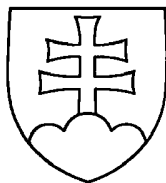


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA
VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania: 19.12.1997
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 60/034 509
(32) Dátum priority: 27.12.1996
(33) Krajina priority: US
(40) Dátum zverejnenia: 11.07.2000
(86) Číslo PCT: PCT/US97/23927, 19.12.1997

(21) Číslo dokumentu:

845-99

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.7 :

C 07H 21/02
A 01N 43/04
C 12Q 1/68

(71) Prihlasovateľ: ICN PHARMACEUTICALS, INC., Costa Mesa, CA, US;

(72) Pôvodca vynálezu: Tam Robert, Irvine, CA, US;

(74) Zástupca: Patentservis Bratislava, a. s., Bratislava, SK;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Aptamér**

(57) Anotácia:

Opísané sú aptaméry s dĺžkou 12 až 22 jednotiek nukleových kyselín so sekvenciou, ktorá obsahuje aspoň dve oblasti bohaté na G vybrané zo skupiny GGnG, GGGG, GnGG, nGGG a GGn, kde G je guanozín a symbol n je ľubovoľný nukleotid. Aptaméry sa špecificky viažu na väzbové miesto proteínov, ako je Sp1 a proteíny príbuzné Sp1, ktoré je určené pre DNA. Uvedené proteíny regulujú gény, ktoré kódujú kostimulačné molekuly, ako je CD28, a cytokíny, ako je IL-2 a GMCSF. Oligonukleotidy sa uchádzajú o väzbové miesta regulačných proteínov určené pre DNA, ktoré špecificky regulujú molekuly, aby došlo k útlmu aktivácie T-buniek. To spôsobuje útlm expresie génu tým, že sa predchádza jeho transkripcii. Aptaméry sa používajú pri liečení chorôb, ktoré zahŕňajú abnormálnu aktiváciu T-buniek, ako je lupienka, cukrovka typu I (závislá od inzulínu), roztrúsená skleróza, zápal uveálneho traktu, reumatický zápal kĺbov, lupus erythematoses, zápalové ochorenie čriev (Crohnova choroba a vredovitý zápal hrubého čreva), septický šok a pri regulácii normálnej aktivácie T-buniek, ako je odmietnutie aloimplantátov.

Aptamér

Oblasť techniky

Vynález sa týka odboru imunológie.

Doterajší stav techniky

Patogenéza a aktivácia mnohých bežných ochorení sprostredkovaných T-bunkami vzniká na základe nesprávnej imunitnej odpovede spôsobenej abnormálnou aktiváciou T-buniek. Uvažuje sa, že mnoho ďalších ochorení spôsobených abnormálnou aktiváciou T-buniek zahŕňa cukrovku typu I (závislá na inzulíne), zápal štítnej žľazy, sarkoidózu, roztrúsenú sklerózu, zápal uveálneho traktu, reumatický zápal kĺbov, lupus erythematoses, zápalové ochorenie čriev (Crohnova choroba a vredovitý zápal hrubého čreva) a aplastickú anémiu. Okrem toho veľa syndrémov, ako septický šok a nádorom indukovaná kachexia, môže zahŕňať aktiváciu T-buniek a zvýšenú produkciu potencionalneho toxického množstva lymfokínov. Normálna aktivácia T-buniek tiež spôsobuje odmietnutie transplantovaných buniek a orgánov tým, že T-bunky produkujú potrebné signály pre účinné zničenie cudzorodého tkaniva darcu.

Aktivácia T-lymfocytov, ktorá spôsobuje proliferáciu T-buniek a expresiu génu a vylučovanie imunomodulačných cytokínov, si vyžaduje dva nezávislé signály. Prvý signál predstavuje rozoznanie antigénu, ktorý tvoria molekuly hlavného histokompatibilného komplexu na povrchu buniek ako antigén (APC), pomocou komplexu receptor špecifický pre T-bunky/CD3. Druhý signál, ktorý pôsobí pri regulácii odpovede T-bunky na antigén, tvorí intracelulárne interakcie medzi T-bunkami a APC, ktoré nie sú antigénne špecifické. Tieto sekundárne, alebo ko-stimulačné signály, určujú intenzitu odpovede T-buniek na antigén. Ko-stimulované bunky reagujú zosilnením

transkripcie génu pre špecifický cytokín a stabilizáciou vybranej mRNA. Aktivácia T-buniek v prípade, že sa neuskutoční ko-stimulácia, spôsobí zastavenie odpovede T-buniek. Jeden kľúčový ko-stimulačný signál vzniká interakciou povrchového receptora T-bunky CD28 s molekulami príbuznými s B7 na APC (Linsley a Ledbetter (1993) Annu. Rev. Immunol. 11: 191-212). CD28 sa konštitutívne exprimuje u 95 % T-buniek CD4⁺ (ktoré pôsobia ako pomocník pri produkcii protilátok v B-bunkách) a 50 % T-buniek CD8⁺ (ktoré majú cytotoxické funkcie) (Yamada a spol. (1985) Eur. J. Immunol 15: 1164-1168). Nasleduje antigénna alebo *in vitro* mitogénna stimulácia, potom dochádza k indukcii povrchového CD28, rovnako ako k produkcii určitých imunomodulačných cytokínov. Tieto cytokíny zahŕňajú interleukín-2 (IL-2), ktorý je potrebný pri bunkovom cykle T-buniek, interferon-gama (IFN γ), ktorý vykazuje rôzne antivírusové a protinádorové účinky a interleukín-8 (IL-8), ktorý je známy ako chemotaktický faktor v prípade neutrofilov a lymfocytov. Ukázalo sa, že tieto cytokíny sú regulované dráhou CD28 aktivácie T-buniek (Fraser a spol. (1991) Science 251: 313-316, Seder a spol. (1994) J. Exp. Med. 179: 299-304, Wechsler a spol. (1994) J. Immunol. 153: 2515-2523). IL-2, IFN γ a IL-8 majú podstatný význam pri podpore širokého rozsahu imunitnej odpovede a ukázalo sa, že sa nadmerne exprimujú v štádiách mnohých ochorení, ktoré sprostredkujú T-bunky.

V prípade ochorenia lupienky léziou aktivované T-bunky prevážne uvoľňujú cytokíny Th1, ako sú IL-2 a IFN γ (Schlaak a spol. (1994) J. Invest. Derm. 102: 145-149). Tieto vylučované cytokíny indukujú, že normálne keratinocyty exprimujú rovnaký fenotyp (HLA DR⁺/ICAM-1⁺), ako sa nachádza v léziách lupienky (Baadsgaard a spol. (1990) J. Invest. Derm. 95: 275-282). IL-8 tiež pôsobí *in vivo* a *in vitro* zápalovou odpoveďou, a keďže

je vylučovaný vo veľkom množstve aktivovanými T-bunkami a keratinocytmi, ktoré pochádzajú z lézií lupienky, považujú sa za hlavný faktor patogénnych zmien, ktoré možno spozorovať na koži postihnutej lupienkou, ako je napríklad hyperproliferačia keratinocytov. Ukázalo sa, že jeden z rodiny receptorov B7 (prirodzené ligandy CD28 nájdené na APC) BBI, sa exprimuje v keratinocytoch pochádzajúcich z lézie lupienky, ale nie je exprimovaný neinfikovanými kožnými keratinocytmi (Nickoloff a spol. (1993) Am. J. Pathology 142: 1029-1040). Táto skutočnosť poukazuje na dôležitú úlohu aktivácie T-buniek v patogenéze chorôb.

V prípade iných porúch kože sprostredkovaných T-bunkami, ako je alergická kontaktná dermatitída a plošná lišaj, väčšina dermálnych a epidermálnych T-buniek CD3⁺ exprimuje vo veľkom množstve CD28, ale u normálnej kože a karcinóme bazálnych buniek (je to kožné ochorenie, ktoré nie je sprostredkované T-bunkami) sa CD28 exprimuje len v perivaskulárnych T-bunkách. Podobne v prípade alergickej kontaktnej dermatitídy a plochej lišaje sa zistila expresia B7 u dermálnych dendritických buniek, dermálnych APC a u keratinocytov, ale nie v prípade normálnej kože a karcinómu bazálnych buniek (Somon a spol. (1994) J. Invest. Derm. 103: 539-543). To znamená, že dráha CD28/B7 je dôležitým mediátorom kožných ochorení, ktorých sprostredkovateľom sú T-bunky.

