

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 950254 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 950254

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07H 21/00

(22) Tekemispäivä - Ingningsdag - Filing date 22.07.1993

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 20.01.1995

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 20.01.1995

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

(86) Kansainvälinen hakemus - 22.07.1993 PCT/US1993/006884
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

23.07.1992 US 918239

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Worcester Foundation for Biomedical, 222 Maple Avenue Shrewsbury, Mass. 01545, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Metelev, Valeri, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Agrawal, Sudhir, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Hybridi-oligonukleotidifosforotioatteja

Hybrid-oligonukleotidfosforotioater

Hybridi-oligonukleotidifosforotioaatteja**Keksinnön tausta****Keksinnön ala**

5 Keksintö liittyy synteettisiin oligonukleotideihin, jotka ovat käyttökelpoisia geenien ilmentymisestä tehtäviin tutkimuksiin ja antisense-oligonukleotideihin perustuvassa terapeuttisessa lähestymistavassa. Tarkemmin sanottuna keksintö liittyy synteettisiin oligonukleotideihin, jotka ovat laadullisesti parempia tällaisiin sovelluksiin, mikä johtuu oligonukleotidien sokerifosfaattirunkoon tehdyistä modifikaatioista.

Yhteenvedo tekniikan tasosta

15 Mahdollisuudesta antisense-oligonukleotideihin perustuvan terapeuttisen lähestymistavan kehittämiseksi ehdotettiin ensimmäisen kerran kolmessa vuosina 1977 ja 1978 julkaistussa artikkelissa. Julkaisussa Paterson, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1987) 4370 - 4374 on kuvattu, että mRNA:lle komplementaarisen oligonukleotidin sitoutuminen voi inhiboida mRNA:n translaatiota soluttomassa uutteessa. Julkaisuissa Zamenick ja Stephenson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978) 280 - 284 ja 285 - 288 on kuvattu, että sellainen 13-meerinen synteettinen oligonukleotidi, joka on komplementaarinen osalle Rous sarcoma-
25 -viruksen (RSV) genomia, inhiboi RSV:n replikaatiota infektoiduissa kanan fibroblasteissa ja inhiboi RSV:n välityksellä tapahtuvaa kanan primaaristen fibroblastien transformaatiota maligneiksi sarkoomasoluiksi.

30 Nämä ensimmäiset viitteet siitä, että synteettisiä oligonukleotideja voidaan käyttää viruksen lisääntymisen ja neoplasian inhiboimiseen, ovat saaneet jatkoa synteettisten oligonukleotidien käyttämisestä hyvin monien erilaisten virusten inhiboimiseen. Goodchild, et al.:n US-patenttijulkaisussa nro 4 806 463 (jonka sisältö on
35 liitetty tähän keksintöön siihen oikeuttavien säädösten

nojalla) on kuvattu humaanii-immuunikatoviruksen (HIV) inhibitio synteettisillä oligodeoksinukleotideilla, jotka ovat komplementaarisia HIV:n genomien useiden erilaisten alueiden suhteen. Julkaisuissa Leiter, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 3430 - 3434 on kuvattu influenssaviruksen inhibitio synteettisillä oligonukleotideilla. Julkaisussa Agris, et al., Biochemistry 25 (1986) 6268 - 6275 on kuvattu synteettisten oligonukleotidien käyttöä vesicular stomatitis -viruksen inhiboimiseen. Julkaisussa Gao, et al., Antimicrob. Agents Chem. 34 (1990) 808 - 812 on kuvattu herpes simplex -viruksen inhibitio synteettisillä oligonukleotideilla. Julkaisussa Birg, et al., Nucleic Acids Res. 18 (1990) 2901 - 2908 on kuvattu simian viruksen (SV40:n) inhibitio synteettisillä oligonukleotideilla. Julkaisussa Storey, et al., Nucleic Acids Res. 19 (1991) 4109 - 4114 on kuvattu human papilloma -viruksen (HPV) inhibitio synteettisillä oligonukleotideilla. Synteettisten oligonukleotidien ja niiden analogien käytöstä antiviraalisina aineina on esitetty äskettäin laaja katsaus julkaisussa Agrawal, Tibtech 10 (1992) 152 - 158.

Synteettisiä oligonukleotideja on lisäksi käytetty useiden erilaisten ei-viraalisten patogeenien inhiboimiseen sekä tiettyjen solun geenien ilmentymisen valikoivaan inhiboimiseen.

On siten perustellusti osoitettu, että synteettiset oligonukleotidit ovat käyttökelpoisia välineitä inhiboimaan viruksen lisääntymistä, ei-viraalisten patogeenien lisääntymistä ja solun geenien valikoivaa ilmentymistä. On kuitenkin tarvetta saada käyttöön parannettuja oligonukleotideja, jotka inhiboivat tehokkaammin tällaisia viruksia, patogeeneja ja valikoivaa geenien ilmentymistä. Useat eri tutkijat ovat yrittäneet täyttää tämän vaatimuksen valmistamalla ja tutkimalla oligonukleotideja, joiden nukleotidien välisiä sidoksia on modifioitu.

