu nukleozidovú jednotku, ktorá je určená na zvýšenie nukleázovej rezistencie nukleotidu. Ďalej v určitých uskutočneniach vynálezu nesú aspoň niektoré nukleozidové jednotky substituálnu skupinu, ktorá zvyšuje väzobnú afinitu oligonukleotidu ku komplementárnemu vláknenu nukleovej kyseliny. Navyše aspoň niektoré z nukleozidových jednotiek obsahujú 2'-deoxy-erythro-pentofuranozyl sacharidové časti.

V súlade s hlavnou líniou uvedenou vyššie, každá nukleozidová jednotka oligonukleotidu podľa vynálezu, voliteľne označovaná ako "nukleozid" alebo "podjednotka" môže byť "prirodzenou" alebo "syntetickou" časťou. Takže v kontexte tohto vynálezu výraz "oligonukleotid" znamená oligomér vytvorený z množstva spojených nukleozidových jednotiek. Nukleozidové jednotky sú spolu spojené fosforovými väzbami, ako napríklad fosfodiesterovými alebo fosfotioátovými väzbami. Nukleozidové jednotky sú vytvorené z prirodzene a neprirodzene sa vyskytujúcich nukleobáz a pentofuranozyl sacharidových častí. Termín "oligonukleotid" tak účinne zahŕňa prirodzene sa vyskytujúce druhy alebo syntetické druhy vytvorené z prirodzene sa vyskytujúcich nukleozidových jednotiek.

Oligonukleotidy podľa vynálezu môžu tiež zahŕňať modifikované podjednotky. Modifikácie sa môžu vyskytovať v nukleobázovej časti nukleozidu, v sacharidovej časti nukleozidu alebo vo väzbe spájajúcej daný nukleozid s ďalším.

V predložennom vynáleze bolo zistené, že väzbová afinita oligonukleotidov podľa predloženého vynálezu môže byť zvýšená včlenením substituálnych skupín do nukleozidových jednotiek oligonukleotidov. Výhodnými substituálnymi skupinami sú 2'-substitučné skupiny, napr. substitučné skupiny umiestnené na 2' pozícii pentofuranozyl sacharidových častí nukleozidových jednotiek oligonukleotidov podľa predloženého vynálezu. V súčasnosti zahŕňajú výhodné substitučné skupiny fluoro,

alkoxy, aminoalkoxy, alyloxy, imidazolylalkoxy a polyetylén glykol. Alkoxy a aminoalkoxy skupiny vo všeobecnosti zahŕňajú nižšie alkylové skupiny, hlavne C₁-C₉ alkyl. Polyetylén glykoly majú štruktúru (O-CH₂- CH₂)_n-O-alkyl. Veľmi výhodnou substituálnou skupinou je polyetylén glykolový substituent vzorca (O-CH₂- CH₂)_n-O-alkyl, kde n = 1 a alkyl je CH₃.

Väzbová afinita môže byť zvýšená tiež použitím určitých modifikovaných nukleobáz v nukleozidových jednotkách, ktoré vytvárajú oligonukleotidy podľa vynálezu. Takéto modifikované nukleobázy môžu zahŕňať 5-substituované pyrimidíny, 6-azapyrimidíny a N-2, N-6 a O-6 substituované puríny vrátane 2-aminopropyladenínu, 5-propynyluracilu a 5-propynylcytozínu. Očakáva sa, že aj iné modifikované pyrimidínové a purínové bázy zvyšujú väzobnú afinitu oligonukleotidov ku komplementárnemu vláknu nukleovej kyseliny.

Použitie 2'-substituálnych skupín zvyšuje väzobnú afinitu substituovaných oligonukleotidov podľa predloženého vynálezu. Publikovaná štúdia (*Synthesis and Biophysical Studies of 2'-dRIBO-F Modified Oligonucleotides*, Konferencia o terapeutikách na báze nukleových kyselín, Clearwater, FL 13. január 1991) popisovala zvýšenie väzobnej afinity o 1,6 °C na substituovanú nukleozidovú jednotku 15 méru fosfodiesterového oligonukleotidu, ktorý má 2'-fluoro substituálne skupiny na piatich nukleozidových jednotkách oligonukleotidu. Keď nieslo 2'-fluoro substituálne skupiny 11 nukleozidových jednotiek oligonukleotidu, väzbová afinita sa zvýšila na 1,8 °C na substituovanú nukleozidovú jednotku.

Vo vyššie uvedenej štúdii bol derivatizáciou 15-méru fosfodiesterového oligonukleotidu vytvorený korešpondujúci fosforotioátový analóg. Keď sa porovnal 15-mérny fosfodiesterový oligonukleotid s jeho fosforotioátovým analógom, väzbová afinita fosforotioátového analógu predstavovala približne len 66 % 15-mérneho fosfodiesterového oligonukleotidu. Povedané iným spôsobom, derivatizáciou oligonukleotidu na jeho fosforotioátový analóg sa väzbová afinita znížila. Avšak, keď bol umiestnený 2'-fluoro substituent na 11 nukleozidov 15-mérneho fosforotioátového oligonukleotidu, väzbová afinita 2'-substituálnych skupín viac ako prekonala pokles pozorovaný pri derivatizácii 15-mérneho oligonukleotidu na jeho fosforotioátový analóg. V tejto zlúčenine, teda 15-mérnom fosforotioátovom

oligonukleotide, ktorý má 11 nukleozidových jednotiek substituovaných 2'-fluoro substitučnými skupinami, sa afinita zvýšila na 2,5 °C na substitučnú skupinu. V tejto štúdii sa nepokúšali začleniť vhodnú neprerušovanú sekvenciu nukleozidových jednotiek, ktoré majú 2'-deoxy-erytro-pentofuranozyl sacharidové časti, a ktoré by vyvolali RNáza H enzymatické štiepenie cieľovej RNA komplementárnej k študovanému oligonukleotidu.

Na vyvolanie RNáza H enzymatického štiepenia cieľovej RNA musia oligonukleotidy podľa vynálezu obsahovať segment alebo subsekvenciu, ktorá je segmentom DNA typu. Povedané iným spôsobom, aspoň niektoré nukleozidové podjednotky oligonukleotidov podľa vynálezu musia obsahovať 2'-deoxy-erytro-pentofuranozyl sacharidové časti. Na vyvolanie aktivity RNázy H hybridizáciou s oligonukleotidom podľa vynálezu s cieľovou RNA je nevyhnutná sekvencia, ktorá má viac ako tri za sebou napojené nukleozidové podjednotky, ktoré obsahujú 2'-deoxy-erytro-pentofuranozyl. Výhodnou je sekvencia troch alebo viacerých nukleozidových podjednotiek obsahujúcich 2'-deoxy-erytro-pentofuranozyl v oligonukleotide podľa vynálezu. Výhodným je hlavne použitie aspoň piatich neprerušovaných nukleozidových podjednotiek obsahujúcich 2'-deoxy-erytro-pentofuranozyl.

Mechanizmus, ktorým účinkuje RNáza H je rozoznanie DNA-RNA duplexu, po ktorom nasleduje štiepenie RNA vlákna v tomto duplexe. Ako bolo uvedené vyššie, v časti Doterajší stav techniky, modifikované DNA vlákna boli použité na ovplyvnenie nukleázovej stability DNA vlákna. Na tento účel boli použité modifikované fosforové väzby, ktoré spôsobujú zvýšenie stability voči nukleázam, ale ubierajú z hybridizačných vlastností.

Predložený vynález definuje určité kritéria, ktoré musia byť splnené na to, aby RNáza H rozoznala a vyvolala štiepenie RNA vlákna. Prvým je, že RNA vlákno musí mať v štiepnom mieste nukleozidové jednotky spojené fosforovou väzbou, ktorá nesie negatívny náboj. Ďalej sacharidová časť v nukleozidoch v štiepnom mieste musí byť β -pentofuranozyl sacharidová časť a tiež musí byť v 2'-endo konformácii. Jediné nukleozidy, ktoré spĺňajú tieto kritéria sú 2'-deoxy-erytro-pentofuranozyl β nukleozidy spojené fosfodiesterovými, fosforotioátovými a fosforoditioátovými väzbami.

Vhodné nukleobázy, ktoré môžu byť použité na prípravu takýchto štrukturálnych jednotiek zahŕňajú puríny a pyrimidíny ako napríklad adenín, guanín, cytozín, uridín a tymín, ako aj iné syntetické a prirodzené nukleobázy ako xantín, hypoxantín, 2-aminoadenín, 6-metyl a iné alkyl deriváty adenínu a guanínu, 2-propyl a iné alkyl deriváty adenínu a guanínu, 5-halouracil a cytozín, 5-propynyl uracil a cytozín, 6-azo uracil, cytozín a tymín, 5-uracil (pseudouracil), 4-thiouracil, 8-halo, amino, tiol, tioalkyl, hydroxyl a iné 8-substituované adeníny a guaníny, 5-trifluorometyl a iné 5-substituované uracily a cytozíny, a 7-metylguanín. Ďalšie puríny a pyrimidíny zahŕňajú tie, ktoré sú popísané v US patente č. 3 687 808, tie, ktoré sú popísané v *Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, str. 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley and Sons, 1990, a tie, ktoré sú popísané v English et al., *Angewandte Chemie*, Medzinárodné vydanie, 1991, 30, 613.

Oligonukleotidy podľa predloženého vynálezu obsahujú metoxyetoxy ($-OCH_2CH_2CH_3$) na 2' pozícii aspoň jedného nukleozidu. Bolo dokázané, že táto modifikácia zvyšuje tak afinitu oligonukleotidu k jeho cieľu, ako aj rezistenciu oligonukleotidu voči nukleázam. Oligonukleotidy podľa vynálezu výhodne obsahujú od 5 do 50 nukleozidových jednotiek. V kontexte tohto vynálezu sa rozumie, že to zahŕňa neprirodzene sa vyskytujúce oligoméry, ktoré boli popísané vyššie, majúce 5 až 50 nukleozidových jednotiek. Výhodnejšie obsahujú oligonukleotidy podľa vynálezu od 15 do 25 nukleozidových jednotiek. Treba zdôrazniť, že "nukleozidová jednotka" je kombinácia nukleobázy a sacharidu vhodne spojená s nasledujúcou podjednotkou fosforovou väzbou. Výraz "podjednotka" je používaný zameniteľne s výrazom "nukleozidová jednotka". Na vyvolanie RNáza H odpovede, tak ako je špecifikované vyššie, je do celkovej dĺžky oligonukleotidovej sekvencie začlenená, subsekvencia viac ako troch, výhodnejšie piatich alebo viacerých neprerušovaných spojených nukleozidových jednotiek obsahujúcich 2'-deoxy-erytro-pentofuranozyl.

Výhodné je do oligonukleotidu začleniť nukleozidovú sekvenciu obsahujúcu 2'-deoxy-erytro-pentofuranozyl tak, že sú vo vnútri oligonukleotidu umiestnené iné nukleozidové sekvencie obsahujúce 2'-substituovaný pentofuranozyl, ktoré sú po stranách nukleozidových sekvencií obsahujúcich 2'-deoxy-erytro-pentofuranozyl. V takejto konštrukcii sa nukleozidová sekvencia obsahujúca 2'-deoxy-erytro-

pentofuranozyl nazýva tiež "centrálna oblasť" a nukleozidové sekvencie obsahujúce 2'-substituovaný pentofuranozyl sa nazývajú "ohraničujúce oblasti".

V určitých uskutočneniach vynálezu ak každá zo zvyšných nukleozidových jednotiek obsahuje 2'-substitučnú skupinu na zvýšenie väzobnej afinity, tak nukleozidová sekvencia obsahujúca 2'-deoxy-erytro-pentofuranozyl je umiestnená medzi prvou sekvenciou nukleozidových jednotiek, ktoré majú 2'-substitučné skupiny a druhou sekvenciou nukleozidových jednotiek, ktoré majú 2'-substitučné skupiny. Možné sú aj iné konštrukcie vrátane umiestnenia nukleozidovej sekvencie obsahujúcej 2'-deoxy-erytro-pentofuranozyl buď na 3' alebo na 5' koniec oligonukleotidov podľa vynálezu.

Oligonukleotidy použité v súlade s vynálezom môžu byť vyrobené bežným a rutinným spôsobom, dobre známou technikou syntézy na pevnej fáze. (Martin, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504). Vybavenie na takéto syntézy je predávané niekoľkými maloobchodníkmi vrátane Applied Biosystems. Použitý môže byť tiež akýkoľvek iný prostriedok na takúto syntézu. Syntéza oligonukleotidov je dobre známa medzi odborníkmi v oblasti. Tiež je dobre známe použitie podobných techník na prípravu iných oligonukleotidov, ako napríklad fosforotioátov a alkylovaných derivátov. Tiež je dobre známe použitie podobných techník a komerčne dostupných amidínov a produktov skla s určenou veľkosťou pórov (CPG) ako napríklad biotínu, fluoresceínu, akridínu alebo amidínov modifikovaných psoralínom a/alebo CGP (dostupné od Glen Research, Sterling VA) na syntézu fluorescenčne značených, biotinylovaných alebo iných konjugovaných oligonukleotidov.

Zlúčeniny podľa vynálezu môžu byť použité ako diagnostiká, terapeutiká a ako reagenty a kity vo výskume. Môžu byť použité vo farmaceutických kompozíciách pridaním účinného množstva oligonukleotidu podľa vynálezu do vhodného farmaceuticky prijateľného riedidla alebo nosiča. Ďalej môžu byť použité na liečbu organizmu, ktorý má chorobu, pre ktorú je charakteristická produkcia neželaného proteínu. Organizmus môže byť kontaktovaný s oligonukleotidom podľa vynálezu, ktorý má sekvenciu schopnú špecificky hybridizovať s vláknom cieľovej nukleovej kyseliny, ktorá kóduje neželaný proteín.

Zloženie terapeutických kompozícií a ich následné podanie spadá do doterajšieho stavu techniky. Vo všeobecnosti pri terapeutikách, je pacientovi, ktorý potrebuje takúto terapiu, podávaný oligonukleotid podľa vynálezu, bežne vo farmaceuticky prijateľnom nosiči, v dávke od 0,01 μg do 100 g na kg telesnej hmotnosti, v závislosti od veku pacienta a rozsahu choroby, ktorá má byť liečená. Liečebný režim môže trvať počas doby, ktorá varíruje v závislosti od povahy konkrétnej choroby, jej rozsahu a celkovej kondície pacienta, a môže byť v rozsahu od raz denne do raz každých 20 rokov. Následne po liečbe je pacient monitorovaný z hľadiska jeho kondície a zmiernenia symptómov choroby. V prípade, že pacient dostatočne neodpovedá na aktuálnu dávku, môže sa dávka oligonukleotidu zvýšiť, alebo v prípade, že je pozorované zmiernenie symptómov choroby alebo ak je chorobný stav odstránený, môže byť dávka znížená.

V niektorých prípadoch môže byť účinnejšie liečenie pacienta oligonukleotidom podľa vynálezu spolu s inými tradičnými terapeutickými spôsobmi. Napríklad pacientovi liečenému na AIDS môže byť oligonukleotid podávaný v spojení s AZT, alebo pacient s arteriosklerózou môže byť liečený oligonukleotidom podľa vynálezu, po ktorom nasleduje angioplastika, aby sa predišlo reoklúzii ošetrovaných ciev.

Na to, aby sa zabránilo opätovnému výskytu chorobného stavu, môže byť po úspešnej liečbe žiadateľné, aby pacient podstúpil udržiavaciu terapiu. Pri nej je oligonukleotid podávaný v zotrvávajúcej dávke v rozsahu od 0,01 μg do 100 g na kg telesnej hmotnosti, od raz alebo viac krát denne do raz každých 20 rokov.

Farmaceutické kompozície podľa vynálezu môžu byť podávané mnohými spôsobmi, v závislosti od toho, či je žiadúce lokálne alebo systemické ošetrovanie a v závislosti od miesta, ktoré má byť ošetrované. Podanie môže byť topické (vrátane oftalmického, vaginálneho, rektálneho, intranazálneho, transdermálneho), orálne alebo parenterálne. Parenterálne podanie zahŕňa intravenózne kvapkanie, subkutánnu, intraperitoneálnu alebo intramuskulárnu injekciu alebo intratekálne alebo intraventrikulárne podanie.

Formulácie na topické podanie môžu zahŕňať transdermálne náplasti, masti, pleťové vody, krémy, gély, kvapadlá, čípky, spreje, tekutiny a prášky. Nevyhnutné alebo želateľné môžu byť tiež bežné farmaceutické nosiče, vodné, práškové alebo olejové bázy, stužovadlá a podobne. Použiteľné môžu byť tiež obalené kondómy, rukavice a podobne.

Kompozície na orálne podanie obsahujú prášky alebo granule, suspenzie alebo roztoky vo vodných alebo nevodných médiách, kapsule, parfémové prášky alebo tablety. Želateľné môžu byť tiež stužovadlá, ochucovacie činidlá, riedidlá, emulzifikátory, látky napomáhajúce disperzii alebo spojivá.

Kompozície na intratekálne alebo intraventrikulárne podanie môžu zahŕňať sterilné vodné roztoky, ktoré môžu tiež obsahovať tlmivé roztoky, riedidlá a iné vhodné aditíva.

Kompozície na parenterálne podanie môže zahŕňať sterilné vodné roztoky, ktoré môžu tiež obsahovať tlmivé roztoky, riedidlá a iné vhodné aditíva.

Dávkovanie závisí od rozsahu a rezpozivity choroby, ktorá má byť liečená, pričom ošetrovanie trvá od niekoľkých dní do niekoľkých mesiacov, alebo pokiaľ nie je liečba účinná alebo pokiaľ nie je dosiahnuté zníženie chorobného stavu. Optimálny rozpis dávkovania môže byť stanovený z akumulácie liečiva v tele pacienta. Priemerný odborník v oblasti môže ľahko určiť optimálne dávky, spôsob dávkovania a intervaly opakovaní. Optimálne dávky môžu variovať v závislosti od relatívnej potencie individuálnych oligonukleotidov a vo všeobecnosti môžu byť odhadnuté na základe IC_{50} , pre ktoré sa zistí, že sú účinné *in vitro* a *in vivo* na živočíšnych modeloch. Vo všeobecnosti je dávka v rozmedzí od 0,01 μ g do 100 g na kg telesnej hmotnosti, a môže byť podávaná raz alebo viac krát denne, týždenne, mesačne alebo ročne, alebo aj raz každé 2 až 20 rokov.

Takéto terapeutické ošetrovanie môže byť použité pri rôznych organizmoch v rozmedzí od jednobunkových prokaryotických a eukaryotických organizmov až po mnohobunkové eukaryotické organizmy. Prístupným pre takéto terapeutické a/alebo profylaktické ošetrovanie je akýkoľvek organizmus, ktorý používa DNA-RNA transkripciu alebo RNA-proteín transláciu ako fundamentálnu časť svojho

dedičného, metabolického alebo bunkového systému. Týmto spôsobom môžu byť ošetrované zdanlivo diverzné organizmy ako napríklad baktérie, kvasinky, protozoa, riasy, rastliny a vyššie živočíšne formy, vrátane teplokrvných živočíchov. Ďalej keďže každá bunka mnohobunkových eukaryotov tiež zahŕňa tak DNA-RNA transkripciu ako aj RNA- proteín transláciu ako integrálnu časť svojej bunkovej aktivity, je možné použiť takéto terapeutiká a/alebo diagnostiká tiež na takéto bunkové populácie. Navyše veľa organel v eukaryotických organizmoch ako napríklad mitochondrie a chloroplasty, tiež obsahujú transkripčné a translačné mechanizmy. Takže do definície organizmov, ktoré môžu byť ošetrované terapeutickými alebo diagnostickými oligonukleotidmi podľa vynálezu môžu byť zahrnuté samostatné bunky, bunkové populácie alebo organely. Terapiou je v tomto vynáleze myslené odstránenie chorobného stavu, zničenie organizmu napríklad baktériálnej, protozoa alebo inej infekcie, alebo kontrola nenormálneho alebo neželateľného rastu buniek alebo expresie.

V kontexte tohto vynálezu "hybridizácia" znamená spájanie vodíkovými väzbami, ktorými môžu byť Watson-Crickové, Hoogsteenové alebo reverzné Hoogsteenové vodíkové väzby medzi komplementárnymi nukleobázami. Napríklad adenín a tymín sú komplementárnymi nukleobázami, ktoré sa párujú vytváraním vodíkových väzieb. "Komplementárny" a "schopný špecifickej hybridizácie", ako sa používa v predložennom vynáleze, označujú sekvenčnú komplementaritu medzi dvoma nukleovými kyselinami obsahujúcimi nukleozidové jednotky, pričom jedna nukleová kyselina je oligonukleotid a druhá nukleová kyselina je cieľová DNA alebo RNA molekula. Napríklad ak nukleobáza na určitej pozícii v oligonukleotide je schopná vytvoriť vodíkovú väzbu s nukleobázou na rovnakej pozícii v DNA alebo RNA molekule, potom sú oligonukleotid a DNA alebo RNA molekula považované za vzájomne komplementárne v tejto pozícii. Oligonukleotid a DNA alebo RNA molekula sú navzájom komplementárne ak je dostatočné množstvo zodpovedajúcich pozícií v každej molekule obsadených nukleobázami, ktoré môžu navzájom vytvárať vodíkové väzby. Takže "schopný špecifickej hybridizácie" a "komplementárny" sú výrazy, ktoré sú použité na vyjadrenie dostatočného stupňa komplementarity, pri ktorom sa vytvára špecifické spojenie medzi oligonukleotidom a cieľovou DNA alebo RNA molekulou. Samozrejme, že oligonukleotid nemusí byť 100 % komplementárny

s jeho cieľovou DNA sekvenciou na to, aby bol schopný špecifickej hybridizácie. Oligonukleotid je schopný špecifickej hybridizácie, keď naviazanie oligonukleotidu na cieľovú DNA alebo RNA molekulu interferuje s normálnou funkciou cieľovej DNA alebo RNA molekuly a tak spôsobuje stratu použiteľnosti, pričom naviazanie je v dostatočnom stupni komplementárne, aby sa vyhlo nešpecifickému naviazaniu oligonukleotidu na sekvencie, ktoré nie sú cieľom, v podmienkach, pri ktorých je požadované špecifické naviazanie, napr. vo fyziologických podmienkach v prípade *in vivo* experimentov alebo terapeutickej liečby, alebo v prípade *in vitro* experimentov v podmienkach, v ktorých je experiment uskutočňovaný.