Chybné aktivácie T-buniek spojené s určitým autoimunitným ochorením, ktoré sú spôsobené stratou vlastnej tolerance, sa väčšinou charakterizujú prítomnosťou T-buniek CD28⁺ a expresiou ich ligandu B7 na aktivovaných APC (monocyty, makrofágy alebo dendritické bunky). Tieto ochorenia sú autoimunitný Gravevov zápal štítnej žľazy (Garcia-Cozar a spol. (1993) Immunologia 12, 32), sarkoidoza (Vandenberghe a spol. (1993) Ont. Immunol. 5: 317-321), reumatická artritída

(Verwilghen a spol. (1994) J. Immunol. 153: 1378-1385) a lupus erythematosus (Sfikakis a spol. (1994) Clin. Exp. Immunol. 96: 8-14). Pri normálnej aktivácii T-buniek, ktoré spôsobujú odmietnutie transplantovaných buniek a orgánov, je pri spustení receptora T-buniek kritické naviazanie CD28 na svoj vhodný ligand B7 počas, za účelom dosiahnutia alogénnej odpovede na cudzie antigény, napríklad darované tkanivo (Azuma a spol. (1992) J. Exp. Med. 175: 353-360, Turka a spol. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 11102-11105).

Tradičné liečenie autoimunitných ochorení nepredbieha aktiváciu T-buniek, čo je účinný krok pri autoreaktívnych imunitných odpovediach na vlastný antigén. Lieky, ako sú steroidy a nesteroidné protizápalové lieky (NSAIDS) sa v súčasnosti používajú na zmiernenie symptómov, ale nezabránia postupu ochorenia. Okrem toho steroidy môžu mať vedľajšie účinky, ako sú osteoporóza, cukrovka a sú toxické pre orgány, môžu tiež urýchliť degeneračný proces chrupaviek a spôsobujú tak zvané post-infekčné sčervenanie do 2 až 8 hodín. NSAIDS môžu spôsobovať vedľajšie účinky v gastrointestinálnom trakte a zvyšujú nebezpečenstvo agranulocytózy a jatrogénnej hepatitídy.

Ako jedna forma liečenia sa tiež používajú imunosupresívne lieky, predovšetkým v pokročilých štádiách chorôb. Tieto lieky tlmia celý imunitný systém a liečba má ťažké vedľajšie účinky, ako vysoký krvný tlak a nefrotoxicita. Ani imunosupresívne činidlá, ako je cyklosporín a FK506 nemôžu inhibovať dráhu aktivácie T-buniek závislú na CD28 (Juné a spol. (1987) Mol. Cell Biol. 7: 4472-4481).

V súčasnosti sa ako antigény, ktoré spôsobujú aktiváciu T-buniek používajú syntetické peptidy, monoklonálne protilátky a rozpustné formy molekúl aktivácie T-buniek. Dosiaľ sa neidentifikovali pre molekuly aktivácie T-buniek, ako je

CD28, CD40L a rodina CAM adhézných molekúl, konkurenčné syntetické peptidy. Ukázalo sa, že monoklonálne protilátky (mAb) majú pravdepodobne terapeutický účinok pri ochoreniach sprostredkovaných T-bunkami, ako je lupienka (anti-CD4 (Prinz a spol. (1994) Lancet 338: 320-321)) a pri imunosupresii normálnej aktivácie T-buniek u aloimplantátov (anti-VCAM-1 a VLA-4 (Isobe a spol. (1994) J. Immunol. 153: 5810-5818)). V prípade chronického liečenia si hostiteľské zviera vyvinie protilátky proti monoklonálnym protilátkam, čo obmedzuje ich použitie. Vyvinuli sa „humanizované“ monoklonálne protilátky, ktoré výrazne znižujú nebezpečenstvo indukovanej imunitnej odpovede na tieto monoklonálne protilátky. Tieto humanizované monoklonálne protilátky sú stále v štádiu vývoja a okrem toho sú tvorené veľkými proteínmi a preto môže byť obtiažné, aby dosiahli cieľové miesto. Vyvinuli sa rozpustné formy molekúl aktivácie T-buniek, ako je CTLA-4Ig, ktoré obsahujú extracelulárnu oblasť ľudského génu CTLA-4 (ktorá je v podstate príbuzná CD28) vo fúzii s reťazcom ľudského IgG_γ. Ukázalo sa, že CTLA-4Ig špecificky blokuje aktiváciu normálnych T-buniek a tak sa predchádza odmietnutiu xenogénnych (Lenschow a spol. (1992) Science 257: 789-792) a alogénnych (Turka a spol. (1992) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89: 11102-11105) srdcových aloimplantátov u potkanov a ďalej má terapeutický účinok pri chybnjej aktivácii T-buniek, ako sa zistilo napríklad v prípade autoimunitnej glomerulonefritídy (Nishikawa a spol. (1994) Eur. J. Immunol. 24: 1249-1254). Rozpustný CTLA-4Ig má však podobné obmedzenia ako monoklonálne protilátky a okrem toho ich príprava je nákladná. Skutočná funkcia molekuly podobnej CD28 nie je známa, preto skôr ako sa budú hodnotiť akékoľvek výhody liečby, je nutné určiť tieto funkcie.

Pri inhibícii expresie CD28 na bunkovom povrchu nedochádza počas dlhšej doby k odpovedi, alebo nastane delécia

aktivovaných T-buniek. Deaktivácia predchádza proliferácii T-buniek a zastavuje T-bunkovú špecifickú produkciu špecifických imunoregulačných cytokínov, ako je interleukín-2, interferón-gama a interleukín-8.

Regulácia expresie génu CD28 môže byť dosiahnutá za použitia antimediatorových oligonukleotidov, ktoré tvoria triplexy, pomocou hybridizácie oligodeoxyribonukleotidov alebo oligoribonukleotidov so sekvenciami DNA alebo RNA v géne CD28 alebo v oblasti promotora (popisuje sa v publikácii PCT/US96/01507, podaná 30. augusta 1996). Použitím oligonukleotidov sa vyhne mnohým ťažkostiam spojených s činidlami, ktoré sa používajú pri blokovaní účinkov normálnej a abnormálnej aktivácie T-buniek. Tieto oligonukleotidy, ktoré sa pripravili pre účely antimediatorovej stratégie, sú náchylné k degradácii vnútrobunkovými nukleázami alebo nukleázami, ktoré sa nachádzajú vo vonkajšom prostredí bunky.

Zistilo sa, že naviazanie DNA (alebo RNA) na proteín je základná cesta, ktorou je riadená transkripcia génu. Tieto regulačné proteíny alebo transkripčné faktory rozoznávajú sekveniu DNA, ktoré majú špecifickú sekundárnu štruktúru a nasledujúce interakcie môžu viesť k pozitívnej a negatívnej kontrole expresie génu. Aptaméry sú krátke oligonukleotidové sekvencie, ktoré sa môžu špecificky viazať na špecifické proteíny. Ukázalo sa, že rôzne aptamérové sekvencie môžu špecificky viazať rôzne proteíny. Napríklad sekvencia GGNNGG, kde symbol N je guanozín (G), cytozín (C), adenozín (A) alebo tymidín (T) a špecificky sa viaže na trómbín (popísané v publikácii Bock a spol. (1992) Nature 355: 564-566 a v patente č. 5582981 (1996) (Toole a spol.).

Aptamérové sekvencie sa nepopisujú, ale môžu byť účinné ako konkurenčné inhibítory miest viažucích DNA na regulačných proteínoch, ktoré sú známe ako transkripčné faktory. Trans-

kripčné faktory sú triedou proteínov, ktoré regulujú gény primárnym naviazaním na špecifické regulačné sekvencie nachádzajúce sa v smere 5' zakončenia promótorovej oblasti týchto génov. Táto interakcia vedie k iniciácii transkripcie. Niektoré transkripčné faktory ako je Sp1, AP2, AP-1, EGR-1 a NFkB, sú kritické pri aktivácii T a B lymfocytov (Skerka a spol. J. Biol. Chem. 270: 225000-22506, Jung a spol. (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci. 766: 245-252). Niekedy sa tieto transkripčné faktory vyvolávajú signálmi iniciovanými následnou ko-stimuláciou (Jung a spol. (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci. 766: 245-252). Stále existuje potreba vyvinúť činidlá a spôsoby, ktoré by zabránili interakcii proteínu so špecifickým DNA väzobným miestom, ktoré by spôsobili supresiu určitej imunitnej dráhy zahŕňajúcu ko-stimulačnú dráhu.

Podstata vynálezu.

Vynález popisuje aptaméry, ktorých dĺžka sa pohybuje medzi 12 až 22 jednotkami nukleovej kyseliny vrátane. Sekvencie, ktoré zahŕňujú aspoň dve oblasti bohaté na G, sa vybrali zo skupiny obsahujúcej GGnG, GGGG, GnGG, nGGG a GGGn, kde symbol G je guanidín a symbol n je ľubovoľný nukleotid.

Vo výhodnom uskutočnení vynálezu sa navrhujú oligonukleotidy tak, aby viazali špecifické regulačné proteíny, ako je Sp1 a proteíny príbuzné Sp1, a pôsobili tak, že konkurujú väzbe týchto transkripčných faktorov na promótorovú oblasť génov, ktoré kontrolujú. Táto skutočnosť slúži pre moduláciu génovej expresie tým, že sa predchádza transkripcii génu. Potom aptamérové oligonukleotidy sú schopné inhibovať funkciu RNA alebo DNA, buď ich transláciu na proteín, ich translokáciu do cytoplazmy alebo ich ľubovoľnú aktivitu potrebnú pre ich biologické funkcie. Keď RNA alebo DNA nie je schopná uskutočniť všetky alebo časť svojich funkcií, spôsobuje to

poruchu časti genómu, ktorý riadi aktiváciu T-buniek. Genóm nie je správne exprimovaný, a tak nemôže modulovať uvedený metabolizmus.

Je výhodné, aby cieľová aptamérová nukleová kyselina sa uchádzala o miesta regulačných proteínov viažucich DNA, ktoré špecificky regulujú molekuly, ktoré môžu tlmiť aktiváciu T-buniek. Zistilo sa, že pre tieto účely je obzvlášť vhodné použiť proteín CD28. Očakáva sa, že inhibíciu CD28 a expresiu génu príbuzného CD28 je možné použiť pri liečení lupienky a iných ochorení kože, syndrémov spojených s abnormálnou aktiváciou T-buniek, porúch autoimunity a odmietnutie aloimplantátov.

Spôsoby podľa vynálezu zahŕňajú utlmenie aktivácie T-buniek tak, že pacient sa dostane do kontaktu s oligonukleotidom, ktorý konkuruje miestu viažucemu DNA regulačného proteínu, čím sa inhibuje expresia regulovaného proteínu, ktorý je známy, že je schopný tlmiť aktiváciu T-buniek. Výhodné sú oligonukleotidy, ktoré sa viažu na proteíny, ako je Sp1 a proteíny príbuzné Sp1, ktoré regulujú transkripciu CD28 a génov príbuzných CD28.

Vynález ďalej popisuje aplikáciu aptamérov za účelom liečenia ochorení, ktoré sú spôsobené abnormálnou aktiváciou T-buniek, ako je lupienka, lupienka aktivovaná AIDS alebo iné kožné ochorenia, cukrovka typu I (závislá na inzulíne), zápal štítnej žľazy, sarkoidóza, roztrúsená skleróza, autoimunitný zápal uveálneho traktu, reumatický zápal kĺbov, lupus erythematosus, zápalové ochorenia čriev (Crohnova choroba a vredovitý zápal hrubého čreva), septický šok, nádorom indukovaná kachexia a aplastická anémia. Ďalej sa aptaméry môžu použiť pri regulácii normálnej aktivácie T-buniek, čo je potrebné v prípade odmietnutia aloimplantátov. Je to možné dosiahnuť pertubáciami pri syntéze a expresii molekúl aktivácie T-buniek, ktoré zahŕňajú CD28 a molekuly príbuzné CD28.

Vynález ďalej popisuje aptaméry, ktoré sú schopné viazať špecifické regulačné proteíny, ako je Sp1 a proteíny príbuzné Sp1. Týmto spôsobom inhibujú transkripciu génov proteínu CD28 alebo proteínov príbuzných CD28, ktoré a) sú v normálnom prípade regulované uvedenými proteínmi a b) môžu modulovať odpovede T-buniek.

Aptamérové oligonukleotidy, ktoré sa špecificky viažu na väzobné miesta pre DNA regulačných proteínov, ako je Sp1 a proteíny príbuzné Sp1, tak zabránia naviazaniu regulačného proteínu na špecifickú dvojreťazcovú oblasť DNA v promotrovej oblasti génu. Konkurenčné naviazanie aptaméru bude brániť transkripcii génu, a tak bude inhibovať tok genetických informácií z DNA na proteín. Vlastnosti oligonukleotidov, ktoré ich robí špecifickými voči ich cieľu, ich tiež robí univerzálnymi. Vzhľadom k tomu, že oligonukleotidy sú dlhé reťazce tvorené štyrmi monomérnymi jednotkami, môžu sa ľahko syntetizovať pre ľubovoľnú cieľovú sekvenciu RNA.

Inhibícia expresie génu sprostredkovaná oligonukleotidom sa dokázala v mnohých modeloch a v *in vitro* modeloch a vykazuje liečebný potenciál, ako nová stratégia pre liečenie mnohých ľudských ochorení (Uhlmann a Peyman (1990) Chem. Rev. 90: 544-584, Zon a Stec (1991) Oligonucleotides and analogues- A Practical Approach: 87-108, Miller a spol. (1981) Biochem 20: 1874-1880, Orson a spol. (1991) Nucleic Acid Res. 19: 3435-3441, Helene a Toulme (1990) Biochem. Biophys. Acta 1049: 99-125, Thierry a Dritschilo (1992) Nucleic Acid Res. 20: 5691-5698). Vzhľadom na určité výhody syntézy oligonukleotidov rezistentných voči nukleázam, pričom oligonukleotidy zahŕňajú fosforotioaty (popísané v publikácii Zon a Stec (1991) Oligonucleotides and analogues- A Practical Approach: 87-108) a fosforotioat-3'-hydroxypropylamín (uvedené v publikácii Tam a spol. (1994) Nucleic Acid Res. 22: 977-

968) a ich lepšie pohlcovanie bunkami, je teraz možné považovať použitie oligonukleotidov za novú formu terapeutických činidiel.

Aptamérové nukleotidy cielené do väzobných miest regulačných proteínov predstavujú alternatívnu triedu zlúčenín založených na nukleovej kyseline a poskytujú riešenie problémov, s ktorými sa potýka súčasný stav techniky. Aptamérové oligonukleotidy sa priamo podieľajú na modulácii špecifickej expresie génov, a tak zastavujú expresiu cieľového proteínu. Aptamérové oligonukleotidy nevykazujú konkurenčnú inhibíciu rozpustných receptorov cieľového proteínu. Jedná sa o interakcie, kde je potrebné úplne rozumieť väzobným mechanizmom a afinitnej interakcii receptor-ligand. Oligonukleotidy sú malé molekuly, a preto sa nevyskytujú rovnaké stericke problémy, ako u veľkých molekúl inhibítorov.

Popis cieľov

Termín „ciele“ tu znamená molekuly, ktoré sa môžu regulovať transkripčnými faktormi, ktoré majú dôležitú úlohu pri iniciácii a udržovaní imunitnej odpovede. Tieto molekuly zahŕňajú ko-stimulačné molekuly, ako je CD28 a cytokíny, ako je IL-2, GM-CSF a IFN γ .

Pre účely liečenia sa zvieratám, o ktorých sa predpokladá že sú choré, ktoré je možné liečiť zoslabením expresie ko-stimulačných molekúl, ako je CD28 alebo molekúl príbuzných CD28, sa môžu aplikovať oligonukleotidy podľa tohoto vynálezu. Oligonukleotidy sa môžu začleniť do farmaceutickej formy, ktorá môže obsahovať nosiče, zahusťovadlá, rozpúšťadlá, pufre, konzervačné činidlá, povrchovo aktívne činidlá, lipozómy a lipidové látky a podobne. Farmaceutické kompozície môžu tiež obsahovať jednu alebo viac aktívnych zložiek, ako sú antimikrobiálne činidlá, protizápalové činidlá, anestetiká a podobne.

Farmaceutická kompozícia sa aplikuje rôznymi spôsobmi podľa toho, či je potrebná lokálna alebo systémová liečba a v závislosti od oblasti liečby. Aplikácia môže byť povrchová (oko, vagína, rektum, nos), orálna, inhaláciou alebo parenterálne napríklad intravenózne, podkožne, intraperitoneálne alebo intramuskulárnou injekciou.

Kompozícia vhodná pre povrchovú aplikáciu môže zahŕňať masti, mlieka, krémy, gély, kvapky, čípky, spreje, roztoky a púder. Bežné farmaceutické nosiče, vodné, práškové alebo olejové základy, zahusťovadlá a podobne, podľa toho, čo je potrebné alebo požadované. Tiež sa môžu používať potiahnuté kondómy alebo rukavice.

Kompozície vhodné pre orálnu aplikáciu zahŕňajú prášky alebo granule, suspenzie alebo roztoky vo vodnom alebo nevodnom médiu, kapsule alebo tablety. Môžu byť tiež potrebné zahusťovadlá, aromatizačné prísady, riedidlá, emulgátory, disperzné činidlá alebo pojivá.