Na účely ilustrácie boli zlúčeniny podľa vynálezu použité v ras-luciferázovom fúznom systéme, ktorý využíva transaktiváciu ras-luciferázy. Ako je popísané v medzinárodnej zverejnenej prihláške č. WO 92/22651, zverejnenej 23. decembra 1992, a ktorá je tu včlenená ako referencia, ras onkogény sú členmi génovej rodiny, ktorá kóduje príbuzné proteíny umiestnené na vnútornej strane plazmatickej membrány. Bolo preukázané, že ras proteíny sú vysoko konzervované, a že viažu GTP s vysokou afinitou a špecifitou a vykazujú GTPázovú aktivitu. Hoci bunková funkcia produktov ras génov nie je známa, ich biochemické vlastnosti spolu s ich signifikantnou sekvenčnou homológiou s triedou signál prenášajúcich proteínov, známych ako GTP viažuce proteíny alebo G proteíny, naznačuje, že produkty ras génov hrajú fundamentálnu úlohu v základných bunkových regulačných funkciách týkajúcich sa prenosu extracelulárnych signálov cez plazmatické membrány.

V cicavčom genóme boli identifikované tri ras gény označované ako H-ras, K-ras a N-ras. Cicavčie ras gény nadobúdajú transformáciu indukujúce vlastnosti bodovými mutáciami vo vnútri ich kódovacích sekvencií. Mutácie v prirodzene sa vyskytujúcich ras onkogénoch môžu byť lokalizované v kodónoch 12, 13 a 61. Najbežnejšie detegovanou mutáciou aktivujúcou ras, ktorá bola nájdená v ľudských nádoroch je kodón 12 v H-ras géne, v ktorom výsledkom bázeovej zmeny z GGC na GTC je substitúcia glycínu na valín v regulačnej doméne GTPázy ras proteínového produktu. Táto zámena jednej aminokyseliny je považovaná za príčinu toho, že je zrušená normálna kontrola funkcie ras proteínu, čím sa konvertuje normálne regulovaný bunkový proteín na proteín, ktorý je nepretržite aktívny. Verí sa, že

takáto deregulácia normálnej funkcie ras proteínu spôsobuje transformáciu z normálneho na malígnu rast.

Oligonukleotidy podľa predloženého vynálezu boli tiež použité na moduláciu expresie raf génu, prirodzene sa vyskytujúceho bunkového génu, ktorý príležitostne konvertuje na aktivovanú formu, ktorá je zapojená do abnormálnej proliferácie buniek a vytvárania nádoru.

Oligonukleotidy podľa predloženého vynálezu sú tiež schopné špecifickej hybridizácie s nukleovými kyselinami vzťahujúcimi sa k proteínkináze C (PKC). Bolo zistené, že tieto oligonukleotidy modulujú expresiu PKC.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obr. 1 je čiarový graf znázorňujúci aktivitu dávok oligonukleotidov podľa vynálezu a porovnávanej zlúčeniny.

Obr. 2 je stĺpcový graf znázorňujúci aktivitu dávok oligonukleotidov podľa vynálezu a porovnávanej zlúčeniny.

Obr. 3 je stĺpcový graf znázorňujúci účinky niekoľkých 2'-O-metyl chimerických oligonukleotidov na hladiny PKC- α mRNA. Pruhovalé stĺpce znázorňujú 8,5 kb transkript a čisté stĺpce znázorňujú 4,0 kb transkript.

Obr. 4 je stĺpcový graf znázorňujúci účinky niekoľkých 2'-O-metyl a 2'-O-propyl chimerických oligonukleotidov na hladiny PKC- α mRNA. Pruhovalé stĺpce znázorňujú 8,5 kb transkript a čisté stĺpce znázorňujú 4,0 kb transkript.

Obr. 5 je stĺpcový graf znázorňujúci účinky niekoľkých 2'-O-metyl a 2'-O-propyl chimerických oligonukleotidov na hladiny PKC- α mRNA. Pruhovalé stĺpce znázorňujú 8,5 kb transkript a čisté stĺpce znázorňujú 4,0 kb transkript.

Obr. 6a a 6b sú čiarové grafy znázorňujúce účinok 2'-metoxyetoxy modifikovaných oligonukleotidov majúcich sekv. č. 30 na hladiny PKC α mRNA v A549 bunkách. Obrázok 6a znázorňuje účinok ISIS 9605 v porovnaní s

deoxyfosforotioátovou zlúčeninou ISIS 3521. Obrázok 6b znázorňuje účinok ISIS 9606 v porovnaní s deoxyfosforotioátovou zlúčeninou ISIS 3521.

Obr. 7a a 7b sú čiarové grafy znázorňujúce účinky oligonukleotidov so sekv. č. 30 na rast humánneho karcinómu hrubého čreva (Colo 205) v nádorových xenoštepoch v nahých myšiach. Obrázok 7a znázorňuje účinok deoxyfosforotioátovej zlúčeniny ISIS 3521. Obrázok 7a znázorňuje účinok 2-metoxyetoxy modifikovanej zlúčeniny ISIS 12723.

Obr. 8a a 8b sú čiarové grafy znázorňujúce účinok ISIS 5132 (obr. 6a) a CGP 69845 čo je 2'-metoxyetoxy ($2'\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_3$) verzia rovnakej sekvencie (obr. 6b), na rast A549 pľúcnych nádorových xenoštepov v nahých myšiach.

Obr. 9 je čiarový graf znázorňujúci koncentrácie kontrolnej zlúčeniny a dvoch zlúčenín podľa vynálezu v myšej plazme. Koncentrácia v plazme je vzťahnutá k času.

Obr. 10 je trojrozmerný stĺpcový graf znázorňujúci distribúciu kontrolnej zlúčeniny v rôznych tkanivách myši. Konkrétne tkanivá sú znázornené na jednej osi, čas na druhej a % dávky na tretej. Zlúčenina bola vnesená intravenóznou injekciou.

Obr. 11 je trojrozmerný stĺpcový graf znázorňujúci distribúciu zlúčeniny podľa vynálezu v rôznych tkanivách myši. Konkrétne tkanivá sú znázornené na jednej osi, čas na druhej a % dávky na tretej. Zlúčenina bola vnesená intravenóznou injekciou.

Obr. 12 je trojrozmerný stĺpcový graf znázorňujúci distribúciu ďalšej zlúčeniny podľa vynálezu v rôznych tkanivách myši. Konkrétne tkanivá sú znázornené na jednej osi, čas na druhej a % dávky na tretej. Zlúčenina bola vnesená intravenóznou injekciou.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Nasledujúce príklady a postupy ilustrujú predložený vynález bez toho, aby ho obmedzovali.

Príklad 1

Syntéza oligonukleotidu

Nesubstituované a substituované oligonukleotidy boli syntetizované na automatickom DNA syntetizéry (Applied Biosystems model 380B) použitím štandardnej fosforamidovej chémie s oxidáciou jódom. Na fosforotioáciu oligonukleotidov bola štandardná oxidačná fľaša vymenená za 0,2 M roztok 3H-1,2-benzoditiol-3-ón 1,1-dioxyde v acetonitrile na postupnú tiáciu fosfitových väzieb. Tlačný vyčkávací krok bol predĺžený na 68 sek a po ňom nasledoval krok, v ktorom sa vytvárala čiapočka. Po vyštípení z CPG kolóny a odblokovaní v koncentrovanom amónium hydroxide pri 55 °C (18 hod.), oligonukleotidy boli purifikované dvojnásobnou precipitáciou s 2,5 objemom etanolu z 0,5 M NaCl roztoku. Analytická gélová elektroforéza bola uskutočňovaná v 20 % akrylamide, 8 M močovine, 454 mM Tris-borátovom tlmivom roztoku, pH = 7,0. Dĺžka oligonukleotidov a fosforotioátov bola na základe polyakrylamidovej gélovej elektroforézy odhodnotená na dlhšiu ako 80 % celkovej dĺžky materiálu.

Príklad 2

Oligonukleotid majúci 2'-substituované oblasti ohraničujúce centrálnu 2'-deoxy fosforotioátovú oblasť

15 mérna RNA cieľová molekula so sekvenciou 5' GCGTTTTTTTTTTGCG 3' (sekv. č. 28) bola pripravená normálnym spôsobom na DNA sekvenátore použitím RNA protokolov. Série komplementárnych fosforotioátových oligonukleotidov, ktoré majú 2'-substituované oligonukleotidové jednotky v oblastiach, ktoré ohraničujú 2'-deoxy oblasť, boli pripravené použitím 2'-substituovaných nukleozidových prekurzorov pripravených podľa postupov známych z literatúry, napr. 2'-O-metyl alebo podľa postupu z medzinárodnej zverejnenej prihlášky č. WO 92/03568, zverejnenej 5. marca 1992. 2'-substituované nukleozidy boli normálnym spôsobom dané do DNA syntetizéra vo forme ich 5'-O-dimetoxytrityl-3'-fosforamínov. Komplementárne oligonukleotidy majú sekvenciu 5' CGC AAA AAA AAA ACG C 3' (sekv. č. 29). 2'-substituent bol umiestnený v CGC a CG oblastiach týchto

oligonukleotidov. Boli použité nasledujúce 2'-O-substituenty: 2'-fluoro; 2'-O-metyl; 2'-O-propyl; 2'-O-allyl; 2'-O-aminopropoxy; 2'-O-(metoxyetoxyetyl); 2'-O-imidazolbutoxy a 2'-O-imidazolpropoxy.

Príklad 3

Zostavenie ras-luciferázového reporterového génu

Ras-luciferázové reporterové gény popísané v tejto štúdii boli zostavené použitím PCR technológie. Na to aby sa mohli klonovať pomocou PCR 5'oblasti exónu 1 tak mutovaného (kodón 12) ako aj nemutovaného (divý typ) ľudského H-ras génu, boli syntetizované oligonukleotidové primery. Templát H-ras génu bol získaný z American Type Culture Collection (ATCC č. 41000 a 41001) v Bethesda, MD. V štandardných PCR reakciách, kde boli použité mutované a nemutované H-ras gény ako templáty, boli použité oligonukleotidové PCR primery ##5'-ACA-TTA-TGC-TAG-CTT-TTT-GAG-TAA-ACT-TGT-GGG-GCA-GGA-GAC-CCT-GT-3' (sense) (sekv. č. 15) a 5'-GAG-ATC-TGA-AGC-TTC-TGG-ATG-GTC-AGC-GC-3' (antisense) (sekv. č. 16). Predpokladalo sa, že tieto primery vytvárajú DNA produkt s dĺžkou 145 bázových párov, ktorý korešponduje so sekvenciami od -53 do +65 (počítané od miesta iniciácie translácie) normálneho a zmutovaného H-ras, ohraničeného miestami pre NheI a Hind II restriktčné endonukleázy. PCR produkt bol gélovo purifikovaný, precipitovaný, premytý a znovu rozsuspendovaný vo vode použitím štandardných postupov.

PCR primery na klonovanie *P. pyralis* (svätojánska muška) luciferázového génu boli navrhnuté tak, aby PCR produkt kodoval celú dĺžku luciferázového proteínu s výnimkou aminoterminálneho metionínového zvyšku, ktorý bol nahradený dvoma aminokyselinami, a to aminoterminálnym lyzínovým zvyškom, po ktorom nasleduje leucínový zvyšok. Oligonukleotidové PCR primery, ktoré boli použité na klonovanie luciferázového génu sú 5'-GAG-ATC-TGA-AGC-TTG-AAG-ACG-CCA-AAA-ACA-TAA-AG-3' (sense) (sekv. č. 17) a 5'-ACG-CAT-CTG-GCG-CGC-CGA-TAC-CGT-CGA-CCT-CGA-3' (antisense) (sekv. č. 18), pričom boli použité štandardné PCR reakcie a komerčne dostupný plazmid (pT3/T7-Luc) (Clontech) obsahujúci luciferázový reportérový gén ako templát. Predpokladalo sa, že týmito

primermi sa získal približne 1,9 kb produkt korešpondujúci s luciferázovým génom, ktorý bol ohraničený štiepnymi miestami pre HindIII a BssHII restriktčné endonukleázy. Tento fragment bol gélovo purifikovaný, precipitovaný, premytý a znovu rozsuspendovaný vo vode použitím štandardných postupov.

Na kompletizáciu ras-luciferázovej fúzie boli PCR produkty reportérového génu, ras a luciferázy štiepené príslušnými restriktčnými endonukleázami a klonované ligáciou troch častí do expresného vektora obsahujúceho MMTV promótor indukovateľný steroidmi z vírusu myšieho prsného nádoru, použitím restriktčných endonukleáz NheI, HindIII a BssHII. Výsledný klon mal inzert H-ras 5' sekvencie (od -53 do +65) fúzovaný v čítacom rámci s luciferázovým génom svätajánskej mušky. Výsledný expresný vektor kóduje ras-luciferázový fúzny produkt, ktorý je exprimovaný pod kontrolou steroidom indukovateľného MMTV promótoru.

Príklad 4

Transfekcia buniek plazmidovou DNA

Transfekcia bola uskutočňovaná ako popisuje Greenberg (Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds., John Wiley and Sons, NY) s nasledujúcimi modifikáciami: HeLa bunky boli umiestnené na 60 mm misku s hustotou 5×10^5 buniek/misku. Na každú misku bolo pridané celkovo 10 μ g DNA, z ktorých 9 μ g bol ras-luciferázový reporterový plazmid a 1 μ g bol vektor exprimujúci potkaní glukokortikoidný receptor pod kontrolou konštitutívneho Rous sarkóma vírusového (RVS) promótoru. Po 16 až 20 hodinách boli odstránené fosforečnan vápenatý-DNA koprecipitáty premytím s Tris-pufrovaným fyziologickým roztokom (50 mM Tris-Cl (pH 7,5) 150 mM NaCl)) obsahujúcim 3 mM EGTA. K bunkám bolo potom pridané čerstvé médium doplnené 10 % fetálnym bôvinným sérom. Pred aktiváciou reporterového génu dexametazónom boli bunky ošetrované antisense oligonukleotidmi.

Príklad 5

Ošetrovanie buniek oligonukleotidmi

Okamžite po transfekcii boli bunky trikrát premyté s OptiMEM (GIBCO) a predhriate na 37 °C. Na každú miskú sa pridali 2ml OptiMEM obsahujúceho 10 µg/ml N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimetylamónium chloridu (DOTMA) (Bethesda Research Labs, Gaithersburg, MD), priamo boli dané oligonukleotidy aisky boli inkubované 4 hod. pri 37 °C. OptiMEM bol potom odstránený a nahradený médiom vhodným pre rast buniek, ktoré obsahovalo oligonukleotidy. Zároveň bola aktivovaná expresia reporterového génu ošetrovaním buniek s dexametazónom vo výslednej koncentrácii 0,2 µM. Bunky boli zozbierané 12 až 16 hodín po ošetrovaní steroidom.

Príklad 6

Luciferázový experiment

Z buniek bola luciferáza extrahovaná lýzou detergentom Triton X-100, ako popisuje Greenberg (Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds., John Wiley and Sons, NY). Na meranie vrchola luminiscencie po pridaní luciferínu (Sigma) do 625 µM bol použitý Dynatech ML100 luminometer. Na to, aby sa zaistilo zachytenie údajov v lineárnom rozsahu, bola pre každý extrakt luciferázová skúška uskutočňovaná v rôznych časoch a použitím rôznych množstiev.

Príklad 7

Inhibícia exprese ras-luciferázového génu antisense oligonukleotidom

Použitím ras-luciferázového reporterového génového systému, ktorý bol popísaný v predchádzajúcich príkladoch, bola testovaná séria fosforotioátových oligonukleotidov cielených na bodovú mutáciu v kodóne12 aktivovaného H-ras. Táto séria obsahovala základnú sekvenciu a analógy základnej sekvencie. Aktivita základnej sekvencie bola známa z medzinárodnej zverejnenej prihlášky č. WO 92/22651, ktorá bola popísaná vyššie. Tak v základnej sekvencii ako aj v jej analógoch, každá nukleozidová jednotka zahŕňala fosforotioátovú väzbu, ktorá poskytuje nukleázovú rezistenciu. Každý z analógov obsahoval nukleozidové jednotky, ktoré obsahovali 2'-O-metyl substituenty a 2'-deoxy-erytro-pentofuranozyl sacharidové časti. V analógoch boli subsekvencie podjednotiek obsahujúcich 2'-deoxy-erytro-pentofuranozyl sacharid ohraničené na oboch koncoch subsekvenciami

2'-O-metyl substituovaných podjednotiek. Analógy sa navzájom odlišovali dĺžkou subsekvencie podjednotky obsahujúcej 2'-deoxy-erytro-pentofuranozyl sacharid. 2'-deoxy-erytro-pentofuranozyl nukleozidové subsekvencie boli umiestnené do stredu bodovej mutácie v kodóne 12 aktivovaného ras.

V tabuľke 1 sú uvedené oligonukleotidové sekvencie, značky sekvencií a identifikačné čísla sekvencií (všetko sú fosforotioátové analógy). V tejto tabuľke nukleozidy označené z ^M obsahujú 2'-O-metyl substituent a nukleozidy označené s _d sú 2'-deoxy-erytro-pentofuranozylové nukleozidy.

Tabuľka 1

Chimérne 2'-O-methyl P=S oligonukleotidy

OLIGO	SEKVENCIA	SEKV.	C.
č.:			
2570	C _d C _d A _d C _d A _d C _d C _d G _d A _d C _d G _d G _d C _d G _d C _d C _d C _d	1	
3975	C ^M C ^M A ^M C ^M A ^M C ^M C ^M G ^M A _d C ^M G ^M G ^M C ^M G ^M C ^M C ^M C ^M	1	
3979	C ^M C ^M A ^M C ^M A ^M C ^M C ^M G _d A _d C _d G ^M G ^M C ^M G ^M C ^M C ^M C ^M	1	
3980	C ^M C ^M A ^M C ^M A ^M C ^M C _d G _d A _d C _d G _d G ^M C ^M G ^M C ^M C ^M C ^M	1	
3985	C ^M C ^M A ^M C ^M A ^M C _d C _d G _d A _d C _d G _d G _d C ^M G ^M C ^M C ^M C ^M	1	
3984	C ^M C ^M A ^M C ^M A _d C _d C _d G _d A _d C _d G _d G _d C _d G ^M C ^M C ^M C ^M	1	

Obrázok 1 znázorňuje údaje o dávkovej odpovedi. Bunky boli ošetrované fosforotioátovými oligonukleotidmi podľa tabuľky 1. Oligonukleotid 2570 je cielený na kodón 12 bodovú mutáciu mutantnej (aktivovanej) H-ras RNA. Ostatné nukleotidy majú na zvýšenie väzobnej afinity 2'-O-metyl substituenty spolu s rôzne dlhými sekciami prerušovaných 2'-deoxy-erytro-pentofuranozylových nukleozidov. Kontrolný oligonukleotid je náhodný 20 merný fosforotioátový oligonukleotid. Výsledky sú vyjadrené v percentách vzhľadom na luciferázovú aktivitu transfekovanej bunky, ktorá nebola ošetrovaná oligonukleotidom. Ako vidno na obrázku, výsledkom ošetrovania buniek vzrastajúcou koncentráciou oligonukleotidu 2570 bola dávkovo závislá inhibícia ras-luciferázovej aktivity v bunkách exprimujúcich mutantnú formu ras-luciferázy v porovnaní s normálnou formou.

Z obrázku 1 je ďalej zrejmé, že každý z oligonukleotidov 3980, 3985 a 3984 vykazoval vyššiu inhibíciu ras-luciferázovej aktivity ako oligonukleotid 2570. Oligonukleotid 3985, ktorý má 7 mernu subsekvenciu 2'-deoxy-erytro-pentofuranozylových nukleozidov, prejavil najvyššiu inhibíciu. Oligonukleotid 3980, ktorý má 5 mernu subsekvenciu 2'-deoxy-erytro-pentofuranozylových jednotiek vykazoval druhú najvyššiu inhibíciu a nasledoval oligonukleotid 3984, ktorý má 9 mernu subsekvenciu 2'-2'-deoxy-erytro-pentofuranozylových nukleozidových jednotiek.

Obrázok 2 zobrazuje podobné výsledky ako obrázok 1, s tou výnimkou, že je vo forme stĺpcového grafu. Navyše možno na obrázku 2 vidieť aktivitu oligonukleotidu 3975 a oligonukleotidu 3979. Tieto oligonukleotidy majú subsekvencie 2'-deoxy-erytro-pentofuranozylových nukleozidových jednotiek dlhé 1 a 3 nukleozidy. Z obrázku 2 je zrejmé, že žiadny z oligonukleotidov nevykazuje signifikantnú aktivitu. Pri dávke s najvyššou koncentráciou bola pozorovaná merateľná aktivita oligonukleotidu 3979, ktorý má 3 mernu deoxy subsekvenciu.

Zvýšená aktivita oligonukleotidov 3980, 3985 a 3984 v porovnaní s oligonukleotidom 2570 je prisudzovaná zvýšenej väzobnej afinite, ktorá je týmto zlúčeninám daná 2'-O-metyl substituentami umiestnenými v zlúčenine, a RNáza H aktivácii, ktorá je týmto zlúčeninám daná začlenením 2'-deoxy-erytro-pentofuranozylových nukleozidov do hlavnej sekvencie nukleozidov. Je zaujímavé poznamenať, že oproti aktívnym zlúčeninám podľa vynálezu, sekvencie identické s tými, ktoré majú aktívne oligonukleotidy 2570, 3980, 3985 a 3984, ale majúce fosfodiesterové väzby namiesto fosforotioátových, ktoré sú v aktívnych oligonukleotidoch podľa vynálezu, nevykazujú žiadnu aktivitu. To je prisudzované tomu, že fosfodiesterové zlúčeniny sú substrátom pre nukleázy, ktoré degradujú fosfodiesterové zlúčeniny, čím predchádzajú potencionalnej aktivácii RNázy H.

Iné sacharidové modifikácie: Boli testované účinky iných 2' sacharidových modifikácii okrem 2'-O-metyl substituentov na antisense aktivitu chimérnych oligonukleotidov. Tieto modifikácie sú uvedené v tabuľke 2, spolu s hodnotami teploty topenia získaných, keď 7 merna deoxy subsekvencia (alebo 7 merné deoxy prerušenie) bola hybridizovaná s 25 merným oligonukleotidovým komplementom,

ako je popísané v príklade 8. Pri týchto oligonukleotidoch bola pozorovaná súvislosť medzi dĺžkou alkylu na 2' pozícii a T_m . So zväčšujúcou sa dĺžkou alkylu klesala T_m . 2'-fluoro chimérne oligonukleotidy vykazovali najvyššiu T_m v sérii.