Prostriedky vhodné pre parenterálne podávanie môžu zahŕňať vodné roztoky, ktoré obsahujú pufre, lipozómy, riedidlá a iné vhodné prísady.

Dávkovanie závisí na závažnosti stavu, ktorý sa lieči a na odpovedi na liečenie. V normálnom prípade sa podáva jedna alebo viac dávok denne, pričom priebeh liečby trvá niekoľko dní až mesiacov, alebo do chvíle, keď je liečba účinná, alebo sa zmierni stav ochorenia. Odborníci môžu ľahko stanoviť optimálne dávky, spôsob dávkovania a interval opakovania.

Pri systémovej aplikácii aptamérov je výhodná intravenózna aplikácia, pričom dávka je 5 mg/kg a podáva sa jedenkrát denne. Pri povrchovej aplikácii sa aptaméry výhodne podávajú v podobe 1 až 5 % roztoku jedenkrát denne. Pri pulmonálnej aplikácii sa výhodne aptaméry podávajú v podobe aerosólu v dávke 5 mg jedenkrát denne.

Vynález popisuje aptamérové oligonukleotidy vhodné pre použitie pri inhibícii funkcie RNA a DNA, ktorá zodpovedá proteínu schopnému modulovať aktiváciu T-buniek. Podľa vynálezu výraz „oligonukleotid“ znamená oligomér alebo polymér ribonukleovej kyseliny alebo deoxyribonukleovej kyseliny. Tento výraz zahŕňa oligoméry obsahujúce prirodzene sa vyskytujúce bázy, sacharidy a vnútorné kostry sacharidov, rovnako ako oligoméry, ktoré obsahujú časti s podobnou funkciou, a ktoré sa prirodzene nevyskytujú. Takéto upravené alebo substituované oligonukleotidy sú často výhodnejšie ako prirodzené formy vzhľadom k ich vlastnostiam, ako napríklad zvýšené pohlcovanie bunkami a väčšia stabilita v prítomnosti nukleáz.

Oligonukleotidy podľa vynálezu výhodne obsahujú približne 3 až 50 jednotiek báz nukleových kyselín. Takéto oligonukleotidy výhodne obsahujú približne 8 až 30 jednotiek báz nukleových kyselín a najvýhodnejšie je, aby oligonukleotidy obsahovali približne 12 až 22 jednotiek báz nukleových kyselín. Je výhodné, aby bázo-ová jednotka nukleovej kyseliny bola kombináciou báza-sacharid, ktorá je vhodne naviazaná na vedľajšiu jednotku báza nukleová kyselina prostredníctvom fosfodiesterovej alebo inej väzby.

Oligonukleotidy, ktoré sa používajú v súlade s predkladaným vynálezom sa môžu bežne pripravovať dobre známymi metódami syntézy na pevnej fáze. Mnohí odborníci, medzi nimi aj firma Applied Biosystems, predáva zariadenia vhodné pre takúto syntézu. Môžu sa použiť ľubovoľné iné spôsoby syntézy. Dobre známe je tiež použitie podobných metód prípravy iných oligonukleotidov, ako je fosforotioat a 3'amin-fosforotioat.

V súlade s vynálezom je odborníkom zrejmé, že mediátorová RNA identifikovaná otvoreným čítacím rámcom (ORF) DNA, z ktorého sa prepisuje, neobsahuje len informácie ORF DNA,

ale tiež pripojené oligonukleotidy, ktoré tvoria oblasti, ktoré sú pre odborníka známe ako 5'-neprekladaná alebo 3'-neprekladaná oblasť, intervenujúca sekvenciu ribonukleotidov. Tak môžu vznikať oligonukleotidy podľa vynálezu, ktoré sú úplne, alebo čiastočne cielené na tieto pripojené ribonukleotidy, rovnako ako na informačné ribonukleotidy. Vo výhodnom uskutočnení vynálezu aptamérové oligonukleotidy interagujú s DNA väzobným miestom regulačného proteínu, ako je Sp1 a proteíny príbuzné Sp1, a spôsobujú prerušenie expresie génu kódujúceho proteín zahrnutý do aktivácie T-buniek. Vo výhodných uskutočneniach podľa vynálezu uvedené regulované proteíny sú CD28 a všetky homológy molekuly CD28. Oligonukleotidy majú sekvencie s obsahom aspoň dvoch oblastí bohatých na G, ktoré sa definujú ako oblasti štyroch nukleotidov obsahujúcich aspoň tri guanozínové zvyšky (G), ako je GGGG, GNGG, GGNG, kde symbol N je výhodne A, C, G, U alebo T. Podľa vynálezu sa môžu použiť dve takéto oblasti bohaté na G oddelené maximálne šiestimi zvyškami a výhodne štyrmi zvyškami, alebo menším počtom zvyškov. Výhodné sekvenčné segmenty, ktoré sa môžu použiť v celku alebo ich časti sú:

5'	3'	SEQ ID
TTG GAG GGG GTG GTG GGG		obrázok č. 1A
GGG GAG GAG GGG GTG GAA		ICN 16481
GGG GTG GTG GGG		ICN 16525
TTG GAG GGG GAG GAG GGG		ICN 16475
TTG GAG GGG GAG GTG GGG		ICN 16479
GGG TTG GAG GGG GTG GTG GGG		ICN 16065

Verí sa, že uvedené sekvencie sú presné, vynález sa zaoberá možnosťou opraviť sekvencie v prípade, že sa zistia chyby. Oligonukleotidy podľa vynálezu obsahujú jednu z týchto sekvencií alebo ich časť. Výhodné je použitie ktoréhokoľvek z

týchto nukleotidov, uvedených vyššie, alebo ktorýchkoľvek podobných oligonukleotidov, ktoré môže odborník pripraviť vzhľadom k vedomostiam o výhodných oligonukleotidových cieľoch, ktoré slúžia na utlmenie syntézy molekúl aktivácie T-buniek, zahŕňa CD28 a molekuly príbuzné s CD28. Očakáva sa, že inhibícia alebo modulácia produkcie CD28 a/alebo homológov CD28 má podstatný terapeutický účinok pri liečení chorôb. Za účelom stanovenia účinnosti kompozícií je potrebné uskutočniť viac skúšok alebo sériu skúšok.

Prehľad obrázkov na výkrese

Na obrázku č. 1A a 1B je uvedené grafické znázornenie stability *in vitro* fosforotioátu označeného ^{32}P , ICN 16064 (Seq#4), v extracelulárnej kvapaline a Jukartových bunkách.

Obrázky č. 1C a 1D znázorňujú *in vitro* stabilitu fosforotioátu označeného ^{32}P , ICN 16214 (Seq#21), v extracelulárnej kvapaline a Jukartových bunkách.

Na obrázku č. 1E a 1F je grafické znázornenie časovej závislosti degradácie (0 až 96 hodín) každého oligonukleotidu ICN 16064 (Seq#4) a ICN 16214 (Seq#21), (2 000 cpm), čo sa stanovilo elektroforetickým delením na 20 % polyakrylamidovom denaturačnom géli, po ktorom nasledovalo zviditeľnenie pomocou PhosphoImager. Symbol ○ znamená percentá neporušeného ^{32}P -RT03S v celej dĺžke a symbol ● označuje zvyšný ^{32}P -RTC06S v každom časovom úseku, relatívne k $t=0$. Tieto hodnoty sa stanovili v extracelulárnych (obrázok č. 1E) a bunkových (obrázok č. 1F) eluátoch s hodnotou 1 000 cpm, ktoré prešli cez kolóny Nickspin (Pharmacia). Súčasne sa analyzovali molekulové hmotnosti štandardných vzoriek (Std), ^{32}P -dNTP (N) a voľného ortofosforečnanu (P).

Obrázok č. 2 graficky znázorňuje analýzu posunu na géli, ktorý ukazuje, že oligonukleotidy obsahujúce motív 12-merovej

sekvencie bohatej na G (dráha 5 a 11) vykazujú vzdialený pruh, ktorý sa líši elektroforetickým posunom od pruhu B, ktorý sa pozoroval u iných fosforotioatových oligonukleotidov po inkubácii s extraktom jadier buniek HeLa. Pruh C je samotný ^{32}P -oligonukleotid.

Na obrázku č. 3 je grafické znázornenie expresie chlo-ramfenikolovej acetyltransferázy (CAT), ktorá nasleduje po transfekcii Jurkatových buniek plazmidovým vektorom, ktorý obsahuje inzert z promótorovej oblasti CD28 s veľkosťou 226 bp (zvyšky -197 až +28) (28bp), alebo mutant, ktorý obsahuje substitúciu zvyškov -51 až -22 sekvencie Seq#3 z Tabuľky č.1 (28-1) v smere 5' zakončenia reportného génu CAT, a nasledujúcej liečby s použitím a bez použitia fosforotioatových oligonukleotidov, ICN 16064 a ICN 16481.

Na obrázku č. 4 je grafické znázornenie testu superposunu na géli, ktorý ukazuje, že naviazanie Sp1 na oblasť -197 až +28 génu CD28 smerom k 5' zakončeniu o veľkosti 28 bp je špecifické.

Na obrázku č. 5 je grafické znázornenie naviazania Sp1 na dvojreťazcový oligonukleotid o veľkosti 28 bp označeného ^{32}P (ktorý sa odvodil z rodičovskej sekvencie 28-Seq#1, Tabuľka č.1) a konkurenčné naviazanie dvojreťazcového oligonukleotidu veľkosti 28 bp a aptamérových oligonukleotidov (FIGURE1A a 16481).

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1: Oligonukleotidy

Oligodeoxynukleotidy sa syntetizujú v automatizovanom syntetizátore DNA (Applied Biosystems model 394) za použitia štandardnej fosforamiditovej chémie. β -kyanoetylfosforamidy, reakčné činidlá a polystyrénové kolóny CPG sa získali od firmy Applied Biosystems (ABI, Foster City, CA). Kolóny 3'-Amino-Modifier C3 CPG sa získali od firmy Glen Research

(Sterling, VA). V prípade fosforotioátových oligonukleotidov sa štandardné oxidačné fľašky nahradili tetraetyltiuramdisulfidom/acetomitrilom, a za účelom postupnej adície fosforotioátových väzieb sa použil štandardný ABI program. Po odštiepení z riadenej poréznej sklenenej kolóny sa odstránila ochranná skupina tak, že oligonukleotidy boli ošetrené koncentrovaným hydroxidom amónnym pri teplote 55 °C počas 8 hodín. Oligonukleotidy sa prečistili HPLC za použitia semi-preparačnej kolóny C8 s reverznou fázou (ABI). Nasleduje odštiepenie DMT ochrannej skupiny, ošetrovanie 80 % kyselinou octovou a vyzrážanie etanolom, čistota produktu sa stanovila pomocou HPLC za použitia analytickej kolóny C18 (Beckman, Fullerton, CA). Všetky oligonukleotidy, ktoré mali vyššiu čistotu ako 90 % boli lyofilizované. Oligonukleotidy sa rekonštituovali v sterilnej deionizovanej vode (ICN, Costa Mesa), objem sa doplnil do 400 μ M a stanovila sa hodnota OD₂₆₀ nm, výsledný objem sa rozdelil na menšie podiely, ktoré sa skladovali pri teplote -20 °C až do doby ďalšieho použitia. Vo všetkých prípadoch sa použili aspoň tri série oligonukleotidov uvedených v Tabuľke č.1.

Príklad 2: Štúdium stability oligonukleotidov *in vitro*

Analýza stability oligonukleotidov sa uskutočnila spôsobom, ktorý je popísaný v publikácii Tam a spol. (1994) *Nucleic Acid Res.* 22: 977-986). Profily degradácie oligonukleotidov boli hodnotené pomocou elektroforézy a kvantifikovali sa za použitia kolón Nickspin.

Príklad 3: Bunkové línie a čistenie T-buniek

Periférne krvné mononukleárne bunky (PBMC) boli izolované zo zrazeniny leukocytov tak, že 60 ml krve zdravého darcu bolo centrifugovaných cez hustotný gradient Ficoll-

Hypaque. Potom boli izolované T-bunky z PMBC pomocou činidla pre izoláciu lymfocytov Lymphokwik, ktoré je špecifické pre T-bunky (LK-25T, One Lambda, Canoga Park, CA). Priemerný výťažok je 40 až 60 x 10⁶ T-buniek. T-bunky sa potom inkubovali cez noc pri teplote 37 °C v 20 až 30 ml kultivačného média RPMI-AP5 (kultivačné médium RPMI-1640; ICN, Costa Mesa, CA) s obsahom 20 mM HEPES pufru, pH=7,45, 5 % plazmy, 1 % L-glutamínu, 1 % penicilín/streptomycín a 0,05 % 2-merkaptoetanolu, za účelom odstránenia akýchkoľvek adherentných buniek, ktoré tu vystupujú ako kontaminácia. Vo všetkých pokusoch sa T-bunky premyli RPMI-AP5, a potom sa preniesli na mikrotitračné platničky s 96 jamkami. Koncentrácia buniek je 2 až 3 x 10⁶ buniek/ml.

Bunky z línie lymfomu T-buniek Jurkat E6-1 (CD28⁺/CD4⁺) (152-TIB) boli udržiavané v kultivačnom médiu RPMI-10 (kultivačné médium RPMI-1640 s obsahom 20 mM HEPES pufru pH=7,4, 10 % fetálneho hovädzieho séra (FCS) (Hyclon, Logan, UT), 1 % L-glutamínu a 1 % penicilín/streptomycín.

Príklad 4: Mitogénom indukovaná aktivácia T-buniek a liečenie oligonukleotidmi

Pred pridaním ľudských periférnych T-buniek alebo bunkovej línie lymfomu T-buniek (v množstve 0,3 x 10⁶) sa duplikát mikrotitračných platničiek s 96 jamkami pokryl monoklonálnymi protilátkami proti CD3 (mAb) (6,25-200 ng/jamka) (klón HIT 3a, Pharmingen, San Diego, CA) a dvakrát sa premyl studeným fyziologickým roztokom pufovaným fosforečnanom, pH = 7,4 (PBS). T-bunky ošetrené anti-CD3 monoklonálnymi protilátkami sa potom aktivovali pridaním 2 ng forbol-12-myristát-13-acetátu (PMA) (Calbiochem, La Jolla, CA) a boli inkubované 48 hodín pri teplote 37 °C. Hneď po aktivácii sa T-bunky aktivované anti-CD3/PMA ošetrili 1 až 20 µM CD28 špe-

cifickými a kontrolnými oligonukleotidmi a pridanie sa opakovalo ešte jeden krát po 24 hodinách. T-bunky z jedného duplikátu mikrotitračných platničiek sa použili pre imuno fluorescenčnú analýzu a druhá mikrotitračná platnička sa použila pre analýzu proliferácie T-buniek.

Príklad 5: Imunofluorescenčné štúdie

Po aktivácii sa 150 μ l inkubačného média nad bunkami z prvého duplikátu mikrotitračnej platničky prenieslo na inú mikrotitračnú platničku za účelom analýzy tvorby cytokínov bunkami. Zvyšné bunky sa premyli dvakrát izotonickým fyziologickým roztokom pH = 7,4 (Becton Dickinson, Mansfield, MA) a resuspendovali sa v 50 μ l izotonického fyziologického roztoku a rozdelili sa na dve vzorky. Jedna vzorka sa zafarbila PE-CD28/FITC-CD4 monoklonálnymi protilátkami a druhá vzorka sa zafarbila porovnatelnými kontrolnými protilátkami označenými PE/FITC. Všetky protilátky označené fluorescenčne sa získali od firmy Becton Dickinson (San Jose, CA). Inkubácia sa uskutočnila v tme pri teplote 4 °C počas 45 minút pri použití nasýtenej koncentrácie monoklonálnych protilátok. Nena viazaná značená látka sa pred analýzou v prietokovom cytometri FACScan (Becton Dickinson) odstránila premytím pomocou PBS. Hustota antigénu sa nepriamo stanovila v privádzaných živých bunkách a vyjadrila sa ako priemerné pásmo fluorescence (MFC). Povrchová expresia CD4⁺ buniek zafarbených CD28 monoklonálnymi protilátkami sa stanovila odpočítaním MCF buniek CD28⁺CD4⁺ od MCF buniek CD28⁻CD4⁻. Životaschopnosť kontrolných neošetrených buniek a buniek ošetrených oligonukleotidmi sa stanovila v každej sérii u všetkých oligonukleotidov a viacerých donorov farbením propidiumjodidom (výsledná koncentrácia je 5 μ g/ml). Percento živých buniek po ošetrení všetkými sériami oligonukleotidov v rozsahu dávky 1

až 20 μM , ktoré sa stanovilo po zafarbení propidiumjodidom sa stanovilo cytometricky a bolo vyššie ako 90 % (rozsah 90 až 99 %).

Príklad 6: Analýza cytokínov

Koncentrácia ľudských cytokínov získaných z buniek sa stanovila vo všetkých supernatantoch buniek z prvého duplikátu mikrotitračných platničiek. Mitogénom indukované zmeny v množstve interleukínu-2 (IL-2) sa stanovili použitím bežne dostupného kitu ELISA (R and D systems Quantikine kit, Minneapolis, MN). Všetky výsledky testu ELISA sa vyjadrujú v jednotkách pg/ml.