Tabuľka 2

Korelácia T_m s antisense aktivitou 2'-modifikovaného 17 méru s 7-deoxy prerušením

2' MODIFIKÁCIA	T_m (°C)	IC_{50} (nM)
Deoxy	64.2	150
O-Pentyl	68.5	150
O-Propyl	70.4	70
O-Methyl	74.7	20
Fluoro	76.9	10

Tieto 2' modifikované oligonukleotidy boli testované na antisense aktivitu voči H-ras použitím transaktivačného reportérového génového testu popísaného v príklade 9. Všetky tieto 2'-modifikované chimérne zlúčeniny inhibovali ras expresiu, pričom 2'-fluoro 7 mérom prerušená zlúčenina bola najaktívnejšia. Aktívny bol tiež 2'-fluoro chimérny oligonukleotid s 5 merným centrálnym deoxy prerušením.

Chimérne fosforotioátové oligonukleotidy so sekv. č. 1 majúce 2'-O-propyl subsekvencie ohraničené 5 mernými alebo 7 mernými deoxy subsekvenciami, boli porovnávané s 2'-O-metyl chimérnymi oligonukleotidmi. Expresia ras v T24 bunkách bola inhibovaná tak 2'-O-metyl ako aj 2'-O-propyl chimérnymi oligonukleotidmi so 7 mernými deoxy prerušeniami a jednotnou fosforotioátovou kostrou. V prípade, že deoxy prerušenie pokleslo na 5 nukleotidov, ras expresiu inhiboval len 2'-O-metyl oligonukleotid.

Inhibícia H-ras génovej expresie v nádorových bunkách antisense oligonukleotidom: boli testované dva fosforotioátové oligonukleotidy (2502, 2503) komplementárne k ras AUG oblasti tak ako je popísané v príklade 10, spolu s chimérnymi oligonukleotidmi (4998, 5122), ktoré majú rovnakú sekvenciu a 7 merné

deoxy subsekvencie ohraničené 2'-O-metyl subsekvenciami. Tieto chimérne oligonukleotidy sú uvedené v tabuľke 3.

Tabuľka 3

Chimérne fosforotioátové oligonukleotidy majúce 2'-O-metyl konce (hrubo vytlačené) a centrálné deoxy prerušenie (AUG cieľ)

OLIGO	#DEOXY	SEKVENCIA	SEKV. Č. :
2502	20	CTTATATTCCGTCATCGCTC	2
4998	7	CTTATATTCCGTCATCGCTC	2
2503	20	TCCGTCATCGCTCCTCAGGG	3
5122	7	TCCGTCATCGCTCCTCAGGG	3

Zlúčenina 2503 inhibovala ras expresiu v T24 bunkách o 71 % a chimérna zlúčenina 4998 inhibuje mRNA ešte viac (84 % inhibícia). Zlúčenina 2502, tiež komplementárna k AUG oblasti, znižuje ras RNA hladiny o 26 % a chimérna verzia tohto oligonukleotidu (5122) vykazuje 15 % inhibíciu. Do tohto testu boli tiež zahrnuté oligonukleotidy cielené na mutantný kodón 12. Zlúčenina 2570 (sekv. č. 1) znižovala ras RNA o 82 % a 2'-O-metyl chimérna verzia tohto oligonukleotidu s 7 mérnou deoxy subsekvenciou (3985) znižovala ras RNA o 95 %.

Boli testované tiež oligonukleotidy 2570 a 2503 na určenie ich účinku na ras expresiu v HeLa bunkách, ktoré majú prirodzený typ (to znamená nie aktivovaný) H-ras kodónu 12. Hoci oba tieto oligonukleotidy inhibovali ras expresiu v T24 bunkách (majú aktivovaný kodón 12), len oligonukleotid 2503 schopný špecifickej hybridizácie s ras AUG inhiboval ras expresiu v HeLa bunkách, pretože tieto bunky nemajú aktivovaný kodón 12.

Oligonukleotid 2570, 17 mérný fosforotioátový oligonukleotid komplementárny s oblasťou kodónu 12 aktivovaného H-ras, bol testovaný na inhibíciu ras exprese (ako je popísané v príklade 8) v T24 bunkách spolu s chimérnymi fosforotioátovými 2'-O-metyl substituovanými oligonukleotidmi 3980, 3985 a 3984, ktoré majú rovnakú sekvenciu ako 2570 a majú deoxy subsekvencie 5, 7 a 9 nukleozidových jednotiek

(znázornené v tabuľke 1). Uniformný 2'-deoxy oligonukleotid 2570 a tri chimérne oligonukleotidy znižovali hladiny ras mRNA v T24 bunkách. Zlúčeniny 3985 (7 mérne deoxy prerušenie) a 3984 (9 mérne deoxy prerušenie) znižovali ras mRNA o 81 %; zlúčenina 3980 (5 mérne deoxy prerušenie) znižovala ras mRNA o 61 %. Chimérne oligonukleotidy majúce túto sekvenciu, ktoré ale majú 2'-fluoro substituované nukleozidy ohraničujúce 5 mérne deoxy (4689) alebo 7 mérne deoxy (4690) sekvencie, inhibovali ras mRNA expresiu v T24 bunkách, pričom výhodná je inhibícia so 7 merným deoxy oligonukleotidom (82 % inhibícia *versus* 63 % inhibícia 2'-fluoro chimérneho oligonukleotidu s 5 mernou deoxy subsekvenciou).

Inhibícia proliferácie nádorových buniek antisense oligonukleotidom: Bol testovaný účinok troch 17 merných oligonukleotidov s rovnakou sekvenciou (sekv. č. 1), ktorá je komplementárna s oblasťou kodónu 12 aktivovaného ras, na proliferáciu T24 nádorových buniek ako je popísané v príklade 11. Oligonukleotid 3985 je uniformný fosforotioát so 7 mernou deoxy sekvenciou ohraničenou 2'-O-metyl substituovanými nukleozidmi a 4690 je uniformný fosforotioát majúci 7 mernu deoxy subsekvenciu (prerušenie) ohraničenú 2'-fluoro substituovanými nukleozidmi, (C^FC^FA^F C^FA^FC_d C_dG_dA_d C_dG_dG_d C^FG^FC^F C^FC^F, sekv. č. 1, pričom nukleozidy označené s "f" obsahujú 2'-fluoro substituent a nukleozidy označené s "d" sú 2'-deoxy-erythro-pentofuranozylové nukleozidy). Účinok týchto oligonukleotidov na proliferáciu nádorových buniek dokázaný Northern blot analýzou dobre koreluje s ich účinkom na expresiu ras mRNA: oligonukleotid 2570 inhiboval bunkovú proliferáciu o 61 %, 2'-O-metyl chimérny oligonukleotid 3985 inhiboval bunkovú proliferáciu o 93 %.

Pri štúdiu závislosti bunkovej odpovede na dávke týchto oligonukleotidov sa ukázalo, že inhibícia je závislá na dávke v rozmedzí od 25 nM do 100 nM. Hodnoty IC₅₀ 44 nM, 61 nM a 98 nM mohli byť priradené k oligonukleotidom 4690, 3985 a 2570. Pri testovaní dávok nemal náhodný oligonukleotid žiadny účinok.

Účinok ISIS 2570 na proliferáciu bunky je špecifický vzhľadom na typ bunky. Inhibícia prolyferácie T24 buniek týmto oligonukleotidom bola štyri krát silnejšia ako inhibícia HeLa buniek rovnakým oligonukleotidom (koncentrácia oligonukleotidu bola 100 nM). ISIS 2570 je cielená na aktivovaný (mutantný) ras kodón 12, ktorý je

prítomný v T24 bunkách, ale chýba v HeLa bunkách, ktoré majú prirodzený typ kodónu 12.

Chimérne oligonukleotidy s modifikovanou kostrou: oligonukleotidy diskutované v predchádzajúcich príkladoch mali uniformné fosforotioátové kostry. 2'-modifikované chimérne oligonukleotidy diskutované vyššie nie sú aktívne ak majú uniformné fosfodiesterové kostry. Chimérny oligonukleotid (ISIS 4226) bol syntetizovaný tak, že mal 2'-O-metyl substituované oblasti ohraničujúce 5 mérne deoxy prerušenie, pričom prerušenie má P=S väzby a ohraničujúce oblasti majú P=O väzby. Bol tiež vyrobený ďalší chimérny oligonukleotid (ISIS 4223), ktorý má P=O kostru v prerušení a P=S v ohraničujúcich oblastiach. Tieto oligonukleotidy sú uvedené v tabuľke 4.

Boli tiež syntetizované oligonukleotidy, ktoré majú uniformné 2'-deoxy nukleozidové jednotky. Tieto oligonukleotidy majú fosforotioátové väzby buď s jednou fosfodiesterovou (ISIS 4248), s dvoma fosfodiesterovými (ISIS 4546), s tromi fosfodiesterovými (ISIS 4551), so štyrmi fosfodiesterovými (ISIS 4593), s piatimi fosfodiesterovými (ISIS 4606) alebo desiatimi fosfodiesterovými (ISIS 4241) väzbami v centrálnej oblasti molekuly. Tieto oligonukleotidy sú tiež uvedené v tabuľke 4.

Tabuľka 4

Oligonukleotidy s chimérnou kostrou (P=S/P=O), ktoré majú 2'-O-metyl ohraničenia (hrubo vyznačené) a centrálné deoxy prerušenie (väzby sú označené ako s (P=S) alebo ako o (P=O))

OLIGO	#	P=S	SEKVENCIA	SEKV. Č. :
2570	16		CsCsAsCsAsCsCsGsAsCsGsGsCsGsCsCsC	1
4226	5		CoCoAoCoAoCsCsGsAsCsGoGoCoGoCoCoC	1
4233	11		CsCsAsCsAsCoCoGoAoCoGsGsCsGsCsCsC	1
4248	15		CsCsAsCsAsCsCsGsAoCsGsGsCsGsCsCsC	1
4546	14		CsCsAsCsAsCsCsGoAoCsGsGsCsGsCsCsC	1
4551	13		CsCsAsCsAsCsCsGoAoCoGsGsCsGsCsCsC	1
4593	12		CsCsAsCsAsCsCoGoAoCoGsGsCsGsCsCsC	1

4606	11	CsCsAsCsAsCsCoGoAoCoGoGsCsGsCsCsC	1
4241	6	CsCsAsCoAoCoCoGoAoCoGoGoCoGsCsCsC	1

Oligonukleotidy boli inkubované v hrubých extraktoch pri 37 °C, aby sa určila ich senzitivita k nukleázovej degradácii ako je popísané v Dignam et al., *Nucleic Acids Res.* 1983, 11, 1475-1489. Oligonukleotid (4233) s 5 mernou fosfodiesterovou centrálnou oblasťou a fosforotiovát/2'-O-metyl substituovanými ohraničujúcimi oblasťami mal $T_{1/2}$ 7 hodín. Oligonukleotid s 5 mernou fosforotioátovou centrálnou oblasťou a fosforotiovát/2'-O-metyl substituovanými ohraničujúcimi oblasťami mal $T_{1/2}$ 30 hodín. V sade oligonukleotidov, ktoré majú 1 až 10 fosfodiesterových väzieb, bol oligonukleotid (4248) s jednou fosfodiesterovou väzbou rovnako stabilný voči nukleázam ako uniformný fosforotioátový oligonukleotid ISIS 2570, pričom nevykazoval žiadnu degradáciu po 5 hodinách v extrakte HeLa buniek. Oligonukleotidy s 2-, 3- a 4-mernou fosfodiesterovou centrálnou oblasťou mali $T_{1/2}$ približne 5,5 hodiny, 3,75 hodiny, a 3,2 hodiny; oligonukleotidy s 5- a 10-mernou fosfodiesterovou centrálnou oblasťou mali $T_{1/2}$ 1,75 hodiny a 0,9 hodiny.

Antisense aktivita chimérnych oligonukleotidov s modifikovanou kostrou: Antisense aktivita navyžaduje uniformnú fosforotioátovú kostru. V ras-luciferázovom reporterovom systéme bol testovaný účinok ISIS 4226 a ISIS 4233 spolu s ISIS 2570 (uniformný fosforotioát/uniformný deoxy), ISIS 3980 (uniformný fosforotioát, 2'-O-metyl ohraničujúce oblasti s deoxy centrálnou oblasťou) a ISIS 3961 (uniformný fosfodiester, 2'-O-metyl ohraničujúce oblasti s deoxy centrálnou oblasťou), na ras expresiu. Všetky oligonukleotidy, ktoré majú P=S (to znamená rezistentnú voči nukleáze) centrálnu oblasť, inhibovali ras expresiu. Bola tiež testovaná aktivita dvoch uniformných 2'-deoxy oligonukleotidov, ktoré majú fosforotioátové väzby obsahujúce buď jednu fosfodiesterovú (ISIS 4248) alebo 10 fosfodiesterových väzieb (ISIS 4241) v centre molekuly. Oligonukleotid obsahujúci jednu P=O bol práve tak aktívny ako oligonukleotid obsahujúci len fosforotioátové väzby (uniformný P=S oligonukleotid), zatiaľ čo rovnaký oligonukleotid obsahujúci 10 P=O väzieb bol úplne neaktívny.

Boli vyrobené fosforotioátové chimérne oligonukleotidy so sekvenciou č. 1, ktoré majú fosforotioátovú kostru v 7 mérnej centrálnej oblasti (prerušenie) a

fosfodiesterové väzby v ohraničujúcich oblastiach, ktoré boli buď 2'-O-metyl alebo 2'-O-propyl substituované. Oligonukleotidy s 2'-O-propyl substituovanými fosfodiesterovými ohraničujúcimi oblasťami boli schopné inhibovať ras expresiu.

Príklad 8

Krivky teploty topenia

Krivky závislosti absorbie na teplote boli merané pri 260 nm použitím Gilford 260 spektrofotometra riadeného počítačom IBM PC a Gilford Response II spektrofotometrom. Tlmivý roztok obsahoval 100 mM Na⁺, 10 mM fosfát a 0,1 mM EDTA, pH 7. Koncentrácia oligonukleotidu bola 4 μ M z každého vlákna, a bola určená z absorbie pri 85 °C a extinkčných koeficientov vypočítaných podľa Pulglisi a Tinoco, *Methods in Enzymol.*, 1989, 180, 304-325. Hodnoty T_m , voľných energií vytvárania duplexu a asociačných konštánt boli získané z údajov zodpovedajúcich dvom modelom skupenstva s lineárnymi zostupnými základnými čiarami, Petersheim, M. a Turner, D.H., *Biochemistry*, 1983, 22, 256-263. Uvádzané parametre sú priemerom aspoň troch experimentov. Pri niektorých oligonukleotidoch bola hodnota voľnej energie vytvárania duplexu, získaná tiež z grafov T_m^{-1} vs $\log_{10}$ (koncentrácie), Borer P.N., Dengler, B., Tinoco, I., Jr., a Uhlenbeck, O.C., *J. Mol. Biol.*, 1974, 86, 843-853.

Príklad 9

ras Transaktivácia reporterového génového systému

Expresný plazmid pSV2-oli, obsahujúci cDNA inzert s aktivovaným (kodón-12, GGC→GTC) H-ras génom pod kontrolou konštitutívneho SV40 promótora, bol darom od Dr. Bruna Tocque (Rhône-Poulenc Sante, Vitry, France). Tento plazmid bol použitý ako templát na konštrukciu H-ras expresného plazmidu regulovaného steroidom indukateľným MMTV promátorom z vírusu myšieho prsného nádora, použitím PCR. Aby sa získala H-ras kódujúca sekvencia, bola pomocou PCR amplifikovaná 570 bp kódujúca oblasť H-ras génu. Na uľahčenie klonovania boli navrhnuté PCR primery s unikátnymi miestami pre restriktčné endonukleázy v ich 5' oblastiach. Pred klonovaním boli PCR produkty obsahujúce kódujúce oblasti H-ras

onkogénu s mutaovaným kodónom 12, gélovo purifikované, štiepené a znova gélovo purifikované. Koštrukcia bola ukončená klonovaním inzertu do expresného plazmidu pMAMneo (Clontech Laboratories, CA).

Na detekciu ras expresie bol použitý ras-responzívny reporterový gén pRDO53, Owen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87, 3866-3870.

Príklad 10

In vivo Northern blot analýza ras expresie

Línia buniek ľudského nádora močového mechúra T24 bola získaná z American Type Culture Collection (Rockville MD). Bunky rástli v McCoy's 5A médiu s L-glutamínom (Bibco BRL, Gaithersburg MD), doplnenom s 10 % fetálnym hovädzím sérom, ktoré bolo inaktivované zahriatím, a 50 U/ml penicilínu a 50 U/ml streptomycínu. Bunky boli vysiate na 100 mm platne. Oligonukleotidom boli ošetrované, keď porývali platňu na 70 %. Platne boli premyté s 10 ml predhriateho PBS a 5 ml OptiMEM - médiom so zníženým obsahom séra obsahujúcim 2,5 µl DOTMA. Potom boli do žiaducej koncentrácie pridané oligonukleotidy. 4 hodiny po ošetrovaní bolo médium nahradené McCoy médiom. 48 hodín po ošetrovaní oligonukleotidom boli bunky pozbierané a bola z nich izolovaná RNA použitím štandardnej CsCl purifikačnej metódy. Kingston, R.E., v Current Protocols in Molecular Biology, (F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.A. Smith, J.G. Seidman a K. Strahl eds.), John Wiley and Sons, NY.

Bunková línia ľudského epitelového karcinómu HeLa 229 bola získaná zo zbierky American Type Culture Collection (Bethesda, MD). HeLa bunky boli udržiavané v monovrstve v 6-jamkových platničkách v Dulbeccovom modifikovanom Eaglovom médiu (DMEM) doplnenom s 10 % fetálnym boviným sérom a 100 U/ml penicilínu. Ošetrovanie oligonukleotidmi a izolácia RNA boli v podstate také isté ako bol popísané vyššie pre T24 bunkách.

Northern hybridizácia: 10 µg z každej RNA bolo podrobených elektroforéze na 1,2 % agarózovom/formaldehydovom géli a cez noc prenášaných na GeneBind 45 nylonovú membránu (Pharmacia LKB, Piscataway, NJ) použitím štandardných metód. Kingston, R.E., v Current Protocols in Molecular Biology, (F.M. Ausubel, R.

Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.A. Smith, J.G. Seidman a K. Strahl eds.), John Wiley and Sons, NY. RNA bola pripevnená na membránu UV sprostredkovanými väzbami. Použitím Prime gény označujúceho kitu (Promega, Madison WI) boli syntetizované dvojvláknové sondy značené ^{32}P . Ras sondou bol Sall-NheI fragment cDNA klonu z mRNA aktivovaného (mutantného) H-ras, ktorý má GGC naGTC mutáciu v kodóne 12. Kontrolnou sondou bol G3PDH. Bloty boli prehybridizované 15 minút pri 68 °C s QuickHyb hybridizačným roztokom (Stratagene, La Jolla, CA). Bola pridaná zahriatim denaturovaná rádioaktívna sonda ($2,5 \times 10^6$ impulzov/2 ml hybridizačného roztoku) zmiešaná s 100 μl 10 mg/ml DNA z lososích ikier a membrána bola hybridizovaná 1 hodinu pri 68 °C. Bloty boli premývané dva krát po 15 minút pri laboratórnej teplote v 2x SSC/0,1 % SDS a jeden krát počas 30 minút pri 60 °C v 0,1 x SSC/0,1 % SDS. Bloty boli podrobené autorádiografii a intenzita signálu sa kvantifikovala použitím ImageQuuant PhosphorImagera (Molecular Cynamics, Sunnyvale, CA). Northern bloty boli najprv hybridizované s ras sondou, potom boli vyvolané prúžky 15 minútovým povarením v 0,1 x SSC/0,1 % SDS a znova hybridizované s kontrolnou G3PDH sondou, aby sa skontrolovalo správne naloženie vzoriek.

Príklad 11

Inhibícia expresie PKC- α mRNA chimérnymi (deoxy prerušenými) 2'-O-metyl oligonukleotidmi

Oligonukleotidy so sekvenciou č. 4 boli syntetizované ako uniformné fosforotioátové chimérne oligonukleotidy, ktoré majú deoxy centrálnu oblasť alebo deoxy prerušenie rôznej dĺžky, ktoré je ohraničené 2'-O-metyl substituovanými sekvenciami. Tieto oligonukleotidy (v koncentrácii 500 nM) boli testované z hľadiska účinku na hladiny PKC- α mRNA Northern blot analýzou. Vo všetkých prípadoch vykazovali maximálne zníženie hladín PKC- α mRNA (oboch transkriptov) deoxy prerušenia s 8 a viach nukleozidmi. Oligonukleotidy s deoxy prerušením v dĺžke 4 nukleozidov vykazovali zníženie PKC- α mRNA o približne 83 % a oligonukleotidy s deoxy prerušením v dĺžke 6 a viac nukleozidov vykazovali skoro úplné zníženie PKC- α mRNA.

2'-O-metyl substituované chimérne oligonukleotidy so 4- a 6-mérnymi deoxy prerušeniami mali IC_{50} redukcie PKC- α mRNA (koncentrácia oligonukleotidu postačujúca na 50 % zníženie hladín PKC- α mRNA) od 200 nM do 250 nM, tak isto ako uniformný deoxy oligonukleotid (všetky sú uniformné fosforotioáty). 2'-O-metyl substituovaný chimérny oligonukleotid s 8-mérnym deoxy prerušením mal IC_{50} približne 85 nM.

Z hľadiska schopnosti znížiť hladiny PKC- α mRNA bolo porovnávaných niekoľko vyriantov tohto chimérneho oligonukleotidu (sekv. č. 4). Tieto oligonukleotidy sú uvedené v tabuľke 5.

Tabuľka 5

Chimérne 2'-O-metyl/deoxy P=S oligonukleotidy; 2'-O-metyl je hrubo vytlačený; s = P=S väzba a o = P=O väzba

OLIGO	SEKVENCIA	SEKV. Č. :
3522	AsAsAsAsCsGsTsCsAsGsCsCsAsTsGsGsTsCsCsC	4
5352	AsAsAsAsCsGsTsCsAsGsCsCsAsTsGsGsTsCsCsC	4
6996	AoAoAoAoCoGsTsCsAsGsCsCsAsTsGoGoToCoCoC	4
7008	AsAoAoAoCoGsTsCsAsGsCsCsAsTsGoGoToCoCsC	4
7024	AsAoAoAoCoGsToCsAoGsCoCsAsTsGoGoToCoCsC	4

Účinok týchto oligonukleotidov na hladiny PKC- α mRNA je znázornený na obrázku 3. Redukciu PKC- α mRNA vykazujú oligonukleotidy 7008, 3522 a 5352, pričom najaktívnejším je 5353.

Bola syntetizovaná séria 2'-O-propyl chimérnych oligonukleotidov majúcich sekvenciu č. 4. Tieto oligonukleotidy sú znázornené v tabuľke č. 6.