Príklad 7: Analýza zmeny elektroforetickej mobility (EMSA)

5' zakončenie testovaných oligonukleotidov sa označil [γ - ^{32}P]-ATP (ICN, Costa Mesa, CA) za použitia T4 polynukleotidovej kinázy podľa protokolu výrobcu (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). 10 μg nukleárneho extraktu buniek HeLa (Promega) sa inkubovalo približne s 80 000 cpm značeného oligonukleotidu 20 minút pri laboratórnej teplote. Reakčná zmes pre väzbu obsahovala 10 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 50 mM NaCl, 0,5 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 1 mM MgCl_2 , 4 % glycerol a 0,5 μg poly(dI.dC). Komplexy DNA-proteín sa rozdelili elektroforeticky na 4 % polyakrylamidovom géli, ktorý obsahoval 0,5 x TBE pufer (50 mM Tris, 45 mM kyselina ortoborítá, 0,5 mM EDTA) počas 3 hodín pri napätí 100 V. Gél sa vysušil a autoradiógraf sa analyzoval v PhosphorImager (Biorad, Richmond, CA).

Príklad 8: Príprava cDNA pre účely mapovania oligonukleotidov za použitia nukleáz štiepiacich DNA a test posunu na géli

cDNA (o veľkosti 300 párov báz), ktorá sa používa pri naviazaní proteínu a DNA v testoch mapovania oligonukleotidov a posunu na géli, sa izolovala z plazmidov pCAT3e28b, pCATE28h alebo pCAT3e28h-1. 60 µg každého plazmidu sa štiepilo reštrikčným enzýmom BglIII. Niektorá štiepená DNA sa naniesla na agarózový gél, aby sa overila linearita DNA. Zvyšok sa extrahoval zmesou fenol/sevag, vyzrážal sa etanolom a opäť bol resuspendovaný vo vode a bol štiepený reštrikčným enzýmom SacI. Malá časť sa opäť naniesla na gél, aby sa overilo, či sa uskutočnilo štiepenie (mali by sa objaviť dva pruhy veľkosti 4 kb a 300 bp). Zvyšok sa extrahoval zmesou fenol/sevag a vyzrážal sa etanolom. Pre účely nasledujúcej defosforylácie sa pelet DNA resuspendoval v malom objeme vody (62 µl) a pridal sa 1 µl 20 U/µl alkalickéj fosfatázy (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) a 7 µl 10 x koncentrovaného reakčného pufru. Po inkubácii reakčnej zmesi pri teplote 37 °C počas 1 hodiny sa pridalo 7 µl 0,2 M EGTA pH=8,0 a všetko sa zahrievalo pri teplote 65 °C 10 minút. Celkový objem 77 µl defosforylovanej DNA sa naniesol za účelom prečistenia pruhu veľkosti 300 pb na 1 % agarózový gél. K extrakcii DNA z gélu sa použil extrakčný kit Qiaquick od firmy Qiagen (Santa Clarita, CA). Výsledný objem čisteného pruhu DNA o veľkosti 300 pb bol 70 µl a koncentrácia sa vypočítala nasledovným spôsobom: $60 \mu\text{g} \times (300 \text{ bp} / 4 \times 300 \text{ bp}) = 4,2 \mu\text{g}$. Predpokladá sa, že výťažok DNA z pruhu je 50 % a potom koncentrácia bude 2,1 µg v 70 µl. To znamená 30 ng/µl. Koniec DNA za označil ³²P (pomocou kinázy). V reakcii pri rádioaktívnom značení sa použilo 5 až 7 µl izolovanej DNA o veľkosti 300 bp.

Príprava polyakrylamidového gélu pre účely testu posunu na géli

Prípravil sa roztok 4 % polyakrylamidového gélu, ktorý

nemá denaturačné vlastnosti, v 0,5 x TBE podľa technického návodu Promega Gel Shift Assay Systems (4 % akrylamid, 0,05 % bisakrylamid, 2,5 % glycerol, 0,5 % TBE). Pripravil sa zásobný roztok vyššie uvedeného gélu v množstve 250 ml, pre-filtroval sa a uskladnil pri teplote 4 °C. Pri každom použití sa pridalo na každých 25 ml zásobného roztoku 4 % gélu 12,2 µl TEMED a 287,5 µl 10 % persulfátu amónneho a roztok gélu sa vylial na platničku rozmerov 16,5 cm x 16,5 cm x 0,75 mm. Aby sa dosiahli optimálne výsledky, gél sa nechal vždy polymerizovať cez noc. Elektroforéza sa uskutočnila len v pufri 0,5 x TBE bez vzoriek počas 30 minút pri napätí 100 V a potom sa naniesli vzorky.

Príklad 9: Príprava a čistenie dvojreťazcových oligonukleotidov

Použitý spôsob je založený na publikácii „Antiparallel polypurine phosphorothioate oligonucleotides form stable triplexes with the rat $\alpha 1$ (I) collagen gene promoter and inhibit transcription in cultured rat fibroblasts“ Jacob Joseph a spol., *Nucleic Acids Research*, 1997, zv. 25, č. 11, 2182-2188. Rovnaké množstvo komplementárneho reťazca sa zahrievalo pri teplote 80 °C 5 minút v 0,25 M NaCl. Potom nasleduje pomalé ochladenie na laboratórnu teplotu. Dvojreťazcové oligonukleotidy spojené tepelnou hybridizáciou sa izolovali elektroforézou na 6 % polyakrylovom géli (29 : 1), ktorý nemá denaturačné vlastnosti, potom sa vyrezali a eluovali z gélu a vyzrážali sa etanolom. Použili sa spôsoby popísané v publikácii „Molecular cloning, a laboratory manual“, Sambrook, Fritsch a Maniatis. Do značkovacej reakcie sa pridalo približne 20 ng dvojreťazcových oligonukleotidov.

Príklad 10: Značenie konca DNA pomocou ^{32}P

150 až 200 ng cDNA o veľkosti 300 bp alebo 20 dvoj-

reťazcových oligonukleotidov sa inkubovalo s 10 μCi [γ - ^{32}P]ATP (4 500 Ci/mmol, ICN, Irvin, CA) a s 10 jednotkami kinázy a 1 x koncentrovaným kinázovým pufrom (firma Promega) v objeme 10 μl pri teplote 37 °C počas 1 hodiny a prečistili sa na kolóne Centri Spin 10 (Princeton Separation, Adelphia, NJ). Pri reakcii v každom teste posunu sa používala DNA vykazujúca približne 80 000 až 100 000 cpm, ktorá je upravená kinázou.

Príklad 11: Test posunu na géli

Proteíny (nukleárny extrakt alebo prečistený transkripčný faktor) sa inkubovali s 1 x koncentrovaným pufrom pre test posunu na géli (Promega, Madison, WI) pri laboratórnej teplote počas 5 až 10 minút, potom sa pridala DNA upravená kinázou a nasledovala inkubácia 20 až 30 minút pri laboratórnej teplote. Vzorky sa potom naniesli na upravený 4 % gél, ktorý nemá denaturačné vlastnosti. Elektroforéza sa uskutočnila počas 3 až 4 hodín pri napätí 100 V v pufri, ktorý je 0,5 x koncentrovaný TBE. Gél sa sušil na dvoch hárkoch Whatman papiera a exponoval sa vo vývojke luminiscencie fosforu cez noc.

Príklad 12: Test protilátkového super-posunu na géli

Protilátky Sp1 (klón 1C6, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) sa predinkubovali s prečisteným Sp1 (Promega) 1 hodinu a potom sa pridala cDNA označená ^{32}P alebo oligonukleotidmi.

Príklad 13: Konkurenčný test posunu na géli

Neznačené oligonukleotidy v približne 70 až 100 molárnom nadbytku (buď jednoreťazcové alebo dvojreťazcové) sa predinkubovali s proteínom pri laboratórnej teplote približne 30 minút a potom sa pridala cDNA označená ^{32}P .

Príklad 14: Konštrukcia pCAT3e28b, pCAT3e, pCAT3e28h-1

RT PCR umožnila vytvoriť cDNA smerom ku 5' zakončeniu CD28 (-197 až +28), pričom ako templát sa použila celková RNA buniek Jurkat. Tento segment cDNA sa najskôr klónoval do TA klónovacieho vektora PCR 2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Rovnaká cDNA sa neskôr subklónovala do vektora pCAT3e (Promega) a začlenila sa do miesta XhoI-SacI. PCAT3e28h a pCAT3e28h-1 sú mutanty pCAT3e28b, v ktorých boli deletované sekvencie -51 až -22 a boli substituované inými 15 nukleotidmi.

Príklad 15: Transfekcia (dočasná expresia)

Jeden deň pred transfekciou sa bunky Jurkat pripravili do 2 alebo 3 T150 v riedení 1:4 alebo 1:5 z 80 až 90 % konfluentných buniek. Tesne pred transfekciou sa všetky bunky zliali do jednej kultivačnej nádoby a spočítali sa (koncentrácia buniek by sa mala pohybovať okolo 40×10^4 buniek/ml). $11 \times 4 \times 10^6$ buniek pre použitie v 10 transfekčných reakciách sa centrifugovalo v skúmavkách s kónickým dnom s objemom 50 ml. Bunky sa jedenkrát premyli PBS. Objem PBS je polovica pôvodného objemu. Bunky sa resuspendovali v 44 ml vopred zahriateho, čerstvého Jurkatovho kultivačného média (90 % RPMI 1640, 10 % FBS, 1 % L-glutamát, 1 % penicilín/streptomycín) tak, že výsledná koncentrácia bola 1×10^6 buniek/ml. 4 ml roztoku buniek sa rozpipetovali do jamôk mikrotitračnej platničky so 6 jamkami. Do skúmavky objemu 1,5 ml sa napipetovalo 2,5 μ l plazmidu v koncentrácii 2 mg/ml (séria pCAT3e), pridalo sa 147,5 μ l kultivačného média RPMI 1640 (bez séra a antibiotík). Potom do roztoku plazmidu a kultivačného média bolo pridaných 20 μ l činidla Superfact od firmy Qiagen. Zmes sa premiešala pipetou tak, že sa roztok 5 x do pipety napipetoval a vypustil a potom sa nechal stáť pri laboratórnej teplote 5 až 10 minút. Do každej jamky s bunkami

sa po kvapkách pridal transfekčný komplex a všetko sa mierne premiešalo. Bunky sa inkubovali pri teplote 37 °C v inkubátore s atmosférou CO₂ a po 24 hodinách sa bunky odobrali pre účely testu CAT. V prípade, že sa po transfekcii majú pridať oligonukleotidy, k bunkám sa v určený čas (1 hodina po transfekcii) pridalo 50 µl zásobného roztoku 400 µM oligonukleotidov a bunky boli uložené do inkubátora.

Príklad 16: Test CAT

PO 24 hodinách inkubácie sa bunky odobrali pipetou z každej jamy do skúmaviek objemu 15 ml s kónickým dnom. Jamky sa premyli bunkovým kultivačným médiom, aby tam nezostali žiadne bunky. Bunky boli potom centrifugované pri 2 000 otáčkach za minútu pri laboratórnej teplote 5 minút. Kultivačné médium sa odsalo pipetou. Každý bunkový pelet sa premyl 2 x 2 ml PBS (pridal sa PBS, zmes sa premiešala na Vortexe, centrifugovala a kultivačné médium sa odsalo pipetou). Pipetou sa odsalo maximálne množstvo PBS. Potom sa do skúmavky s peletom buniek pridalo 400 µl 1 x koncentrovaného reportného lyzujúceho pufra. Lýza buniek sa uskutočnila inkubáciou pri laboratórnej teplote počas 30 minút za občasného premiešania skúmaviek na Vortexe. Na konci 30 minútovej inkubácie sa skúmavky zahriali na teplotu 60 °C počas 10 minút, potom sa centrifugovali pri laboratórnej teplote pri 12 000 ot./min. 2 minúty a supernatant (lyzát) sa preniesol pipetou do novej skúmavky objemu 1,5 ml. Pri každej reakcii testu CAT sa použilo 100 µl lyzátu. Zvyšok sa zamrazil pri teplote -80 °C. Každý test CAT obsahoval: 18,5 µl vody sa zmiešalo so 100 µl lyzátu, pridalo sa 5 µl n-butyryl-CoA v koncentrácii 5 mg/ml (Promega) a 1,5 µl 0,1 µCi/µl chloramfenikol-¹⁴C (ICN) v skúmavke 1,5 ml (celkový objem zmesi je 125 µl) a zmes sa inkubovala pri teplote 37 °C 1 hodinu. Na konci prvej hodiny sa

do každej skúmavky pridalo 300 μ l xylénu (ICN). Objem sa premiešal na Vortexe 5 sekúnd, potom nasledovala centrifugácia pri maximálnej rýchlosti 3 minúty pri laboratórnej teplote. 280 μ l vrchnej fázy (xylén) sa prenieslo pipetou do novej skúmavky. K týmto 280 μ l xylénovej fázy sa pridalo 100 μ l 0,25 M Tris, pH=8,0. Zmes sa premiešala na Vortexe a centrifugovala sa ako je popísané vyššie. 200 μ l vrchnej fázy sa prenieslo pipetou do scintilačnej fľaštičky a pridalo sa 5 ml scintilačného roztoku. Celý objem sa dobre premiešal a vzorky sa hodnotili meraním rádioaktivity v scintilačnom počítači.

Príklad 17: Stabilita oligonukleotidov *in vitro* predlžuje biologickú aktivitu fosforotioátových oligonukleotidov

Modifikácia oligonukleotidov internukleotidovými fosforotioátovými väzbami môže udeliť rezistenciu voči nukleázam, a tak predĺžiť bioaktivitu *in vitro* z 1 až 2 hodín na 24 hodín (Stein, (1993) Science 261: 1004-1012). Ukázalo sa, že oligonukleotidy bohaté na G napríklad FIGURE1A (Seq#4) vykazujú väčšiu stabilitu *in vitro* pri porovnaní s fosforotioatom, ktorý nie je obohatený G FIGURE1B (Seq#21). Na obrázku 1A uvedené elektroforeogramy kasne ukazujú, že v prípade extracelulárneho 1A (S) a bunkového 1B (L) podstatne viac neporušený počas 96 hodinovej inkubácie s bunkami Jurkat zostáva oligonukleotid FIGURE1A (Seq#4) označený 32 P pri porovnaní s oligonukleotidom FIGURE1B (Seq#21). V súhlase s týmto pozorovaním sa javia údaje z kolóny Nickspin (obrázok č. 1B). Percento neporušených oligonukleotidov FIGURE1A (Seq#4) po 96 hodinách je 54 % (S) a 59 % (L) a z FIGURE1B (Seq #21) je 10 % (S) a 34 % (L). Tieto výsledky naznačujú, že vyššia rezistencia voči nukleáze sa dosiahne iba prítomnosťou oblastí obohatených G v FIGURE1A (Seq#4) a to je prav-

depodobne spojené so schopnosťou tohoto určitého nukleotidu tvoriť zbalené sekundárne štruktúry.

Príklad 18: Inhibícia expresie funkčného CD28 a CD28-špecifická produkcia IL-2 v aktivovaných ľudských T-bunkách aptamérovými oligonukleotidmi je závislá na špecifickom motíve bohatom na G

Realatívna inhibícia expresie CD28 a CD28-špecifickej produkcie IL-2 pomocou fosforotioátovej oligonukleotidovej sekvencie #4 až #21 (5 μ M) uvedené v tabuľke č. 1 je zaznamenaná v tabuľke č. 2. Tabuľka č. 2 ukazuje, že inhibičná aktivita čiastočne závisí od sekvencie a opiera sa o prítomnosť motívu, ktorý obsahuje dve štvorice G oddelených štyrmi bázami (Seq#5 až #8). Tieto hodnoty naznačujú, že interakcia oligonukleotidu, ako je FIGURE1A (Seq#4) a jeho putatívneho cieľa, závisí na presnej požiadavke konformácie, čo je podobné ako u interakcie oligonukleotid-proteín, skôr ako na požiadavke hybridizácie nukleová kyselina/nukleová kyselina (ako je možné nájsť u antigénnych a nezmyselných modelov).

Príklad 19: Oligonukleotidy obsahujúce špecifický 12-mérový motív tvoria špecifický proteínový oligonukleotidový komplex

Obrázok č. 2 zobrazuje analýzu posunu elektroforetickej pohyblivosti oligonukleotidov označených 32 P, ktoré sa predinkubovali s extraktom buniek HeLa. Zoznam oligonukleotidov uvedený v tabuľke č. 3 obsahuje dva oligonukleotidy FIGURE1A (Seq#4) a ICN 16481 (Seq#5), ktoré obsahujú 12-mérový motív nesúci dve sady štvoríc G oddelených 4 nukleotidmi. Testovali sa len oligonukleotidy s uvedeným motívom (dráha 5 a 11), aby vznikol posun komplexu oligonukleotid-proteín (pruh A), ktorý

sa líši od iných fosforotioátových oligonukleotidov. Tieto hodnoty naznačujú, že špecifické interakcie proteín-oligonukleotid sa objavujú u oligonukleotidov obsahujúcich 12-mérový motív.