Tabuľka 6

Chimérne 2'-O-propyl/deoxy P=S oligonukleotidy; 2'-O-propyl je hrubo vytlačený; s = P=S väzba a o = P=O väzba

OLIGO	SEQUENCIA	SEKV. Č.:
7199	AsAsAsAsCsGsTsCsAsGsCsCsAsTsGsGsTsCsCsC	4
7273	AoAoAoAoCoGsTsCsAsGsCsCsAsTsGoGoToCoCoC	4
7294	AsAoAoAoCoGsTsCsAsGsCsCsAsTsGoGoToCoCsC	4
7295	AsAoAoAoCoGsToCsAoGsCoCsAsTsGoGoToCoCsC	4

Tieto 2'-O-propyl chimérne oligonukleotidy boli porovnávané s 2'-O-metyl chimérnymi oligonukleotidmi. Z hľadiska znižovanie hladín PKC- α mRNA boli oligonukleotidy 7273 a 7294 aktívnejšie ako ich 2'-O-metyl náprotivky. To je znázornené na obrázkoch 4 a 5.

Príklad 13

Ďalšie oligonukleotidy, ktoré znižujú expresiu PKC- α mRNA

Boli navrhnuté a syntetizované ďalšie fosforotioátové oligonukleotidy, ktoré boli mierené na 3' netranslatovanú oblasť ľudskej PKC- α . Tieto sekvencie sú uvedené v tabuľke 7.

Tabuľka 7

Chimérne 2'-O-propyl/deoxy P=S oligonukleotidy cielené na PKC- α 3'-UTR; hrubo je vytlačený 2'-O-propyl; s = P=S väzba a o = P=O väzba

OLIGO	SEKVENCIA	SEKV. Č.:
6632	TsTsCs TsCsGs CsTsGs GsTsGs AsGsTs TsTsC	5
6653	TsTsCs TsCsGs CsTsGs GsTsGs AsGsTs TsTsC	5
6665	ToToCo TsCsGs CsTsGs GsTsGs AsGsTo ToToC	5
7082	TsCsTs CsGsCs TsGsGs TsGsAs GsTsTs TsC	6
7083	TsCsTs CsGsCs TsGsGs TsGsAs GsTsTs TsC	6
7084	ToCoTo CsGsCs TsGsGs TsGsAs GsToTo ToC	6

Z hľadiska znižovania hladín PKC- α mRNA sú najaktívnejšie oligonukleotidy 6632, 6653, 7082 a 7083.

Príklad 14

Účinok oligonukleotidov majúcich sekvenciu č. 30 na hladiny PKC- α mRNA

Bunky A549 boli ošetrované s fosforotioátovými oligonukleotidmi s koncentráciou 500 nM počas 4 hodín v prítomnosti kationických lipidov DOTMA/DOPE, premyté a bolo im umožnené regenerovať počast' nasledujúcich 20 hodín. Bola extrahovaná celková RNA a 20 μ g z každej bolo nanosených na 1,2 % géli a prenesených na nylonové membrány. Tieto bloty boli overované s 32 P rádioaktívne značenou PKC- α cDNA sondou a potom boli vyvolané pásiky a vzorky boli opäť overované rádioaktívne značenou G3PDH sondou, aby sa potvrdilo rovnomerné naloženie RNA. Každý oligonukleotid (3520 - sekv. č. 31, 3521 - sekv. č. 30, 3522 - sekv. č. 4 a 3527 - sekv. č. 32) bol použitý duplicitne. Posudzované a kvantifikované s PhosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA) boli dva hlavné PKC- α transkripty (8,5 kb a 4,0 kb). ISIS 3521 (sekv. č. 30) vykazoval približne 80 % redukciu menšieho transkriptu a viac ako 90 % redukciu väčšieho transkriptu.

Boli syntetizované dva oligonukleotidy, ktoré majú sekvenciu č. 30 a 8-mérnu centrálnu deoxy oblasť ohraničenú z každej strany nukleozidmi majúcimi 2'-OCH₂CH₂OCH₃ modifikáciu. Na uľahčenie syntézy bol posledný nukleozid deoxynukleozid. Tieto zlúčeniny uvedené v tabuľke 8 sa navzájom líšia, ISIS 9606 má uniformnú fosforotioátovú kostru, zatiaľ čo ISIS 9605 má fosforotioátovú kostru v centrálnej oblasti (kostrové väzby 7 až 14) a fosfodiesterovú kostru v ohraničujúcich oblastiach. Tieto oligonukleotidy boli testované z hľadiska ich schopnosti inhibovať expresiu PKC- α mRNA v A549 bunkách v porovnaní s fosforotioátovou zlúčeninou ISIS 3521. Výsledky sú znázornené na obrázkoch 6a a 6b. Pre tieto zlúčeniny boli vypočítané IC₅₀ (koncentrácie oligonukleotidy zabezpečujúce 50 % inhibíciu). Fosforotioátová zlúčenina ISIS 3521 vykazovala IC₅₀ približne 170 nM. Obe metoxyetoxy zlúčeniny, ISIS 9605 a 9606, vykazovali IC₅₀ približne 25 nM. Toto 6 až 7 násobné zvýšenie potencie metoxyetoxy modifikáciou indikovalo prekvapujúcu aktivitu. Metoxyetoxy zlúčeniny 9605 a 9606 sú výhodnými kvôli ich extrémne nízkym IC₅₀.

Tabuľka 8

Oligonukleotidy majúce sekv. č. 30

ISIS #	SEKVENCIA
3521	GsTsTsCsTsCsGsCsTsGsGsTsGsAsGsTsTsTsCsA
9605	GoToToCoToCsGsCsTsGsGsTsGsAsGoToToToCoA
9606	GsTsTsCsTsCsGsCsTsGsGsTsGsAsGsTsTsTsCsA
12723	GoToToCoToCsGsCsTsGsGsTsGsAsGoToToToCoA

hrubo vytlačené je 2'-OCH₂CH₂OCH₃

s = fosforotioátová (P=S) väzba

o = fosfodiesterová (P=O) väzba

Príklad 15

Účinok 2'-metoxyetoxy oligonukleotidov 12723 na rast ľudských nádorov hrubého čreva Colo-205 v nahých myšiach

Podkožnou injekciou 5×10^6 Colo-205 buniek bol vnesený xenoštep subkutánneho ľudského Colo-205 karcinómu hrubého čreva do nahej myši. Myši boli ošetrované s ISIS 12723 (sekv. č. 30), oligonukleotidom, ktorý má 8-mérnu deoxy centrálnu oblasť ohraničenú z každej strany 6-mérnou subsekvenciou majúcou 2'-OCH₂CH₂OCH₃ modifikáciu, pričom oligonukleotid má fosforotioátovú kostru v centrálnej oblasti (kostrové väzby 7 až 14) a fosfodiesterovú väzbu v ohraničujúcich oblastiach, alebo ISIS 3521 (sekv. č. 30) uniformným fosforotioátom. Nukleotidy sa podávali intravenózne jedenkrát denne v dávkach po 0,006, 0,06, 0,6 alebo 6,0 mg/kg. V tejto štúdii ISIS 3521 inhiboval rast nádora o viac ako 95 % v porovnaní s kontrolou v ktorej bol ako placebo podávaný fyziologický roztok (obrázok 7b) a ISIS 3521 inhiboval rast nádora o viac ako 83 % v porovnaní s kontrolou v ktorej bol ako placebo podávaný fyziologický roztok (obrázok 7a). Takže výhodnou je metoxyetoxy zlúčenina ISIS 12723.

Príklad 16

Inhibícia expresie c-raf chimérnymi oligonukleotidmi

Pomocou Genbank c-raf sekvencie HUMRAFR (Genbank zoznam x 03484) boli navrhnuté chimérne oligonukleotidy so sekvenciou č. 7. Tieto boli syntetizované a testované z hľadiska inhibície expresie c-raf mRNA v T24 bunkách nádoru močového mechúra pomocou Northern blot analýzy. Tieto oligonukleotidy majú centrálnu "prerušenú" oblasť 6, 8 alebo 10 deoxy nukleozidov ohraničenú dvoma oblasťami 2'-O-metyl modifikovaných nukleozidov a sú uvedené v tabuľke 9. Kostry boli uniformne fosforotioátové. V Northern blot analýze, ktorá je popísaná v príklade 20, vykazovali všetky tieto oligonukleotidy (ISIS 6720, 6-mérne deoxy prerušenie; ISIS 6717, 8-mérne deoxy prerušenie; ISIS 6729, 10-mérne deoxy prerušenie) viac ako 70 % inhibíciu expresie c-raf mRNA v T24 bunkách. Tieto oligonukleotidy sú výhodné. Oligonukleotid s 8-mérnym deoxy prerušením (6717) vykazoval viac ako 90 % inhibíciu a je ešte výhodnejším.

Tabuľka 9

Chimérne 2'-O-metyl P=S deoxy "prerušené" oligonukleotidy; hrubo je vytlačený 2'-O-metyl

OLIGO	SEKVENCIA	Cieľové miesto	SEKV. Č.:
6720	TCCCGCCTGTGACATGCATT	3'UTR	7
6717	TCCCGCCTGTGACATGCATT	3'UTR	7
6729	TCCCGCCTGTGACATGCATT	3'UTR	7

Boli syntetizované ďalšie chimérne oligonukleotidy s jednou alebo viacerými 2'-O-metyl modifikáciami a uniformnými fosforotioátovými kostrami. Tieto sú uvedené v tabuľke 10. Všetky sú fosforotioáty; hrubo sú označené 2'-O-metyl modifikované oblasti.

Tabuľka 10

Chimérne 2'-O-metyl P=S c-raf oligonukleotidy

OLIGO	SEKVENCIA	Cieľové miesto	SEKV. Č.:
7848	TCCTCCTCCCCGCGGCGGGT	5'UTR	8
7852	TCCTCCTCCCCGCGGCGGGT	5'UTR	8
7849	CTCGCCCGCTCCTCCTCCCC	5'UTR	9

7851	CTCGCCCGCTCCTCCTCCCC	5' UTR	9
7856	TTCTCGCCCGCTCCTCCTCC	5' UTR	10
7855	TTCTCGCCCGCTCCTCCTCC	5' UTR	10
7854	TTCTCCTCCTCCCCTGGCAG	3' UTR	11
7847	CTGGCTTCTCCTCCTCCCCCT	3' UTR	12
7850	CTGGCTTCTCCTCCTCCCCCT	3' UTR	12
7853	CCTGCTGGCTTCTCCTCCTC	3' UTR	13
9355	CGGGAGGCGGTCACATTCGG	5' UTR	19

Výhodnými sú ISIS 7848, 7849, 7851, 7856, 7855, 7854, 7857 a 7853, ktoré keď boli testované z hľadiska ich schopnosti inhibovať c-raf mRNA Northern blot analýzou, vykazovali viac ako 70 % inhibíciu. Z nich sú ešte výhodnejšie 7851, 7855, 7847 a 7853, ktoré vykazovali viac ako 90 % inhibíciu.

Boli pripravené a testované ďalšie chimérne oligonukleotidy s rôznymi 2' modifikáciami. Sú uvedené v tabuľke 11. Všetky sú fosforotioáty; hrubo sú označené 2' modifikované oblasti.

Tabuľka 11

Chimérne 2'-modifikované P=S c-raf oligonukleotidy

OLIGO	SEKVENCIA	CIEĽOVÉ MIESTO	MODIF. SEKV.	Č.:
6720	TCCCGCCTGTGACATGCATT	3' UTR	2'-O-Me	7
6717	TCCCGCCTGTGACATGCATT	3' UTR	2'-O-Me	7
6729	TCCCGCCTGTGACATGCATT	3' UTR	2'-O-Me	7
8097	TCTGGCGCTGCACCACTCTC	3' UTR	2'-O-Me	14
9270	TCCCGCCTGTGACATGCATT	3' UTR	2'-O-Pr	7
9058	TCCCGCCTGTGACATGCATT	3' UTR	2'-F	7
9057	TCTGGCGCTGCACCACTCTC	3' UTR	2'-F	14

Z týchto sú výhodné oligonukleotidy 6720, 6717, 6729, 9270 a 9058. Ešte výhodnejšie sú oligonukleotidy 6717, 6729, 9270 a 9058.

Priklad 17

Účinok 2'-metoxyetoxy oligonukleotidov so sekvenciou č. 7 na expresiu c-raf mRNA

Boli syntetizované dva oligonukleotidy zo sekvenciou č. 7 a centrálnou subsekvenciou s 8-nukleozidovými jednotkami, ktorá obsahuje 2'-deoxy-erythro-pentofuranozylové sacharidové časti ohraničené z každej strany subsekvenciami s 6-nukleozidovou jednotkou, ktorá má 2'-O-CH₂-CH-O₂-CH modifikácie. Tieto zlúčeniny sa navzájom líšia v tom, že ISIS 10755 (tiež známa ako CIBA 1440) má uniformnú fosforotioátovú kostru; zatiaľ čo ďalšia, ISIS 10754 (tiež známa ako CIBA 1439 alebo CGP 69845) má fosforotioátové väzby v centrálnej oblasti (väzby 7 až 14) a fosfodiesterové väzby v ohraničujúcich oblastiach. Tieto oligonukleotidy boli testované z hľadiska ich schopnosti inhibovať expresiu c-raf mRNA v T24 bunkách. Boli vypočítané hodnoty IC₅₀ (koncentrácia oligonukleotidu, ktorá zabezpečí 50 % inhibíciu) a sú uvedené v tabuľke 12 spolu s hodnotami T_m, ktoré poukazujú na afinitu týchto oligonukleotidov k ich komplementu. Tak ISIS 10755 ako aj ISIS 10754 sú výhodnými, keďže majú extrémne nízke IC₅₀. Oligonukleotidy použité v súlade s vynálezom môžu byť vyrobené rutinne, použitím dobre známej techniky syntézy na pevnej fáze. (Martin, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504.) Vybavenie na takúto syntézu je predávané viacerými dodávateľmi vrátane Applied Biosystems. Na túto syntézu môžu byť tiež použité ďalšie prostriedky známe zo stavu techniky.

Tabuľka 12

Antisense aktivita T24 buniek a T_m

ISIS #	Modifikácia	T _m (°C)	IC ₅₀ (nM)	SEKV. Č.:
5132	deoxy/P=S	62.2	125	7
10755	2'-O-CH ₂ CH ₂ OCH ₃ /P=S	76.1	20	7
10754	2'-O-CH ₂ CH ₂ OCH ₃ / P=S/P=O	77.5	20	7

Príklad 18

Účinok ISIS 5132 a CGP 69845 na nádory ľudského pľúcneho adenokarcinómu

Do samca nahej myši typu Balb/c bol vnesený subkutánný xenoštep ľudského A549 pľúcneho adenokarcinómu. Tento štep bol ošetrovaný s ISIS 5132 (sekv. č. 7) alebo s metoxyetoxu ($2'\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_3$) verziou sekvencie č. 7 (CGP 69845), pričom oba boli podávané denne, intravenóznou injekciou v dávkach v rozmedzí od 0.006 do 6,0 mg/kg. ISIS 5132 znižoval veľkosť nádoru vo všetkých dávkach, od dávky závislým spôsobom, ako je znázornené na obrázkoch 6a a 6b. Metoxyetoxu ($2'\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_3$) oligonukleotid, CGP 69845, mal podobný účinok ako ISIS 5132 pri nižších dávkach a ešte vyššie inhibičné účinky ako ISIS 5132 pri dávke 6,0 mg/kg.

Príklad 19

A549 xenoštep

Do vnútorného stehna nahej myši boli subkutánne implantovaných 5×10^6 A549 buniek. Oligonukleotidy (ISIS 5132 a CGP 69845, tiež známy ako ISIS 10754) rozsuspendované vo fyziologickom roztoku boli podávané raz denne intravenóznou injekciou v dávkach v rozmedzí od 0,006 do 6,0 mg/kg. Výsledné nádory boli merané po 9, 12, 17 a 21 dňoch a boli vypočítané objemy nádorov.

Príklad 20

Northern blot analýza inhibície expresie c-raf

Línia buniek ľudského nádora močového mechúra T24 bola získaná z American Type Culture Collection (Rockville MD). Bunky rástli v McCoy's 5A médiu s L-glutamínom (Bibco BRL, Gaithersburg MD), doplnenom s 10 % fetálnym hovädzím sérom, ktoré bolo inaktivované zahriatím, a 50 U/ml penicilínu a 50 U/ml streptomycínu. Bunky boli vysiate na 100 mm platne. Oligonukleotidom boli ošetrované, keď porývali platinu na 70 %. Platne boli premyté s 10 ml predhriateho PBS a 5 ml OptiMEM - médiom so zníženým obsahom séra obsahujúcim 2,5 μ l DOTMA. Potom bol do žiaducej koncentrácie pridaný oligonukleotid s lipofektínom. 4 hodiny po ošetrovaní bolo médium nahradené McCoy médiom. Po 24 až 72 hodinách po ošetrovaní oligonukleotidom boli bunky pozbierané a bola z nich izolovaná RNA použitím štandardnej CsCl purifikačnej metódy. Kingston, R.E., v Current Protocols

in Molecular Biology, (F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.A. Smith, J.G. Seidman a K. Strahl eds.), John Wiley and Sons, NY. Celková RNA bola izolovaná centrifugáciou bunkových lyzátov tlmenej CsCl. RNA vzorky boli podrobené elektroforéze na 1,2 % agaróza-formaldehydových géloch a prenesené na hybridizačné membrány kapilárnou difúziou počas 12 až 14 hodín. RNA bola upevnená na membránu väzbami sprostredkovanými UV svetlom v Stratalinker (Stratagene, La Jolla, CA) a hybridizovaná s náhodne primovanou ^{32}P označenou c-raf cDNA sondou (získanou z ATCC) alebo s G3PDH sondou ako kontrolou. RNA bola kvantifikovaná použitím Phosphorimagera (Molecular Dynamix, Sunnyvale, CA).

Príklad 21

Oligonukleotidová inhibícia expresie rev génu

Chimérne oligonukleotidy, ktoré boli použité v tomto experimente sú uvedené v tabuľke 13 nižšie.

Tabuľka 13

Chimérne 2'-O-propyl/deoxy P=S oligonukleotidy cielené na HIV rev gén

2'-O-propyl je vytlačený tučne; s = P=S väzba; o = P=O väzba

OLIGO	SEKVENCIA	SEKV. ID Č:
8907	UoAoGoGoAoGoAsUsGsCsCsUsAsAoGoGoCoUoUoU	20
8908	GoCoUoAoUoGoUsCsGsAsCsAsCsCoCoAoAoUoUoC	21
8909	CoAoUoAoGoGoAsGsAsUsGsCsCsUoAoAoGoGoCoT	22

Transfekčný a luciferázový test: 3T3 bunky boli udržiavané v DMEM s glukózou, L-glutamínom, pyruvátom sodným a 10 % fetálnym bovinným sérom (GIBCO). Vo všetkých experimentoch boli bunky predchádzajúcu noc nasadené do 6-jamkových platní (Falcon) v hustote 75 000 buniek na jamku. Transfekcie boli uskutočňované použitím štandardnej CaPO_4 metódy. Pre každý súbor replík sa prepitovalo 15 $\mu\text{g/ml}$ pSG5/rev plazmidu, 18 $\mu\text{g/ml}$ pHIVenu-luc a 2 $\mu\text{g/ml}$ Rep 6 a z toho bolo 200 μl nakvapkaných do každej jamky. Precipitát sa inkuboval s bunkami 7 hodín pri 37 °C. Médium bolo potom aspirované, bunky boli premyté jeden krát s

PBS, a na inkubáciu cez noc bolo dodané čerstvé kompletne médium. Po inkubácii bolo médium odstránené, bunky boli premyté s 2 ml OPTIMEM (GIBCO) a 1 ml OPTIMEM, ktorý obsahoval 2,5 µg/ml lipofektínu (GIBCO-BRL) a bol pridaný oligonukleotid. Zmes bola inkubovaná 4 hodiny pri 37 °C a v tom bode boli bunky aspirované a bolo pridané kompletne médium. Dve hodiny po tomto ošetrovaní bolo do všetkých jamiek pridaných 0,2 µM/ml dexametazónu (Sigma), aby sa umožnila indukcia MMTV promótoru pHIVenu-luc.

Luciferázový test bol uskutočňovaný o 24 hodín nasledovne: Jamky boli dva krát premyté s PBS a bunky boli zozbierané zoškrabovaním do 200 µl lyzačného tlmivého roztoku (1 % Triton, 25 mM glycyglycín, pH 7,8, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA a 1 mM DTT). Lyzát bol vyčísrený mikrocentrifugáciou počas 5 minút pri 11 500 rpm v chlade. 100 µl lyzačného tlmivého roztoku bolo potom na mikrotitračnej platničke spojených s testovacím tlmivým roztokom (25 mM glycyglycín, pH 7,8, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA, 15 mM fosforečnen draselný, pH 7,8, 1 mM DTT a 7,5 mM ATP). Luc detekcia bola uskutočňovaná použitím mikrotitračného luminiscenčného čítača (Dynatech Laboratories). Reakcia bola odštartovaná injekciou 50 µl 1 x luciferázového roztoku (Sigma). Pred použitím bol 1 x roztok nariedený z 10 x štoku v luciferázovom tlmivom roztoku (25 mM glycyglycín, pH 7,8, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA a 4 mM DTT). Vzorky boli merané po 20 sekundách. Kinetiky svetelnej emisie luc svätojánskej mušky sa vyznačujú bleskovou periódou trvajúcou niekoľko sekúnd, po ktorej nasleduje perióda svetelnej emisie s nižšou intenzitou trvajúca niekoľko minút.

Syntéza Rev a PRE RNA: pSG%-Rev obsahuje Rev gén, ktorý nasleduje po T7 promótoze. Ako DNA templát na transkripciu s T7 RNA polymerázou bol použitý pSG5-Rev lineárnaizovaný BglII. Templát na produkciu PRE RNA bol vyrobený PCR. Na RNA syntézy boli použité DNA templáty v koncentrácii od 0,2 do 1,0 mg/ml s 5 mM ATP, CTP a GTP, 0,5 mM UTP, 10 mM DTT, 40 mM Tris-HCl, pH 7,5, 6 mM MgCl₂, 4 mM spermidínu, 500 U/ml RNAzínu s 20 U/µl, 2500 µCi/ml α³²P UTP s 10 mCi/ml a 100 U/ml T7 RNA polymerázy. Reakčná zmes bola inkubovaná 1 hodinu pri 37 °C. Transkripčná reakcia bola ukončená pridaním formamidového nanášacieho tlmivého roztoku a bola zbehnúť na denaturačnom polyakrylamidovom

géli obsahujúcom 8 M močovinu. RNA bola eluovaná z gélu postupom podľa Schwartz et al. (Gene, 1990, 88, 197).