Príklad 20: Inhibícia expresie funkčného CD28 v aktivovaných ľudských T-bunkách pomocou aptamérových oligonukleotidov je vo vzťahu k prítomnosti špecifického komplexu oligonukleotid-proteín

Tabuľka č. 4 porovnáva účinok inhibície mitogénom vyvolanej expresie CD28 a produkcie IL-2 pomocou niektorých fosforotioátových oligonukleotidov pri koncentrácii 5 μM s ich aptamérovou schopnosťou tvoriť špecifický komplex oligonukleotid-proteín, v prípade že sa inkubujú s nukleárnym extraktom buniek HeLa, ktorý je bohatým zdrojom transkripčných faktorov. Tieto údaje jasne ukazujú na vzťah medzi inhibičnou aktivitou oligonukleotidov s motívom pre expresiu CD28 a vylučovanie IL-2 a tvorbu špecifického pruhu posunu na géli. Substitúcia smerovaná do dvoch štvoríc G vedie k strate funkcie a komplex oligonukleotid-proteín mizne.

Príklad 21: Promótorová oblasť na 5' zakončení CD28 -197 až +28 (28b) viaže Sp1

Promótorová oblasť CD28 -197 až +28 označená ^{32}P , ktorá je známa ako 28b, sa inkubovala s proteínom Sp1 a so sériou trojnásobného riedenia protilátok proti Sp1 začínajúcou množstvom 0,5 μg . Uskutočnil sa test super-posunu na géli a komplexy DNA-proteín-proti látka sa rozdelili elektroforézou. Výsledky sú uvedené na obrázku č.4. Údaje znamenajú, že Sp1 sa viaže na oblasť 28b promótoru CD28. Táto interakcia je špecifická, čoho dôkazom je vymiznutie pruhu Sp1/ ^{32}P -28b/Sp1 (prh B) pri nariadení protilátok špecifických pre Sp1 na hodnotu 0,00617 μg ,

pričom zostal len pruh 28b/Spl (pruh A). Znamená to, že 28b špecificky viaže Spl. Pruh C predstavuje voľný 28b značený ³²P.

Príklad 22: Oligonukleotid -51 až -22 odvodený od promótorovej oblasti na 5' zakončení CD28 -197 až +28 (28b) obsahujúci 12-mérový motív bohatý na G môže viazať Spl

Za účelom vymedzenia presnej Spl viažucej oblasti v 28b na motív bohatý na G v promótorovej oblasti CD28 -197 až +28 sa syntetizoval dvojreťazcový (ds) 30-mérový oligonukleotid, ktorý bol pomenovaný 28b oligo (Seq#1, tabuľka č. 1), ktorý obsahuje vo svojej sekvencii 12-mér GGGGAGGAGGGG. Bola vyslovená hypotéza, že sa jedná o väzobné miesto pre Spl v promótorovej oblasti CD28. Po označení ³²P sa 28b oligo inkuboval s extraktom Spl a došlo k vzájomnému naviazaniu (obrázok č. 5, pruh A, dráha 2 a 3). Konkurencia s dvojreťazcovým 28b oligo spôsobila, že pruh zmizol, čo znamená, že väzba je špecifická pre Spl (dráha 4). Prekvapivo jednoreťazcové fosforotioátové oligonukleotidy bohaté na G FIGURE1A (dráha 5) a 16481 (dráha 6) (obe dva obsahujú motív bohatý na G) na rozdiel od kontrolného oligonukleotidu ICN 16476 (dráha 7) sa uchádzajú o väzbu s Spl. Tieto údaje znamenajú, že fosforotioátové oligonukleotidy bohaté na G FIGURE1A a ICN 16481 môžu pôsobiť ako aptaméry pri väzbe na DNA väzobné miesto Spl. Dôsledkom tejto interakcie je prevencia naviazania Spl na Spl miesto -51 až -22 v promótorovej oblasti a tak dochádza k inhibícii transkripcie génu CD28 sprostredkovanvej Spl a k zoslabeniu expresie proteínu CD28.

ZMENENÝ LIST

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Aptamér so sekvenciou, ktorá obsahuje aspoň dve oblasti bohaté na G vybrané zo skupiny GGnG, GGGG, GnGG, nGGG a GGGn, kde G je guanozín a n je ľubovoľný nukleotid.
2. Aptamér podľa nároku 1, kde aspoň dve z aspoň dvoch oblastí sú oddelené menej ako siedmimi nukleotidmi vrátane.
3. Aptamér podľa nároku 1, kde aspoň dve z aspoň dvoch oblastí sú oddelené tromi až šiestimi nukleotidmi vrátane.
4. Aptamér podľa nároku 1, kde aspoň dve z aspoň dvoch oblastí sú oddelené štyrmi nukleotidmi.
5. Aptamér podľa nároku 1, ktorý sa uchádza o väzobné miesto imunitného regulačného proteínu pre nukleovú kyselinu.
6. Aptamér podľa nároku 2, kde imunitný regulačný proteín sa vybral zo skupiny obsahujúcej SP1, NFkB, EGR1 a AP2.
7. Aptamér podľa nároku 1, ktorý sa uchádza o väzobné miesto imunitného regulačného proteínu pre nukleovú kyselinu, kde aspoň jedna z aspoň dvoch oblastí bohatých na G obsahuje GGnG a aspoň dve z aspoň dvoch oblastí sú oddelené dvomi až siedmimi nukleotidmi.
8. Aptamér podľa nároku 1, ktorý sa uchádza o väzobné miesto imunitného regulačného proteínu pre nukleovú kyselinu, kde aspoň jedna z aspoň dvoch oblastí bohatých na G obsahuje GGGG a aspoň dve z aspoň dvoch oblastí sú oddelené dvomi až siedmimi nukleotidmi vrátane.

ZMENENÝ LIST

9. Aptamér podľa nároku 1, ktorý sa uchádza o väzobné miesto imunitného regulačného proteínu pre nukleovú kyselinu, kde aspoň jedna z aspoň dvoch oblastí bohatých na G obsahuje GnGG a aspoň dve z aspoň dvoch oblastí sú oddelené menej ako siedmimi nukleotidmi.

10. Aptamér podľa nároku 1, ktorý sa uchádza o väzobné miesto imunitného regulačného proteínu pre nukleovú kyselinu, kde aspoň jedna z aspoň dvoch oblastí bohatých na G obsahuje GGG a aspoň dve z aspoň dvoch oblastí sú oddelené menej ako siedmimi nukleotidmi.

11. Aptamér podľa nároku 1 obsahujúci sekvenciu 5'TTG GAG GGG GTG GTG GGG 3' (Seq. ID. No.4).

12. Aptamér podľa nároku 1 obsahujúci sekvenciu 5'GGG GAG GAG GGG CTG GAA 3' (Seq. ID. No.5).

13. Aptamér podľa nároku 1 obsahujúci sekvenciu 5'GGG GTG GTG GGG 3' (Seq. ID. No.13).

14. Aptamér podľa nároku 1 obsahujúci sekvenciu 5'TTG GAG GGG GAG GAG GGG 3' (Seq. ID. No.7).

15. Aptamér podľa nároku 1 obsahujúci sekvenciu 5'TTG GAG GGG GAG GTG GGG 3' (Seq. ID. No.8).

16. Aptamér podľa nároku 1 obsahujúci sekvenciu 5'GGG TTG GAG GGG GTG GTG GGG 3' (Seq. ID. No.6).

ZMENENÝ LIST

17. Spôsob tlmenia odpovede imunitného systému u pacienta v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahŕňa aplikáciu aptaméru podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 16 pacientovi.

18. Spôsob liečenia pacienta, ktorý vykazuje stav charakterizovaný neprimeranou odpoveďou imunitného systému, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahŕňa aplikáciu aptaméru podľa ktorýchkoľvek z nárokov 1 až 16 pacientovi.

19. Spôsob podľa nároku 18, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že stav zahŕňa štep verzus odpoveď hostiteľa.

20. Spôsob podľa nároku 18, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že stav zahŕňa autoimunitné ochorenia.

21. Spôsob podľa nároku 20, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že stav zahŕňa reumatický zápal kĺbov.

22. Spôsob podľa nároku 20, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že stav zahŕňa roztrúsenú sklerózu.

23. Spôsob podľa nároku 20, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že stav zahŕňa lupus erythematodes.

24. Spôsob podľa nároku 20, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že stav zahŕňa cukrovku závislú na inzulíne.

25. Spôsob podľa nároku 20, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že stav zahŕňa lupienku.