Príklad 22

Imunotest na antivirálnu selekciu

NHDF bunky boli nasadené do 96 jamkových kultivačných platní v hustote 15 000 buniek na jamku v FGM bez séra. Vzniknuté monovrstvy boli pred infekciou vopred cez noc ošetrené s oligonukleotidom v FGM. Po predošetrení boli bunky trikrát prepláchnuté s čerstvým predhriatym FGM, a bol pridaný vírus v množstve 100 μ l FGM na jamku tak, aby sa dosiahla MOI 0,05 PFU/bunku. Po 2 hodinách inkubácie pri 37 °C bol vírus odstránený a bolo pridané čerstvé médium (100 μ l/jamku) obsahujúce oligonukleotid. 2 dni po infekcii bolo médium zamenené za čerstvé médium obsahujúce oligonukleotid, a 6 dní po infekcii boli bunky fixované v absolútnom etanole a vysušené v príprave na protilátkové farbenie. V niektorých testoch bol použitý modifikovaný protokol, v ktorom FGM bolo nahradené s nízkymi hladinami FBS (0,2 %) a inkubačná doba po infekcii bola skrátená zo 6 na 3 dni. Tento kratší test eliminoval potrebu vymieňať médium 2 dni po infekcii. Oba testy mali porovnateľné výsledky pre koncentrácie s 50 % účinnosťou (EC₅₀).

Fixované bunky boli blokové v roztoku PBS obsahujúcom 2 % bovinného sérového albumínu (BSA), a boli pridané myšie monoklonálne protilátky (1H10, dodané Eisai Co., Ltd., Japonsko) v riedení 1:2000 v PBS-1% BSA. 1H10 protilátka rozoznáva veľký neskorý HSMV polypeptid s veľkosťou približne 65 kDa. Detekcia naviazanej monoklonálnej protilátky bola uľahčená biotinylovaným kozím antimyším imunoglobínom G ab_d s cez streptavidín napojenú β -galaktozidázu (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD). Ako substrát pre β -galaktozidázu bol použitý chlorofenolový červený β -D-galaktopyranozid, a aktivita bola určovaná meraním optickej hustoty pri 575 nm v každej jamke s BioTex modelom EL312e mikroplošného čítača.

Oligonukleotidy použité v tomto teste sú uvedené v tabuľke 14 nižšie.

Tabuľka 14

Inhibícia CMV replikácie chimérnym 2'-O-metyl P=S oligonukleotidmi

Hrubo je vytlačený 2'-O-metyl

OLIGO	SEKVENCIA	SEKV. ID Č:
4325	GCG UUT GCT CTT CTT CUU GCG	23
4326	GCG UUU GCT CTT CTU CUU GCG	24

Príklad 23

Ohodnotenie oligonukleotidov 270 a 330 v HCV H8Ad17 proteínovom teste

Na zhodnotenie účinkov oligonukleotidov na hladiny HCV jadrového proteínu bol vyvinutý Western blot používajúci afinitne purifikované ľudské polyklonálne anti-HVC sérum a ¹²⁵I-konjugovaný kozí anti-ľudský IgG namiesto predtým používaných ELISA testov. H8 bunky boli nasadené do 6 jamkovej platničky v množstve 3,5 x 10⁵ buniek na jamku. Bunky rástli cez noc. Bunky boli 4 hodiny ošetrované oligonukleotidom v Optimem obsahujúcom 5 µg/ml lipofektínu. Bunky boli zásobené 2 ml H8 média a cez noc im bola umožnená regenerácia. Bunky boli raz premyté s 2 ml PBS, lyzované v 100 µl Laemmli tlmivého roztoku a zozbierané zoškriabaním. Na elektroforézu boli bunkové lyzáty povarené a 10 až 14 µl bunkového lyzátu bolo nanosených do každej dráhy 16 % polyakrylamidového gélu. Po elektroforéze boli proteíny elektroforeticky prenesené na PVDF membránu. Membrána bola blokováná v PBS obsahujúcom 2 % kozie sérum a 0,3 % Tween-20, a inkubovaná cez noc s primárnou protilátkou (ľudskou anti-jadrovou protilátkou 2243 a králičou anti-G3PDH protilátkou). Membrána bola premývaná 5 x 5 minút v tlmivom roztoku, potom bola inkubovaná so sekundárnymi protilátkami 4 až 8 hodín (¹²⁵I-konjugovaná kozia anti-humánnou a ¹²⁵I-konjugovaná kozia anti-králičou). Membrána bola premývaná 5 x 5 minút v tlmivom roztoku, zatavená do plastu a cez noc exponovaná v PhosphorImager-ovej kazete. Pruhy boli kvantifikované na PhosphorImager-i (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA), normalizované na expresné hladiny G3PDH, a výsledky boli vyjadrené ako percento kontrolných neošetrených buniek.

Oligonukleotidy hodnotené týmto Western blot testom sú uvedené v tabuľke 15. V uvedených sekvenciách: veľké písmená predstavujú báзовú sekvenciu, malé

písmená (o alebo s) predstavujú vnútronukleozidové väzby, buď fosfodiesterovú (P=O) alebo fosforotioátovú (P=S). Hrube je vytlačený 2'-O-propyl. * = 2'-O-butylimidazol. + = 2'-O-propylamín.

Tabuľka 15

OLIGO	SEKVENCIA	SEKV. ID Č:
270A	GsTsAsCsCsAsCsAsAsGsGsCsCsTsTsTsCsGsCsG	25
270B	GsTsAsCsCsAsCsAsAsGsGsCsCsTsTsTsCsGsCsG	25
270C	* * * * GoToAoCoCoAoCoAoAoGoGoCoCoToToToCoGoCoG	25
270D	+ + * * GoToAoCoCoAoCoAoAoGoGoCoCoToToToCoGoCoG	25
330A	GsTsGsCsTsCsAsTsGsGsTsGsCsAsCsGsGsTsCsT	26
330B	GsTsGsCsTsCsAsTsGsGsTsGsCsAsCsGsGsTsCsT	26
330C	* * * * GoToGoCoToCoAoToGoGoToGoCoAoCoGoGoToCoT	26
330D	+ + * * GoToGoCoToCoAoToGoGoToGoCoAoCoGoGoToCoT	26

Príklad 24

Syntéza 2,6-diamino-9-(2-O-oktadecyl-β-D-ribofuranozyl)purínu

2,6-diamino-9-(β-D-ribofuranozyl)purín (50 g, 180 mmol) a hydrid sodný (7 g) v DMF (1 l) boli zohriate do varu na 2 hodiny. Pri 150 °C bol pridaný jodooktadekán (100 g) a reakčná zmes sa ochladila na laboratórnu teplotu. Reakčná zmes bola miešaná 11 dní pri laboratórnej teplote. Rozpúšťadlo bolo evaporované a zvyšok bol purifikovaný silikagélou chromatografiou. Produkt bol eluovaný s 5 % MeOH/CH₂Cl₂. Aby sa získal produkt (11 g) boli vhodné frakcie evaporované.

Príklad 25

Syntéza 2'-O-oktadecylgvanozínu

2,6-diamino-9-(2-O-oktadecyl- β -D-rubofuranozyl)purín (10 g) v 0,1 M tlmivom roztoku fosforečnenu sodného (50 ml, pH 7,4), 0,1 M Tris tlmivom roztoku (1000 ml, pH 7,4) a DMSO (1000 ml) bol ošetrovaný adenosín deaminázou (1,5 g) pri laboratórnej teplote. Na 3, 5 a 7 deň bola pridaná ďalšia aliquota (500 mg, 880 mg a 200 mg) adenosín deaminázy. Reakčná zmes bola premiešavaná celkovo 9 dní a produkt (2 g) bol vytiažený purifikáciou silikagélou chromatografiou. Analytická vzorka bola rekryštalizovaná z MeOH. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 0.84 (t, 3, CH_3), 1.22 [s, 32, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_{16}$], 5.07 (m, 2, 3'-OH and 5'-OH); 5.78 (d, 1, 1'-H); 6.43 (s, 2, NH_2), 7.97 (s, 1, 8-H) a 10.64 (s, 1, NH_2). Anal. výp. pre $\text{C}_{28}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{O}_5$: C, 62.80; H, 9.16; N, 12.95. Nájdené: C, 62.54; H, 9.18; N, 12.95.

Príklad 26

Syntéza N^2 -izobutyryl-2'-O-oktadecylgvanozínu

2'-O-oktadecylgvanozín (1,9 g) v pyridíne (150 ml) bol ochladený v ľadovom kúpeli a ošetrovaný trimetylzilyl chloridom (2 g, 5 eq) a izobutyryl chloridom (2 g, 5 eq). Reakčná zmes bola miešaná 4 hodiny a počas tejto doby bolo umožnené aby sa oteplila na laboratórnu teplotu. Roztok bol ochladený, bola pridaná voda (10 ml) a bol premiešavaný ďalších 30 minút. Bol pridaný koncentrovaný hydroxid amónny (10 ml) a roztok bol koncentrovaný *in vacuo*. Zvyšok bol purifikovaný silikagélou chromatografiou (eluovaný s 3 % MeOH/EtOAc) aby sa získalo 1,2 g produktu. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 0.85 (t, 3, CH_3), 1.15 (m, 38, $\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{16}$, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.77 (m, 1, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.25 (m, 2, 2'-H and 3'-H); 5.08 (t, 1, 5'-OH), 5.12 (d, 1, 3'-OH), 5.87 (d, 1, 1'-H), 8.27 (s, 1, 8-H), 11.68 (s, 1, NH_2) a 12.08 (s, 1, NH_2). Anal. Výp. pre $\text{C}_{32}\text{H}_{55}\text{N}_5\text{O}_6$: C, 63.47; H, 9.09; N, 11.57. Nájdené: C, 63.53; H, 9.20; N, 11.52. Pred začlenením tohto produktu do oligonukleotidu bol konvertovaný na N^2 -izobutyryl-5'-dimetoxitrityl-2'-O-oktadecylgvanozín a potom na fosforamidát podľa postupov popísaných v medzinárodnej zverejnenej prihláške č. WO 94/02501, zverejnenej 3. februára, 1994.

Príklad 27

Diagnostický test na detekciu nadexpresie mRNA

Po syntéze sú oligonukleotidy rádioaktívne značené ^{32}P značením na 5'konci s polynukleotid kinázou. Sambrook et al. ("Molecular Cloning. A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, zv. 2, str. 11.31-11.32). Rádioaktívne značené oligonukleotidy sú kontaktované s tkanivovými alebo bunkovými vzorkami, pri ktorých je podozrenie, že dochádza k nadexpresii mRNA, napríklad so vzorkou z pacienta, v podmienkach, v ktorých môže nastať špecifická hybridizácia a vzorky sú premyté, aby sa odstránili nenaviazané oligonukleotidy. Podobne sa zaobchádza s kontrolou, kde je rádioaktívne značený oligonukleotid kontaktovaný so vzorkou normálneho tkaniva alebo buniek v podmienkach, ktoré umožňujú špecifickú hybridizáciu a vzorka je premytá aby sa odstránil nenaviazaný oligonukleotid. Rádioaktivita, ktorá zotrváva vo vzorke, indikuje naviazaný oligonukleotid a je kvantifikovaná scintilačným počítaním alebo iným rutinným spôsobom. Porovnávanie zostatkovej rádioaktivity vo vzorkách z normálnych a chorých buniek indikuje nadexpresiu sledovanej mRNA.

Rádioaktívne značené oligonukleotidy podľa vynálezu sú tiež použiteľné v autoradiografii. Sekcie tkanív sú ošetrené s rádioaktívne značeným oligonukleotidom a premyté ako bolo popísané vyššie, potom sú vystavené fotografickej emulzii podľa štandardných autorádiografických postupov. Je tiež spracovaná kontrolná vzorka z normálnych buniek alebo tkaniva. Po vyvinutí emulzia vytvára obrazy strieborných zŕn nad oblasťami nadexpresie mRNA, ktoré sú kvantifikované. Rozsah mRNA nadexpresie je kvantifikovaný porovnaním strieborných zŕn pozorovaných pri normálnych a chorých bunkách.

Analogické testy fluorescenčnej detekcie mRNA expresie používajú oligonukleotidy podľa vynálezu, ktoré sú značené fluoresceínom alebo inými fluorescenčnými príveskami. Značené oligonukleotidy sú syntetizované na automatickom DNA syntetizéri (Applied Biosystems model 380B) použitím štandardnej fosforamidínovej chémie s oxydáciou jódom. β -kyanoetyldiizopropyl fosforamidy sú kúpené od Applied Biosystems (Foster City, CA). Fluoresceínom

značené amidy sú kúpené od Glen Research (Sterling, VA). Inkubácia oligonukleotidu a biologickej vzorky je uskutočňovaná ako je popísané pre rádioaktívne značené oligonukleotidy, s výnimkou toho, že namiesto scintilačného čítača, je na detekciu fluorescencie použitý fluorescenčný mikroskop. Porovnanie fluorescenzie pozorovanej vo vzorkách z normálnych a chorých buniek umožňuje detekciu nadexpresie mRNA.

Príklad 28

Detekcia abnormálne expresie mRNA

Tkanivové alebo bunkové vzorky, pri ktorých je podozrenie na expresiu abnormálnej mRNA, sú najprv inkubované s ^{32}P alebo fluoresceínom značeným oligonukleotidom, ktorý je cielený na divý typ (normálnu) mRNA. Identická vzorka buniek alebo tkanív je inkubovaná s druhým značeným oligonukleotidom, ktorý je cielený na abnormálnu mRNA, v podmienkach, v ktorých môže nastať špecifická hybridizácia. Vzorka je premytá, aby sa odstránil nenaviazaný oligonukleotid. Značenie zotrúvajúce vo vzorke indikuje naviazaný oligonukleotid a môže byť kvantifikované použitím scintilačného čítača, fluorimetra alebo iného rutinného prostriedku. Ak je pozorované naviazanie v prípade druhej ale nie prvej vzorky, indikuje to prítomnosť abnormálnej mRNA.

Na špecifickú detekciu expresie abnormálnej mRNA môže byť tiež použité dvojité značenie oligonukleotidov v spôsoboch podľa vynálezu. Jedna tkanivová vzorka je inkubovaná s prvým ^{32}P značeným oligonukleotidom, ktorý je cielený na divý typ mRNA a s druhým fluoresceínom značeným oligonukleotidom, ktorý je cielený na abnormálnu mRNA, v podmienkach, pri ktorých môže dôjsť k špecifickej hybridizácii. Vzorka je premytá, aby sa odstránil nenaviazaný oligonukleotid a značenia sú detegované scintilačným počítaním alebo fluorimetriou. Ak vzorka neviaže ^{32}P -značený oligonukleotid (t.j. nie je rádioaktívna) ale drží fluorescenčné značenie (t.j. je fluorescentná), indikuje to prítomnosť abnormálnej mRNA.

Príklad 29

Príjem oligonukleotidov plazmou a ich distribúcia v tkanive myši

Boli pripravené nasledujúce oligonukleotidy:

UsGsCsAsTsCsCsCsCsCsAsGsGsCsCsAsCsCsAsT, SEKV. Č.:27

UsGsCsAsTsCsCsCsCsCsAsGsGsCsCsAsCsCsAsT, SEKV. Č.:27

UsGsCsAsTsCsCCCCAGGCsCsAsCsCsAsT, SEKV. Č.:27

kde 2'-O-propyl substituent je vytlačený tučne, "s" znamená fosforotioátovú väzbu a absencia "s" indikuje fosfodiesterovú väzbu v odpovedajúcich oligonukleotidoch. Na obrázkoch 9, 10, 11 a 12 je prvý oligonukleotid označený ako ISIS 3082, druhý ako ISIS 9045 a tretí ako ISIS 9046. Oligonukleotidy boli tritiové spôsobom podľa Graham et al., Nuc. Acids Res., 1993, 16, 3737-3743.

Živočíšny a experimentálny postup: Pre každý študovaný oligonukleotid bolo náhodne priradených do jednej zo štyroch ošetrovaných skupín dvadsať samčiek Balb/c miší (Charles River) s hmotnosťou približne 25 g. Po jednotýždňovej aklimatizácii myši dostali do chvostovej cievy injekciu ³H-rádioaktívne značeného oligonukleotidu (približne 750 nmol/kg; v rozmedzí od 124 do 170 μCi/kg), ktorý bol podávaný vo fyziologickom roztoku tlmenom fosfátom, pH 7,0. Koncentrácia oligonukleotidu v roztoku dávky bola približne 60 μM. Jedna retro-orbitálna vzorka krvi (buď 0,25; 0,5; 2 alebo 4 hodiny po podaní dávky) a terminálna vzorka krvi (buď 1, 3, 8 alebo 24 hodín po podaní dávky) bola odobraná z každej skupiny. Terminálna vzorka krvi bola odobraná srdcovou punktúrou po ketamín/xylazínovej anestéze. Alikvota z každej vzorky krvi bola uchovaná na radioaktívnu determináciu a zvyšok krvi bol prenesený do EDTA-potiahnutej zbernej skúmavky a centrifugovaný, aby sa získala plazma. Od skupiny, ktorá bola ukončená po 24 hodinách, bol zbieraný moč a výkaly v intervaloch (0 až 4, 4 až 8 a 8 až 24 hodín).

Pri usmrtení boli z každej myši zhromaždené a odvážené pečeň, obličky, slezina, pľúca, srdce, mozog, vzorka kostrového svalu, časť tenkého čreva, vzorka kože, pankreas, kosť (obe stehenné kosti obsahujúce kostnú dreň) a dve lymfatické uzliny. Výkaly boli odvážené a potom homogenizované v pomere 1:1 s destilovanou vodou použitím Brinkman Polytron homogenizéra (Westbury, NY). Plazma, tkanivá, moč a homogenát výkalov boli rozdelené na analýzu rádioaktivity horením a na

určenie obsahu intaktného oligonukleotidu. Po zozbieraní boli všetky vzorky okamžite zmrazené na suchom ľade a uložené na -80 °C až do analýzy.

Analýza rádioaktivity v plazme, tkanive a exkréte: Vzorky plazmy a moču boli odvážené priamo v scintilačnej nádobke a analyzované kvapalinovým scintilačným počítaním po pridaní 15 ml BetaBlend (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA). Všetky ostatné vzorky (tkanivá, krv a homogenizované výkaly) boli odvážené v nádobách na horenie a oxidované v oxidizéry biologických materiálov (Model OX-100; R.J. Harvey Instrument Corp., Hillsdale, NJ). $^3\text{H}_2\text{O}$ bola zhromažďovaná v 20 ml koktajle zloženom z 15 ml BetaBlend a 5 mL Harvey Trítium Koktajlu (R.J. Harvey Instrument Corp., Hillsdale, NJ). Účinnosť horenia bola určovaná denne horením vzoriek zmiešaných s roztokom ^3H -manitolu a bola v rozmedzí od 73,9 do 88,3 %. Kvapalinové scintilačné počítanie bolo ukutočňované použitím Beckman LS 9800 alebo LS 6500 kvapalinového scintilačného systému (Beckman Instruments, Fullerton, CA). Vzorky boli počítané po 10 minútach s automaticou zmierňujúcou korekciou. Hodnoty dezintegrácie za minútu boli opravované kvôli efektívnosti procesu horenia.

Analýza údajov: rádioaktivita vzoriek bola vyjadrená ako dezintegrácie za minútu na gram vzorky. Tieto hodnoty boli vydelené hodnotou špecifickej aktivity rádioaktívnej značky tak, aby vyjadrovali údaj v nanomolárnych ekvivalentoch celkového oligonukleotidu na gram vzorky, potom boli konvertované na percento podávanej dávky na orgán alebo tkanivo. Predpokladajúc že hustota tkaniva je 1 g/ml, údaje v nmol/g boli konvertované na celkovú koncentráciu v μM . Aby sa vypočítal koncentrácia intaktného oligonukleotidu v plazme, pečeni alebo obličkách v každom časovom bode, boli priemerné celkové μM koncentrácie vydelené percentom intaktného oligonukleotidu v roztoku dávky (82 až 97 %), potom vynásobené priemerným percentom intaktného oligonukleotidu v každom časovom bode ako bol determinovaný použitím CGE alebo HPLC. Tento údaj bol potom použitý na vypočítanie tkanivového polčasu rozpadu lineárnou regresiou a porovnával sa s plazmovými farmakokinetickými parametrami rôznych modifikovaných oligonukleotidov. Farmakokinetické parametre boli determinované

údajov bol na použitie vybraný model jednodielny bolusový vstup, výstup prvého príkazu (knižný model 1).

Výsledky testov plazmového prijímu a tkanivovej distribúcie sú graficky ilustrované na obrázkoch 9, 10, 11 a 12. Ako je vidno na obrázku 9, koncentrácia každého z testovaných oligonukleotidov v plazme klesá počas 24 hodinovej testovacej periódy z počiatočných injekčných hladín na nižšie hladiny. Koncentrácie oligonukleotidov podľa vynálezu v plazme sa držali na hladinách ekvivalentných s hladinami nekonjugátov nesúcich fosforotioát. Všetky testované zlúčeniny prešli z plazmy do tkanív ako je ukázané na obrázkoch 10, 11 a 12. Zlúčeniny podľa vynálezu mali rôznu distribúciu vrámci rôznych tkanív. Obrázok 10 znázorňuje distribúčnú vzorku kontrolného oligonukleotidu označeného ako ISIS 3082, fosforotioátového oligonukleotidu. Obrázok 11 znázorňuje distribúčnú vzorku prvej zlúčeniny podľa vynálezu, oligonukleotidu označeného ako ISIS 9045, ktorý má 2'-substituent na každom oligonukleotide. Obrázok 12 znázorňuje distribúčnú vzorku ďalšej zlúčeniny podľa vynálezu, "prerušovaného" oligonukleotidu označeného ako ISIS 9046, ktorý má 2'-substituent a fosfodiesterové väzby na každom oligonukleotide v "ohraničujúcich" sekciách oligonukleotidu a 2'-deoxy fosforotioátové nukleozidy v centrálnej alebo prerušenej oblasti.

Príklad 30

2,2'-Anhydro[1-(β -D-arabinofuranozyl)-5-metyluridín]

5-metyluridín (ribozylytymín, komerčne dostupný cez Yamasa, Choshi, Japonsko) (72,0 g, 0,279 M), difenyluhličitan (90,0 g, 0,420 M) a uhličitan sodný (2,0 g, 0,024 M) boli dané do DMF (300 ml). Zmes bola zahriata na reflux, pričom sa miešala, čo umožnilo uvoľnenie vytvoreného oxidu uhličitého kontrolovaným spôsobom. Mierne stmavnutý roztok bol po jednej hodine koncentrovaný za zníženého tlaku. Výsledný sirup bol vliaty do dietyléteru (2,5 l) pričom sa miešal. Produkt vytvoril gumu. Éter bol dekantovaný a zvyšok bol rozpustený v minimálnom množstve metanolu (okolo 400 ml). Roztok bol vliaty do čerstvého éteru (2,5 l), aby sa získala tuhá guma. Éter bol dekantovaný a guma bola vysušená vo vákuovej sušiarňi (60 °C pri 1 mm Hg na 24 hod.), aby sa získala pevná látka, ktorá bola

rozdrtená na svetlý trieslový prášok (57 g, 85 % surový výtťažok). NMR spektrum zodpovedalo štruktúre kontaminovanej fenolom vo forme jeho sodnej soli (okolo 5 %). Materiál bol použitý v tomto stave na ďalšie reakcie (alebo môže byť ďalej purifikovaný na kolónovej chromatografii použitím gradientu metanolu v etylacetáte (10 až 25 %), aby sa získala biela pevná látka, t_f 222 až 224 °C).

Príklad 31

2'-O-Metoxyetyl-5-metyluridín

2,2'-anhydro-5-metyluridín (195 g, 0,81 M), tris (2-metoxetyl)borát (231 g, 0,98 M) a 2-metoxyetanol (1,2 l) boli pridané do 2 l nefarbenej ocelevej tlakovej nádoby a umiestnené do predhriateho olejového kúpeľa na 160 °C. Po 48 hodinách zahrievania na 155 až 160 °C bola nádoba otvorená a roztok bol evaporovaný do sucha a rozmelnený v MeOH (200 ml). Zvyšok bol suspendovaný v horúcom acetóne (1 l). Nerozpustné soli boli filtrované, premyté s acetónom (150 ml) a filtrát bol evaporovaný. Zvyšok (280 g) bol rozpustený v CH₃CN (600 ml) a evaporovaný. Silikagelová kolóna (3 kg) bola naložená v CH₃CN/acetón/MeOH (20:5:3) obsahujúcom 0,5 % EtNH. Zvyšok bol pred nanesením na kolónu rozpustený v CH₃Cl₂ (250 ml) a adsorbovaný na silicu (150 g). Produkt bol eluovaný obalovým roztokom a získalo sa 160 g (63 %) produktu. Ďalší materiál bol získaný prepracovaním nečistých frakcií.

Príklad 32

2'-O-metoxetyl-5'-O-dimetoxyl-5-metyluridín

2'-O-metoxetyl-5-metyluridín (160 g, 0,506 M) bol evaporovaný spolu s pyridínom (250 ml) a vysušený zvyšok bol rozpustený v pyridíne (250 ml). Do zmesi bola pridaná prvá aliquota dimetoxylchloridu (94,3 g, 0,278 M) a zmes bola premiešavaná pri laboratórnej teplote jednu hodinu. Do reakčnej zmesi bola pridaná druhá aliquota dimetoxylchloridu (94,3 g, 0,278 M) a miešala sa ďalšiu hodinu. Na zastavenie reakcie bol potom pridaný metanol (170 ml). HPLC ukázala prítomnosť približne 70 % produktu. Roztok bol evaporovaný a rozmelnený s CH₃CN (200 ml). Zvyšok bol rozpustený v CHCl₃ (1,5 l) a extrahovaný s 2 x 500 ml

nasýteného NaHCO_3 a 2 x 500 ml nasýteného NaCl . Organická fáza bola vysušená na Na_2SO_4 , filtrovaná a evaporovaná. Získalo sa 275 g zvyšku. Zvyšok bol purifikovaný na 3,5 kg silikagélovej kolóne naloženej a eluovanej s EtOAc /hexán/acetón (5:5:1) obsahujúcom 0,5 % Et_3NH . Čisté frakcie boli evaporované, čím sa získalo 164 g produktu. Ďalších približne 20 g bolo získaných z nečistých frakcií, čím sa dosiahol celkový výťažok 184 g (57 %).

Príklad 33

3'-O-Acetyl-2'-O-metoxyetyl-5'-O-dimetoxitrityl-5-metyluridín

2'-O-metoxyetyl-5'-O-dimetoxitrityl-5-metyluridín (106 g, 0,167 M), DMF /pyridín (750 ml 3:1 zmesi pripravenej z 562 ml DMF a 188 ml pyridínu) a anhydrid kyseliny octovej (24,38 ml, 0,258 M) boli spojené a premiešavané 24 hodín pri laboratórnej teplote. Reakčná zmes bola monitorovaná na tlc, najprv ochladením tlc vzorky pridaním MeOH . Pri ukončení reakcie, podľa posúdenia tlc, bol pridaný MeOH (50 ml) a zmes bola evaporovaná pri 35 °C. Zvyšok bol rozpustený v CHCl_3 (800 ml) a extrahovaný s 2 x 200 ml nasýteného uhličitanu sodného a 2 x 200 ml nasýteného NaCl . Vodné vrstvy boli znovu extrahované s 200 ml CHCl_3 . Spojená organická časť bola vysušená síranom sodným a evaporovaná, čím vzniklo 122 g zvyšku (približne 90 % produktu). Zvyšok bol purifikovaný na 3,5 kg silikagélovej kolóne a eluovaný použitím EtOAc /hexán (4:1). Čisté frakcie produktu boli evaporované, čím sa získalo 96 g (84 %). Ďalšieho 1,5 g sa získalo z neskorších frakcií.

Príklad 34

3'-O-Acetyl-2'-O-metoxyetyl-5'-O-dimetoxitrityl-5-metyl-4-triazoleuridín

Bol pripravený a odložený na bok, prvý roztok rozpustením 3'-O-acetyl-2'-O-metoxyetyl-5'-O-dimetoxitrityl-5-metyluridínu (96 g, 0,144 M) v CH_3CN (700 ml). Do roztoku triazolu (90 g, 1,3 M) v CH_3CN (1 l) bol pridaný trietylamín (189 ml, 1,44 M), roztok bol ochladený a miešaný 0,5 hodinu použitím vrchnej miešačky. Počas 30 minút bol po kvapkách pridávaný POCl_3 do premiešavaného roztoku, udržiavaného na 0 až 10 °C, a výsledná zmes sa miešala ďalšie 2 hodiny. Do tohto roztoku bol

počas 45 minút pridávaný po kvapkách prvý roztok. Výsledná reakčná zmes bola uskladnená cez noc v chladnej miestnosti. Z reakčnej zmesi boli odfiltrované soli a roztok bol evaporovaný. Zvyšok bol rozpustený v EtOAc (1 l) a nerozpustné pevné látky boli odstránené filtráciou. Filtrát bol premytý s 1 x 300 ml NaHCO_3 a 2 x 300 ml nasýteného NaCl, vysušený síranom sodným a evaporovaný. Zvyšok bol rozmelení s EtOAc, čím sa získala zlúčenina uvedené v názve.

Príklad 35

2'-O-Metoxetyl-5'-O-dimetoxyl-5-metylcytidín

Roztok 3'-O-acetyl-2'-O-metoxetyl-5'-O-dimetoxyl-5-metyl-4-triazoleuridínu (103 g, 0,141 M) v dioxáne (500 ml) a NH_4OH (30 ml) boli miešané pri laboratórnej teplote 2 hodiny. Dioxánový roztok bol evaporovaný a zvyšok bol azeotropovaný s MeOH (2 x 200 ml). Zvyšok bol rozpustený v MeOH (300 ml) a prenesený do 2 l nefarbenej ocelevej tlakovej nádoby. Bol pridaný MeOH (400 ml) sytený s NH_3 plynom a nádoba bola zahrievaná na 100 °C počas 2 hodín (tlc ukazovala kompletnú konverziu). Obsah nádoby bol do sucha evaporovaný a zvyšok bol rozpustený v EtOAc (500 ml) a raz premytý s nasýteným NaCl (200 ml). Organické látky boli vysušené síranom sodným a rozpúšťadlo bolo evaporované, čím sa získalo 85 g (95 %) zlúčeniny uvedenej v názve vynálezu.

Príklad 36

N⁴-Benzoyl-2'-O-metoxetyl-5'-O-dimetoxyl-5-metylcytidín

2'-O-metoxetyl-5'-O-dimetoxyl-5-metylcytidín (85 g, 0,134 M) bol rozpustený v DMF (800 ml) a za stáleho miešania bol pridaný anhydrid kyseliny benzoovej (37,2 g, 0,165 M). Po 3 hodinovom miešaní tlc ukazoval, že reakcia je kompletná približne na 90 %. Rozpúšťadlo bolo evaporované a zvyšok azeotropovaný s MeOH (200 ml). Zvyšok bol rozpustený v CHCl_3 (700 ml) a extrahovaný s nasýteným NaHCO_3 (2 x 300 ml) a nasýteným NaCl (2 x 300 ml), vysušený na MgSO_4 a evaporovaný, čím sa získal zvyšok (96 g). Zvyšok bol podrobený chromatografii na 1,5 kg silikagélovej kolóne použitím EtOAc/hexánu

(1:1), ktorý obsahuje 0,5 % Et₃NH, ako elučného rozpúšťadla. Čisté frakcie produktu boli evaporované, čím sa získalo 90 g (90 %) zlúčeniny uvedenej v názve.

Príklad 37

N⁴-Benzoyl-2'-O-metoxetyl-5'-O-dimetoxyl-5-metylcytidín-3'-amidit

N⁴-benzoyl-2'-O-metoxetyl-5'-O-dimetoxyl-5-metylcytidín (74 g, 0,10 M) bol rozpustený v CH₂Cl₂ (1 l). Za stáleho miešania, v dusíkovej atmosfére boli pridané tetrazol diizopropylamín (7,1 g) a 2-kyanoetoxy-tetra-(izopropyl)fosfit (40,5 ml, 0,123 M). Výsledná zmes bola miešaná 20 hodín pri laboratórnej teplote (tlc ukazovalo, že reakcia je kompletná na 95 %). Reakčná zmes bola extrahovaná s nasýteným NaHCO₃ (1 x 300 ml) a nasýteným NaCl (3 x 300 ml). Vodné premývania boli znovu extrahované s CH₂Cl₂ (300 ml) a extrakty boli spojené, vysušené na MgSO₄ a koncentrované. Získaný zvyšok bol podrobený chromatografii na 1,5 kg silika kolóne, použitím EtOAc/hexánu (3:1), ako elučného rozpúšťadla. Čisté frakcie produktu boli spojené, čím sa získalo 90,6 g (87 %) zlúčeniny uvedenej v názve.

ZOZNAM SEKVENCÍÍ

(1) VŠEOBECNÉ INFORMÁCIE:

- (i) PRIHLASOVATEĽ: ISIS Pharmaceuticals, Inc. & Novartis AG
- (ii) NÁZOV VYNÁLEZU: Sacharidmi modifikované prerušované oligonukleotidy
- (iii) POČET SEKVENCÍÍ: 32
- (iv) ADRESA PRE KOREŠPONDENCIU:
 - (A) ADRESÁT: Woodcock Washburn Kurtz Mackiewicz & Norris
 - (B) ULICA: One Liberty Place - 46th Floor
 - (C) MESTO: Philadelphia
 - (D) ŠTÁT: PA
 - (E) KRAJINA: U.S.A.
 - (F) ZIP: 19103
- (v) FORMA ČITATEĽNÁ POČÍTAČOM:
 - (A) MEDIUM TYP: 3.5 inch disk, 720 Kb
 - (B) POČÍTAČ: IBM PC compatible
 - (C) OPERAČNÝ SYSTÉM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: WordPerfect 5.1
- (vi) ÚDAJE O AKTUÁLNEJ PRIHLÁŠKE:
 - (A) ČÍSLO PRIHLÁŠKY: N/A
 - (B) DÁTUM PODANIA: 12.08.1998
 - (C) KLASIFIKÁCIA: N/A
- (vii) ÚDAJE O PREDCHÁDZAJÚCEJ PRIHLÁŠKE:
 - (A) ČÍSLO PRIHLÁŠKY: 60,011,620
 - (B) DÁTUM PODANIA: 14 Február 1996
- (viii) INFORMÁCIE O ZÁSTUPCOVI:
 - (A) MENO: Joseph Lucci
 - (B) REGISTRAČNÉ ČÍSLO: 33,307
 - (C) ZNAČKA/ČÍSLO SPISU:
- (ix) TELEKOMUNIKAČNÉ INFORMÁCIE:
 - (A) TELEFÓN: 215-568-3100
 - (B) FAX: 215-568-3439

(2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.1:

- (i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
 - (A) DĹŽKA: 17 báz
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) POČET VLÁKIEN: jedno
 - (D) TOPOLOGIA: lineárna
- (iv) ANTI-SENSE: áno
- (xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:1:

CCACACCGAC GCGCCCC

(2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.2:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 20 báz
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKIEN: jedno
- (D) TOPOLOGIA: lineárna

(iv) ANTI-SENSE: áno

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:2:

CTTATATTCC GTCATCGCTC

(2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.3:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 20 báz
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKIEN: jedno
- (D) TOPOLOGIA: lineárna

(iv) ANTI-SENSE: áno

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:3:

TCCGTCATCG CTCCTCAGGG

(2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.4:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 20 báz
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKIEN: jedno
- (D) TOPOLOGIA: lineárna

(iv) ANTI-SENSE: áno

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:4:

AAAACGTCAG CCATGGTCCC

(2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.5:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 18 báz
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKIEN: jedno
- (D) TOPOLOGIA: lineárna

(iv) ANTI-SENSE: áno

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:5:

TTCTCGCTGG TGAGTTTC

(2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.6:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 17 báz
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKIEN: jedno
- (D) TOPOLOGIA: lineárna
- (iv) ANTI-SENSE: áno
- (xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:6:

TCTCGCTGGT GAGTTTC

- (2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.7:
 - (i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
 - (A) DĹŽKA: 20 báz
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) POČET VLÁKIEN: jedno
 - (D) TOPOLOGIA: lineárna
 - (iv) ANTI-SENSE: áno
 - (xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:7:

TCCCGCCTGT GACATGCATT

- (2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.8:
 - (i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
 - (A) DĹŽKA: 20 báz
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) POČET VLÁKIEN: jedno
 - (D) TOPOLOGIA: lineárna
 - (iv) ANTI-SENSE: áno
 - (xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:8:

TCCTCCTCCC CGCGGCGGGT

- (2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.9:
 - (i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
 - (A) DĹŽKA: 20 báz
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) POČET VLÁKIEN: jedno
 - (D) TOPOLOGIA: lineárna
 - (iv) ANTI-SENSE: áno
 - (xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:9:

CTCGCCCGCT CTCCTCCCC

- (2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.10:
 - (i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
 - (A) DĹŽKA: 20 báz
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) POČET VLÁKIEN: jedno
 - (D) TOPOLOGIA: lineárna
 - (iv) ANTI-SENSE: áno
 - (xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:10:

TTCTCGCCCG CTCCTCCTCC

(2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.11:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 20 báz
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKIEN: jedno
- (D) TOPOLOGIA: lineárna

(iv) ANTI-SENSE: áno

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:11:

TTCTCCTCCT CCCCTGGCAG

(2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.12:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 20 báz
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKIEN: jedno
- (D) TOPOLOGIA: lineárna

(iv) ANTI-SENSE: áno

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:12:

CTGGCTTCTC CTCCTCCCCT

(2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.13:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 20 báz
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKIEN: jedno
- (D) TOPOLOGIA: lineárna

(iv) ANTI-SENSE: áno

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:13:

CCTGCTGGCT TCTCCTCCTC

(2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.14:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 20 báz
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKIEN: jedno
- (D) TOPOLOGIA: lineárna

(iv) ANTI-SENSE: áno

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:14:

TCTGGCGCTG CACCACTCTC

(2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.15:

- (i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
 - (A) DĹŽKA: 47 báz
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) POČET VLÁKIEN: jedno
 - (D) TOPOLOGIA: lineárna
- (iv) ANTI-SENSE: nie
- (xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:15:

ACATTATGCT AGCTTTTTGA GTAAACTTGT GGGGCAGGAG ACCCTGT

- (2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.16:
 - (i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
 - (A) DĹŽKA: 29 báz
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) POČET VLÁKIEN: jedno
 - (D) TOPOLOGIA: lineárna
 - (iv) ANTI-SENSE: áno
 - (xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:16:

GAGATCTGAA GCTTCTGGAT GGTCAGCGC

- (2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.17:
 - (i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
 - (A) DĹŽKA: 35 báz
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) POČET VLÁKIEN: jedno
 - (D) TOPOLOGIA: lineárna
 - (iv) ANTI-SENSE: nie
 - (xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:17:

GAGATCTGAA GCTTGAAGAC GCCAAAAACA TAAAG

- (2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.18:
 - (i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
 - (A) DĹŽKA: 33 báz
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) POČET VLÁKIEN: jedno
 - (D) TOPOLOGIA: lineárna
 - (iv) ANTI-SENSE: áno
 - (xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:18:

ACGCATCTGG CGCGCCGATA CCGTCGACCT CGA

- (2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.19:
 - (i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
 - (A) DĹŽKA: 20 báz
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) POČET VLÁKIEN: jedno
 - (D) TOPOLOGIA: lineárna

- (iv) ANTI-SENSE: áno
- (xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:19:

CGGGAGGCGG TCACATTCGG

- (2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.20:
 - (i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
 - (A) DĚLKA: 20 báz
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) POČET VLÁKIEN: jedno
 - (D) TOPOLOGIA: lineárna
 - (iv) ANTI-SENSE: áno
 - (xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:20:

UAGGAGAUGC CUAAGGCUUU

- (2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.21:
 - (i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
 - (A) DĚLKA: 20 báz
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) POČET VLÁKIEN: jedno
 - (D) TOPOLOGIA: lineárna
 - (iv) ANTI-SENSE: áno
 - (xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:21:

GCUAUGUCGA CACCCAAUUC

- (2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.22:
 - (i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
 - (A) DĚLKA: 18 báz
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) POČET VLÁKIEN: jedno
 - (D) TOPOLOGIA: lineárna
 - (iv) ANTI-SENSE: áno
 - (xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:22:

CAUAGGAGAU GCCUAAGGCT

- (2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.23:
 - (i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
 - (A) DĚLKA: 21 báz
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) POČET VLÁKIEN: jedno
 - (D) TOPOLOGIA: lineárna
 - (iv) ANTI-SENSE: áno
 - (xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:23:

GCGUUTGCTC TTCTTCUUGC G

(2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.24:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 21 báz
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKIEN: jedno
- (D) TOPOLOGIA: lineárna

(iv) ANTI-SENSE: áno

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:24:

GCGUUUGCTC TTCTUCUUGC G

(2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.25:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 20 báz
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKIEN: jedno
- (D) TOPOLOGIA: lineárna

(iv) ANTI-SENSE: áno

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:25:

GTACCACAAG GCCTTTCGCG

(2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.26:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 20 báz
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKIEN: jedno
- (D) TOPOLOGIA: lineárna

(iv) ANTI-SENSE: áno

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:26:

GTGCTCATGG TGCACGGTCT

(2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.27:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 20 báz
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKIEN: jedno
- (D) TOPOLOGIA: lineárna

(iv) ANTI-SENSE: áno

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:27:

UGCATCCCC AGGCCACCAT

(2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.28:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 16 báz
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKIEN: jedno

- (D) TOPOLOGIA: lineárna
- (xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:28:

GCGTTTTTTT TTTGCG

- (2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.29:
 - (i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
 - (A) DĹŽKA: 19 báz
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) POČET VLÁKIEN: jedno
 - (D) TOPOLOGIA: lineárna
 - (xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:29:

CGCAAAAAA AAAAAACGC

- (2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.30:
 - (i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
 - (A) DĹŽKA: 20 báz
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) POČET VLÁKIEN: jedno
 - (D) TOPOLOGIA: lineárna
 - (iv) ANTI-SENSE: áno
 - (xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:30:

AAAACGTCAG CCATGGTCCC

- (2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.31:
 - (i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
 - (A) DĹŽKA: 20 báz
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) POČET VLÁKIEN: jedno
 - (D) TOPOLOGIA: lineárna
 - (iv) ANTI-SENSE: áno
 - (xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:31:

CCCCAACCAC CTCTTGCTCC

- (2) INFORMÁCIE O SEKV. Č.32:
 - (i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
 - (A) DĹŽKA: 20 báz
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) POČET VLÁKIEN: jedno
 - (D) TOPOLOGIA: lineárna
 - (iv) ANTI-SENSE: áno
 - (xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV. Č.:32:

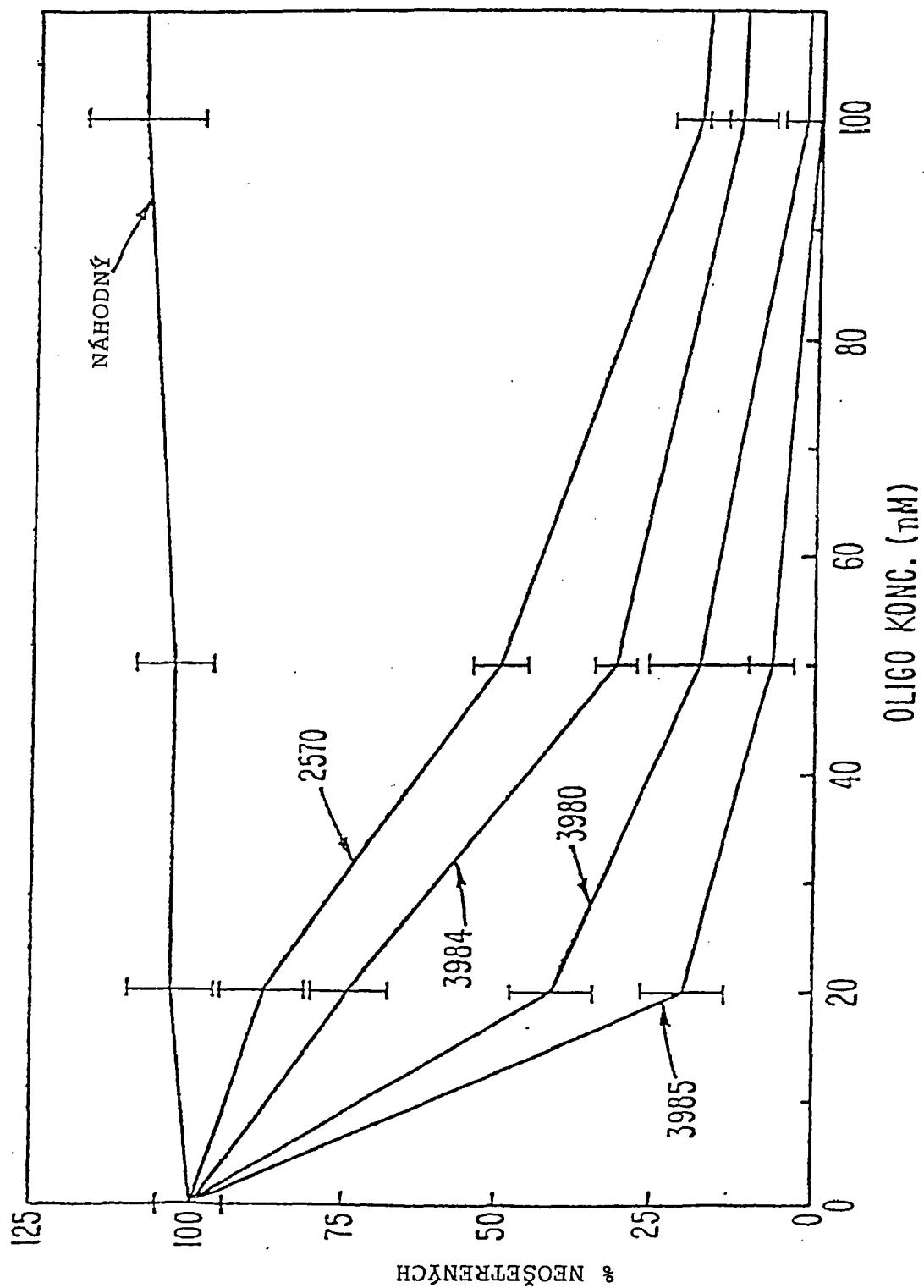
GAGACCCTGA ACAGTTGATC

PATENTOVÉ NÁROKY

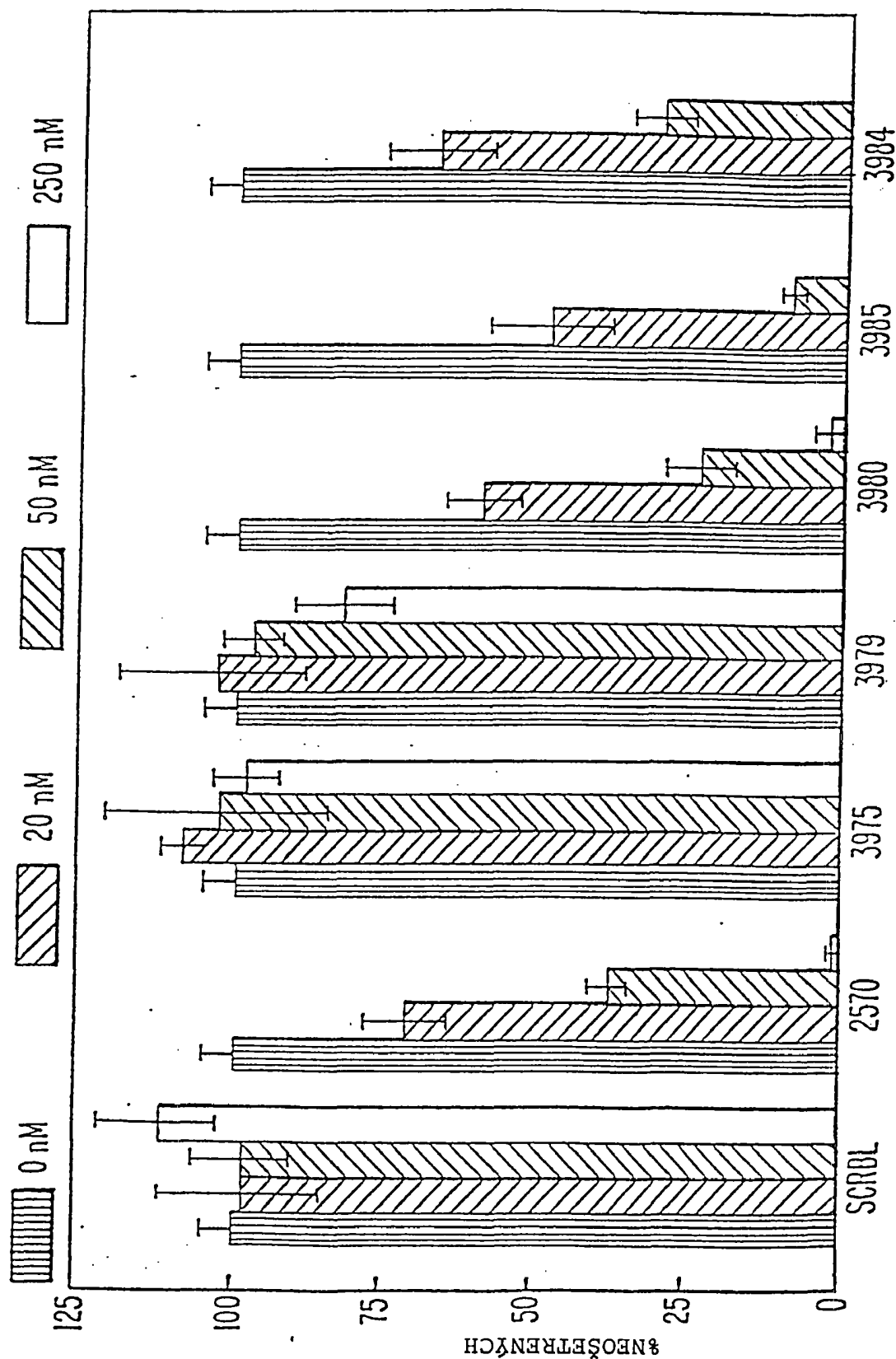
1. Oligonukleotid schopný špecifickej hybridizácie s DNA alebo RNA, ktorý zahŕňa lineárnu sekvenciu kovalentne viazaných nukleozidových jednotiek, pričom sekvencia obsahuje prvú nukleozidovú subsekvenciu, ktorá má 2'-O-CH₂-CH₂-O-CH₃ sacharidové časti, a druhú nukleozidovú subsekvenciu, ktorá má 2'-deoxy sacharidové časti a tretiu nukleozidovú subsekvenciu, ktorá má 2'-O-CH₂-CH₂-O-CH₃ sacharidové časti, pričom druhá subsekvencia je umiestnená medzi prvou a tretou subsekvenciou; a nukleozidové jednotky prvej a druhej subsekvencie sú kovalentne viazané fosfodiesterovými alebo fosforotioátovými väzbami.
2. Oligonukleotid podľa nároku 1, v ktorom sú nukleozidové jednotky prvej a druhej subsekvencie kovalentne spojené fosforotioátovými väzbami.
3. Oligonukleotid podľa nároku 1, v ktorom sú nukleozidové jednotky prvej subsekvencie kovalentne spojené fosfodiesterovými väzbami a nukleozidové jednotky druhej subsekvencie sú kovalentne spojené fosforotioátovými väzbami.
4. Oligonukleotid podľa nároku 1, v ktorom sú nukleozidové jednotky prvej subsekvencie kovalentne spojené fosforotioátovými väzbami a nukleozidové jednotky druhej subsekvencie sú kovalentne spojené fosfodiesterovými väzbami.
5. Oligonukleotid podľa nároku 1, v ktorom druhá subsekvencia obsahuje aspoň tri nukleozidové jednotky.
6. Oligonukleotid podľa nároku 1, v ktorom druhá subsekvencia obsahuje aspoň päť nukleozidových jednotiek.
7. Oligonukleotid podľa nároku 1, ktorý má 5 až 50 nukleozidových jednotiek.
8. Oligonukleotid podľa nároku 1, v ktorom sú nukleozidové jednotky prvej, druhej a tretej subsekvencie kovalentne spojené fosforotioátovými väzbami.
9. Oligonukleotid podľa nároku 1, v ktorom sú nukleozidové jednotky prvej a tretej subsekvencie kovalentne spojené fosfodiesterovými väzbami a nukleozidové jednotky druhej subsekvencie sú kovalentne spojené fosforotioátovými väzbami.

10. Oligonukleotid podľa nároku 1, v ktorom sú nukleozidové jednotky prvej a tretej subsekvencie kovalentne spojené fosforotioátovými väzbami a nukleozidové jednotky druhej subsekvencie sú kovalentne spojené fosfodiesterovými väzbami.
11. Oligonukleotid podľa nároku 1, v ktorom druhá subsekvencia obsahuje aspoň tri nukleozidové jednotky.
12. Oligonukleotid podľa nároku 1, v ktorom druhá subsekvencia obsahuje aspoň päť nukleozidových jednotiek.
13. Oligonukleotid podľa nároku 1, ktorý má 5 až 50 nukleozidových jednotiek.

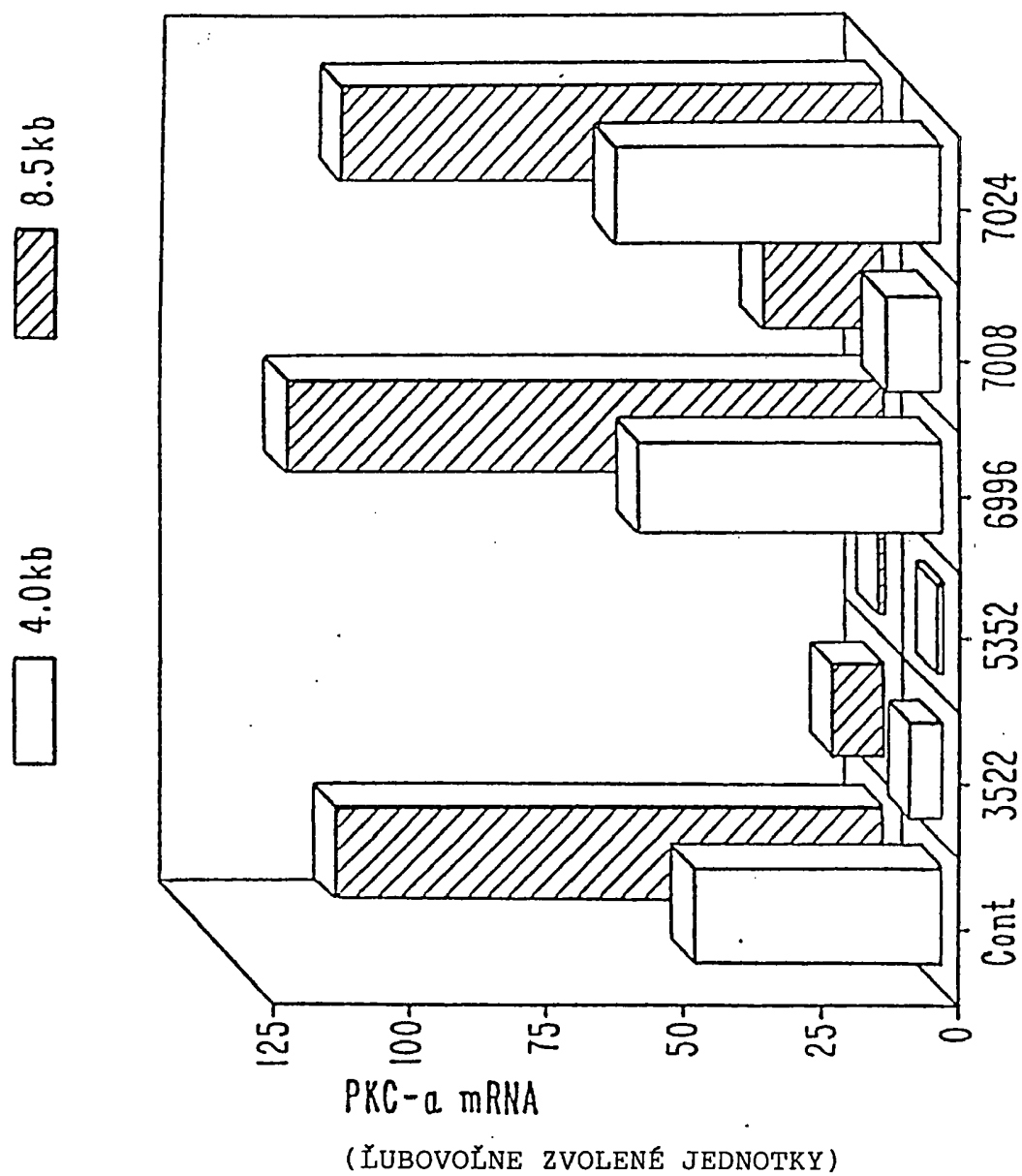
OBR. 1



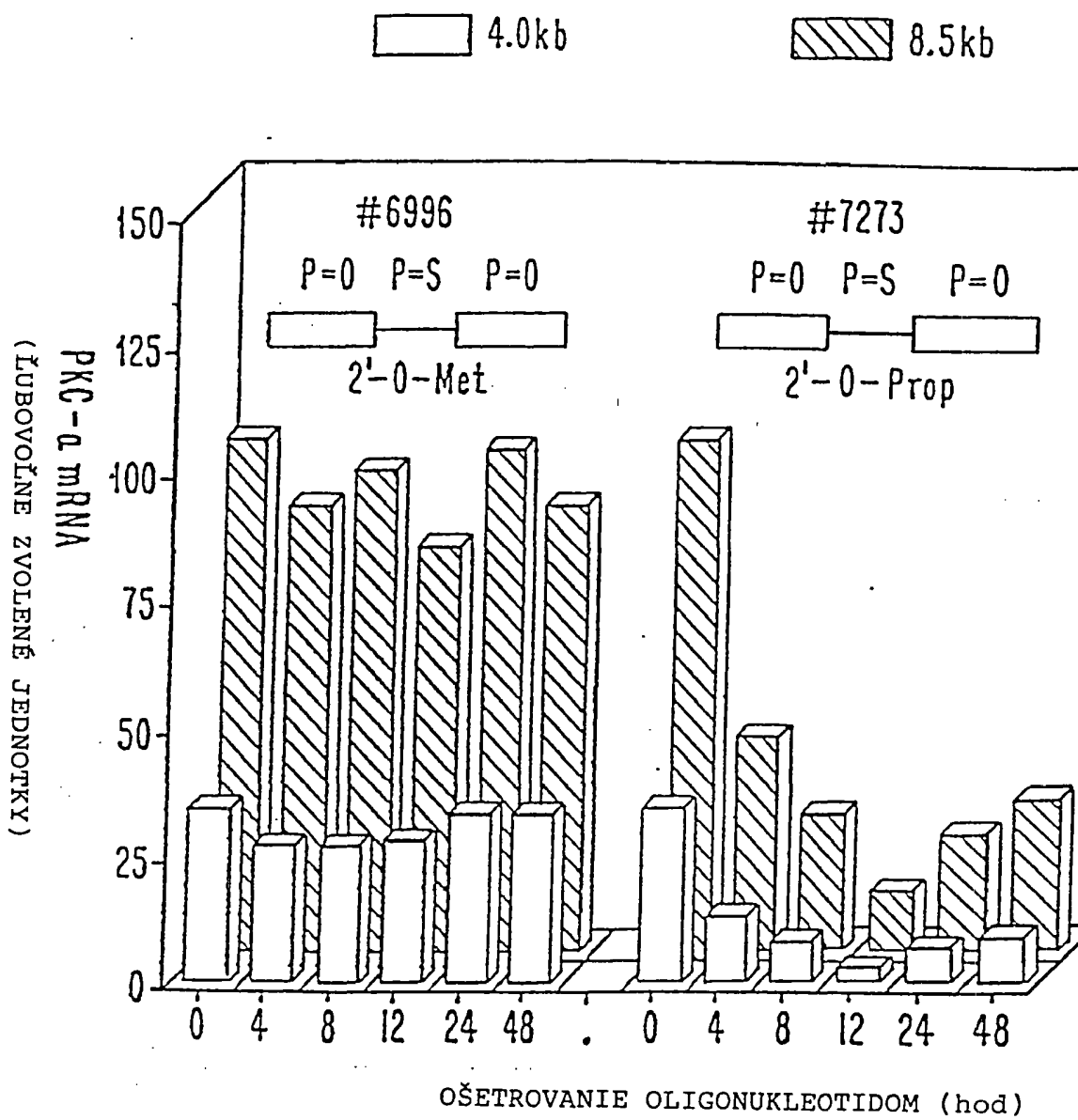
OBR. 2



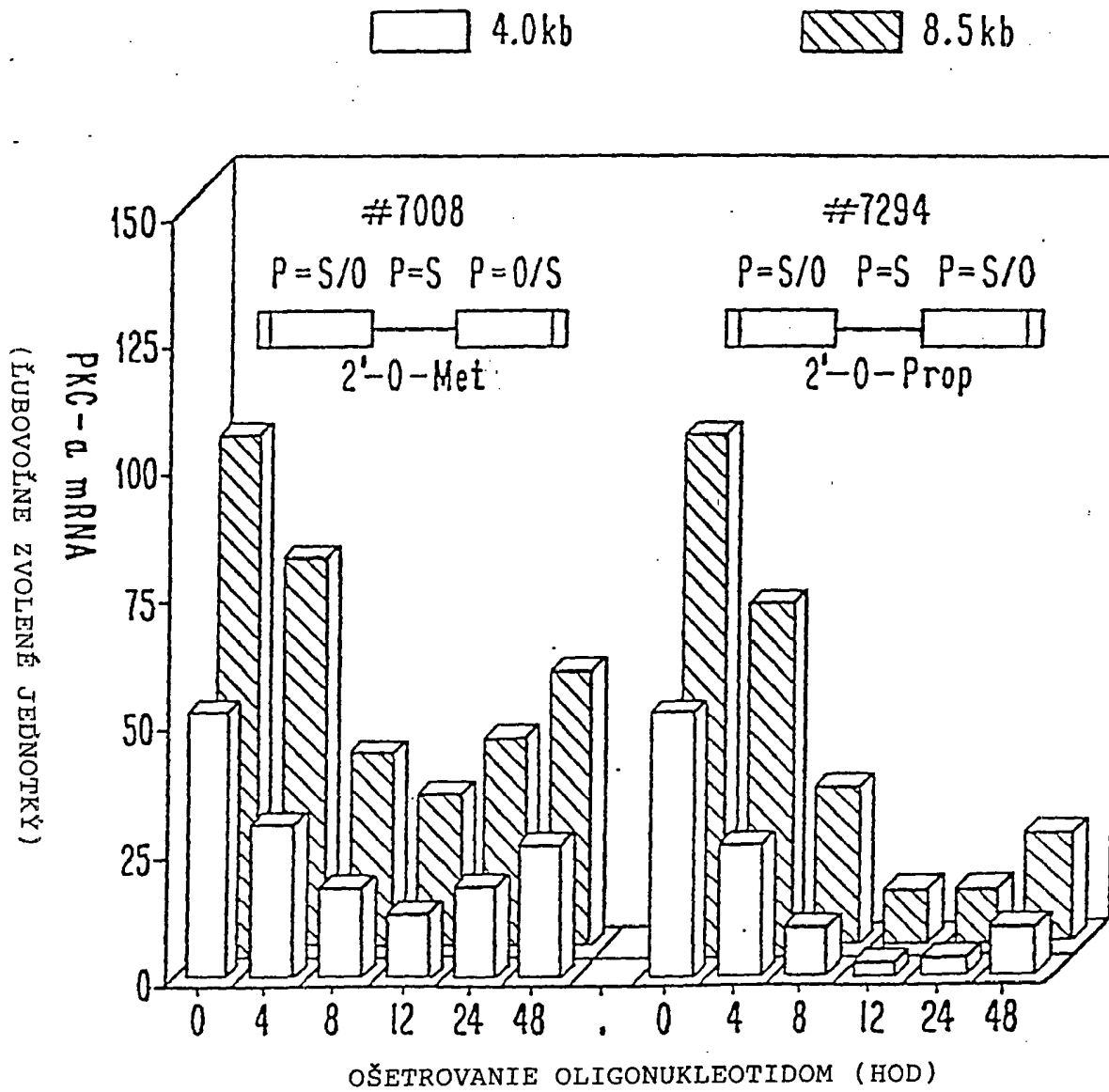
OBR. 3



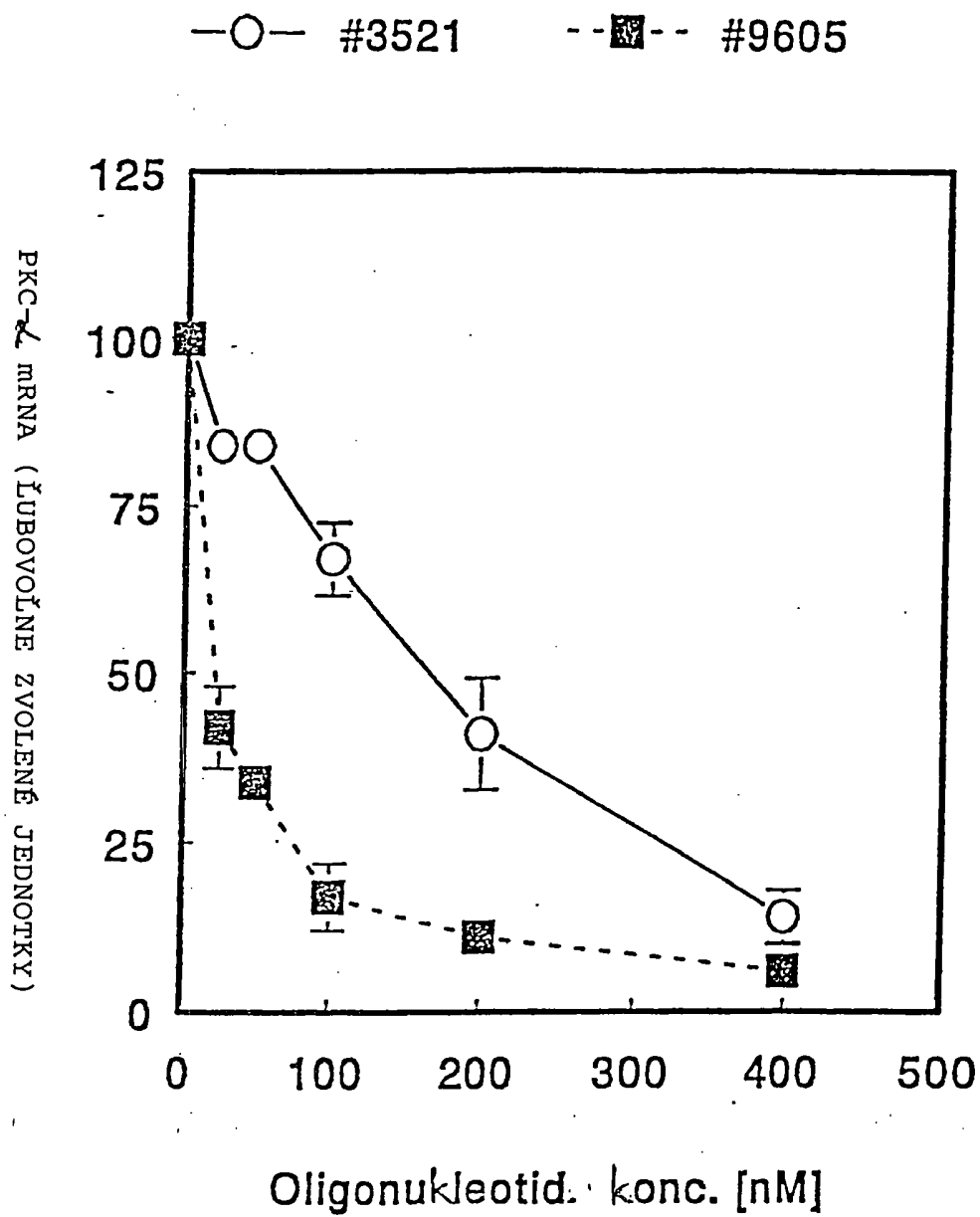
OBR. 4

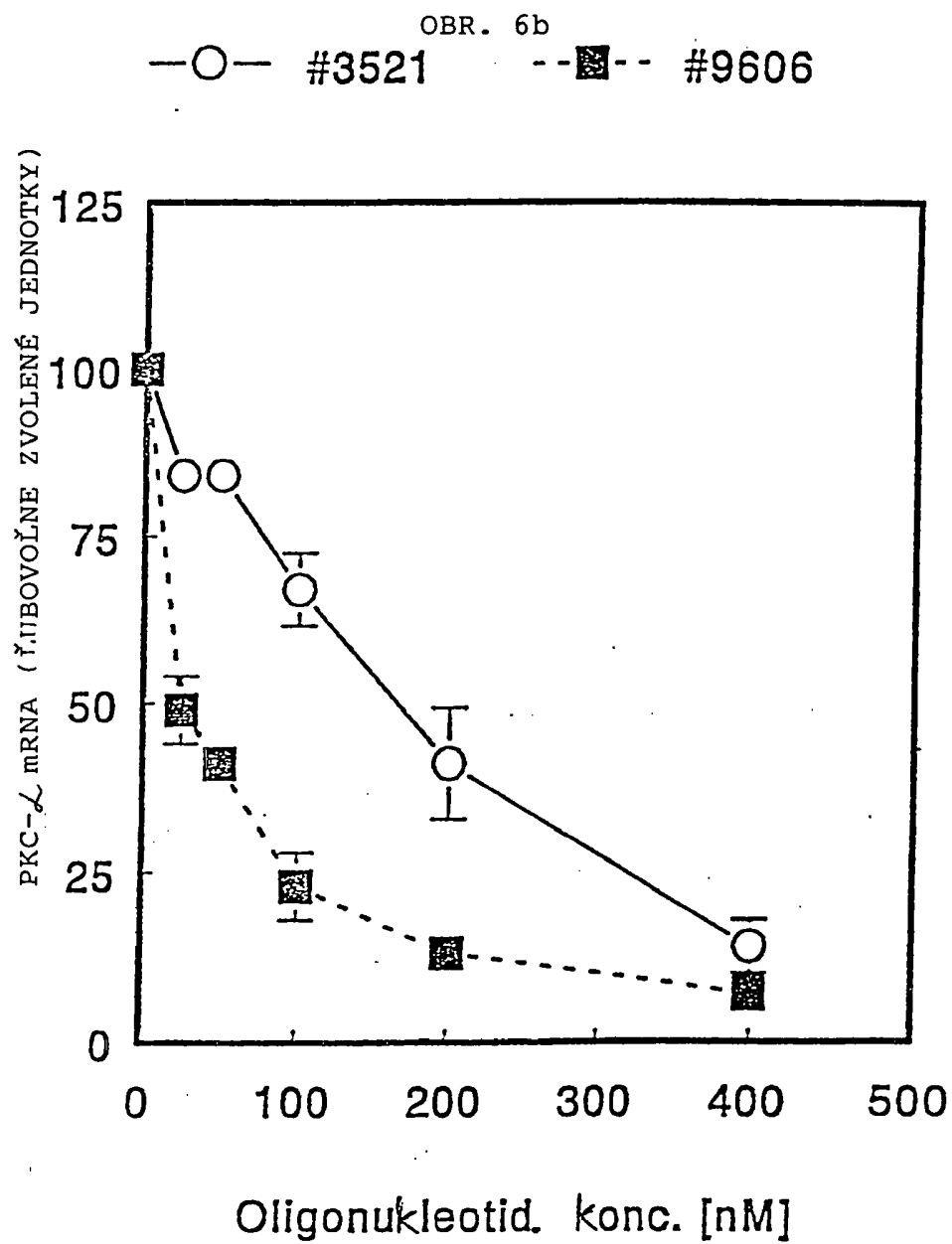


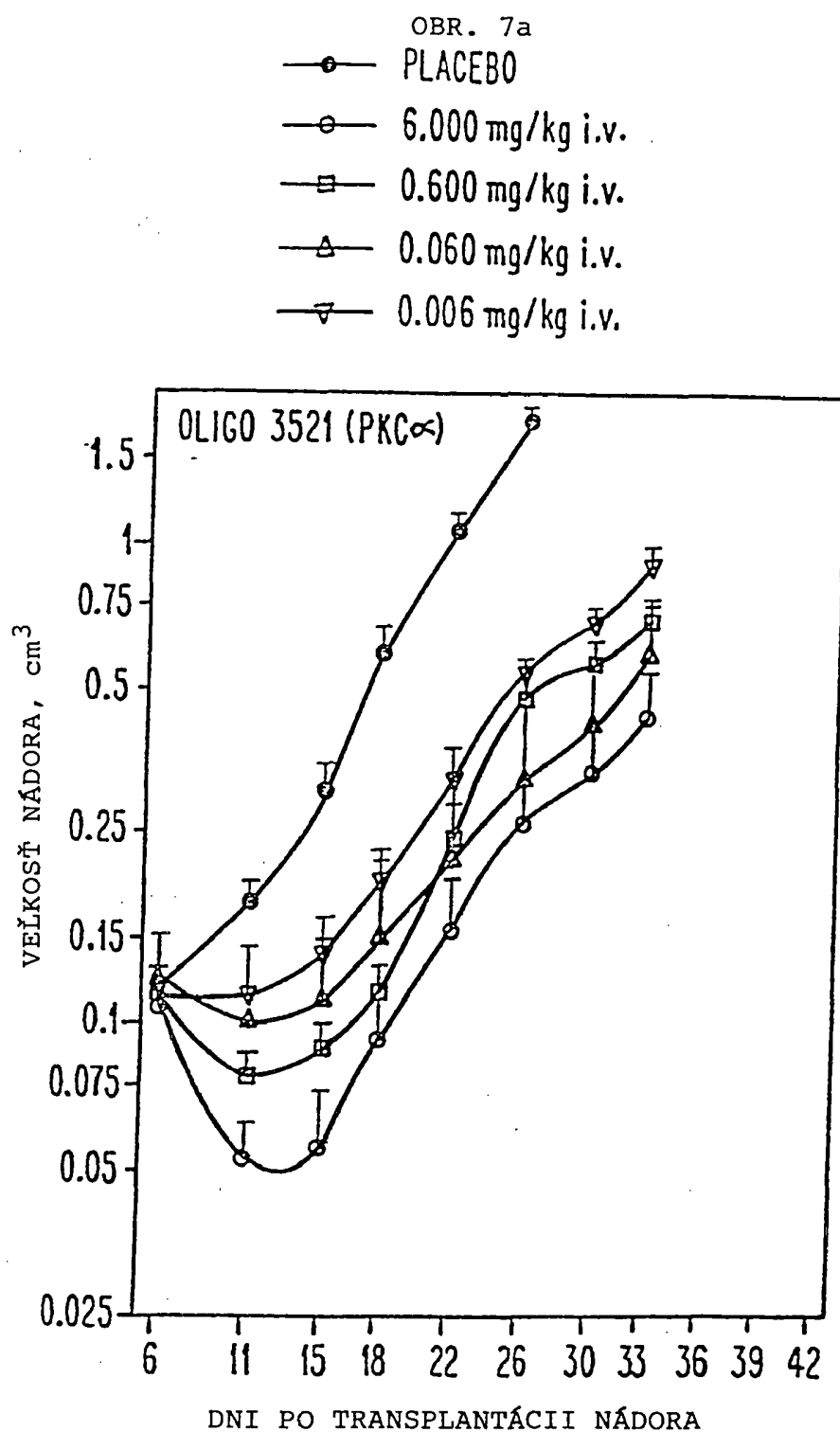
OBR. 5



OBR. 6a

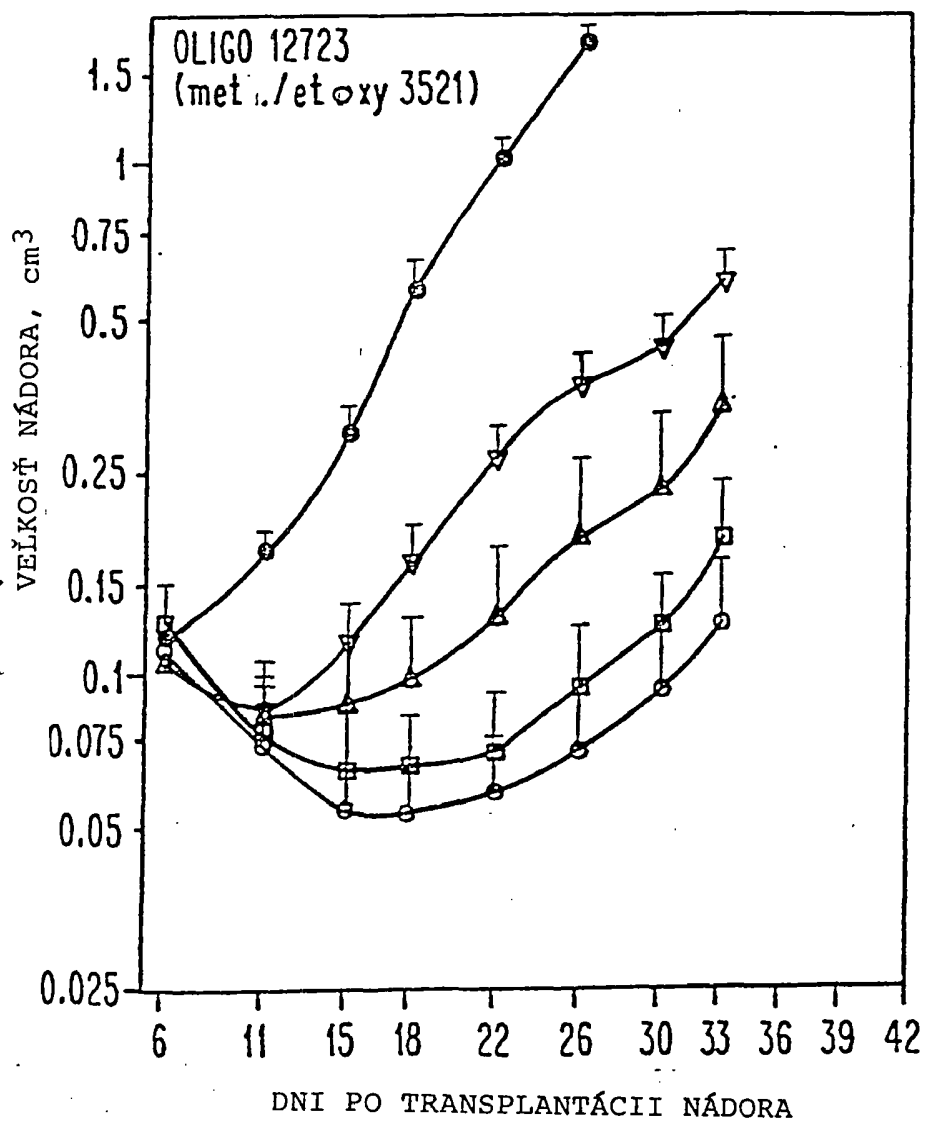




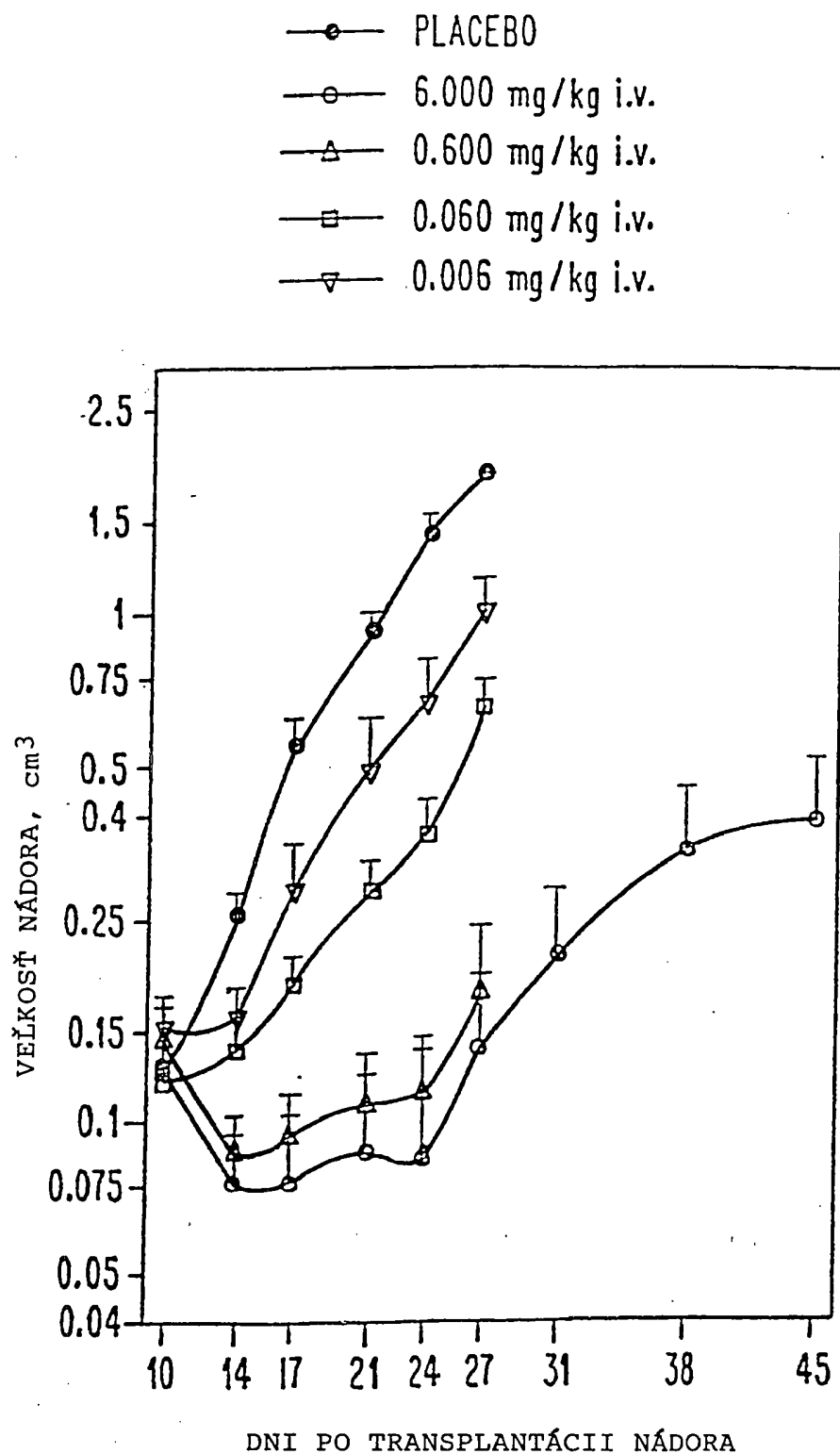


OBR. 7b

- PLACEBO
- 6.000 mg/kg i.v.
- 0.600 mg/kg i.v.
- △— 0.060 mg/kg i.v.
- ▽— 0.006 mg/kg i.v.

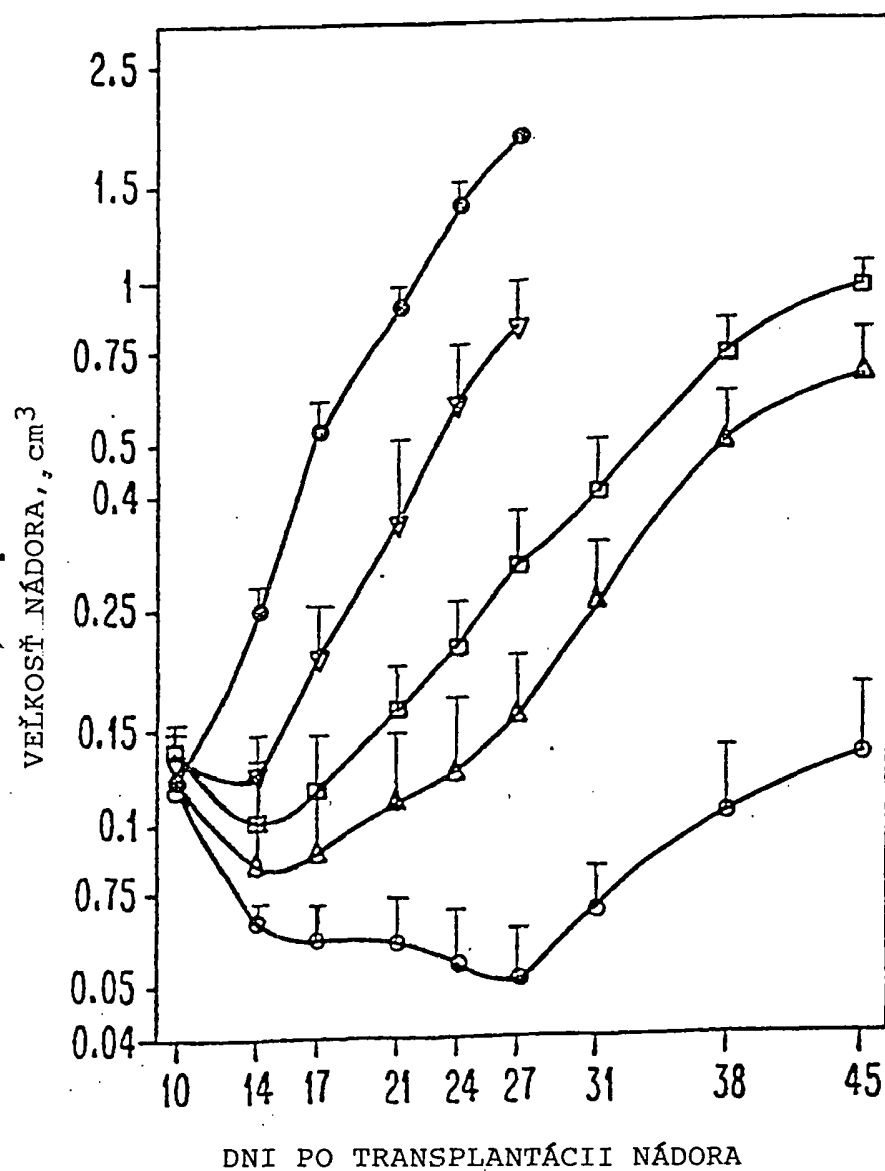


OBR. 8a

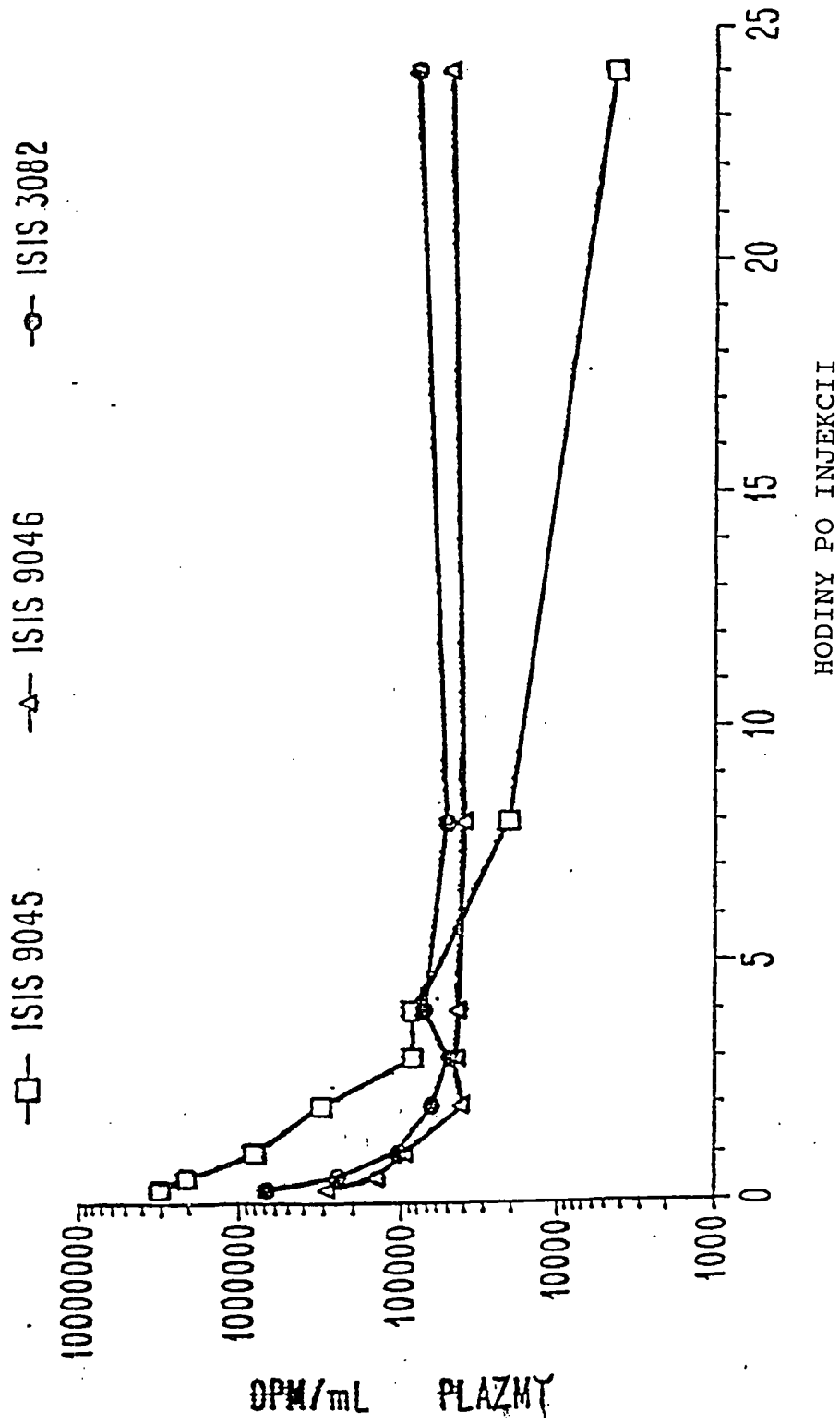


OBR. 8b

- PLACEBO
- 6.000 mg/kg i.v.
- △— 0.600 mg/kg i.v.
- 0.060 mg/kg i.v.
- ▽— 0.006 mg/kg i.v.



OBR. 9



OBR. 10