Useat tutkijat ovat osoittaneet, että tällaiset modifioidut oligonukleotidit ovat tehokkaampia kuin niiden modifioimattomat vastineet. Julkaisussa Sarin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 7448 - 7451 on esitetty, että oligodeoksinukleosidimetyylifosfonaatit ovat aktiivisempia HIV-1:n inhibiittoreina kuin tavanomaiset oligodeoksinukleotidit. Julkaisussa Agrawal, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 7049 - 7083 on esitetty, että oligonukleotidifosforotioaatit ja useat erilaiset oligonukleotidifosforamidaatit ovat tehokkaampia HIV-1:n inhiboimisessa kuin tavanomaiset oligodeoksinukleotidit. Julkaisussa Agrawal, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 7790 - 7794 on kuvattu oligonukleotidifosforotioaateista saatava etu HIV-1:n inhiboimisessa infektion varhaisvaiheissa ja kroonisesti infektoiduissa soluissa.

On lisäksi kehitetty kimeerisiä oligonukleotideja, joissa oligonukleotidissa esiintyy useampia kuin yhden-tyyppisiä nukleotidien välisiä sidoksia. Kimeeriset oligonukleotidit sisältävät ainoastaan deoksiribonukleosideja, mutta niissä on alueita, jotka sisältävät erilaisia nukleotidien välisiä sidoksia. Pederson, et al.:n US-patenttijulkaisussa nro 5 XXX XXX (nro 07/480 269, myönnetty 24.12.1991), jonka sisältö on liitetty tähän keksintöön siihen oikeuttavien säädösten nojalla, on kuvattu kimeerisiä oligonukleotideja, joissa ydinjaksona on oligonukleotidifosfodiesteri- tai oligonukleotidifosforotioaattisekvenssi, jonka ympärillä on oligonukleotidifosforamidaatteja, metyyllifosfonaatteja tai fosforamidaatteja. Julkaisussa Furdon, et al., Nucleic Acids Res. 17 (1989) 9193 - 9204 on kuvattu kimeerisiä oligonukleotideja, joissa joko oligonukleotidifosforotioaatti- tai -metyyllifosfonaatti-alueiden lisäksi on oligonukleotidifosfodiestereitä. Julkaisussa Quartin, et al., Nucleic Acids Res. 17 (1989) 7523 - 7562 on kuvattu kimeerisiä oligonukleotideja, joissa on oligonukleotidifosfodiestereistä ja oligonukleotidi-

metyylifosfonaateista koostuvia alueita. Kussakin edellä
 olevista yhdisteistä on käytetty hyväksi deoksiribonukleo-
 tidifosforotioaatteja, joilla dupleksin pysyvyys on hei-
 kohko. Julkaisussa Atabekov, et al., FEBS Letters 232
 5 (1988) 96 - 98 on kuvattu kimeerisiä oligonukleotideja,
 joissa kaikki nukleotidien väliset sidokset ovat fosfodi-
 esterisidoksia, mutta joihin on yhdistetty alueita, jotka
 sisältävät oligoribonukleotideja ja oligodeoksiribonukleo-
 tideja. Julkaisussa Inoune, et al., FEBS Letters 215
 10 (1987) 237 - 250 on kuvattu kimeerisiä oligonukleotideja,
 joissa on ainoastaan fosfodiesterisidoksia ja oligodeoksi-
 ribonukleotideista ja 2'-OMe-ribonukleotideista koostuvia
 alueita. Mikään näistä yhdisteistä, joissa on fosfodiesteri-
 sidoksia, ei kestä endonukleaasien eikä eksonukleaasien
 15 aktiivisuutta.

Monet näistä modifioiduista oligonukleotideista
 ovat myötävaikuttaneet antisense-oligonukleotideihin pe-
 rustuvan terapeuttisen lähestymistavan mahdollisen tehok-
 kuuden parantamiseen. Tunnetut oligonukleotidit pysyvät
 20 kuitenkin tietyiltä osin puutteellisina, jotka puutteet
 voivat rajoittaa näiden oligonukleotidien tehokkuutta te-
 rapeuttisena apuvälineinä. Julkaisussa Wickstrom, J. Bio-
 chem. Biophys. Methods 13 (1986) 97 - 102, on esitetty,
 että oligonukleotidifosfodiesterit pilkkoutuvat helposti
 25 nukleaasien vaikutuksesta. Tällainen nukleaasiherkkyys voi
 rajoittaa oligonukleotidien biologista hyväksikäytettä-
 vyyttä in vivo -olosuhteissa. Julkaisussa Agrawal, et al.
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 1401 - 1405 on esi-
 tetty, että oligonukleotidifosforamidaatit tai -metyyli-
 fosfonaatit eivät RNA:han hybridisoituna aktivoi RNAasi
 H:ta, jonka aktivaatio voi olla tärkeä antisense-oligonuk-
 leotidien toiminnalle. Julkaisussa Agrawal, et al., Nuc-
 leosides & Nucleotides 8 (1989) 5 - 6, on esitetty, että
 oligodeoksiribonukleotidifosforotioaattien dupleksin sta-
 30 biilisuus on RNA:han hybridisoituna heikohko.

Tämän johdosta on tarvetta saada käyttöön parannet-
tuja oligonukleotideja, joissa tällä alalla tunnettujen
oligonukleotidien puutteet on korjattu. Ihannetapauksessa
tällaisten oligonukleotidien on jäätävä pilkkoutumatta
5 nukleolyttisesti, niiden on muodostettava pysyviä duplek-
seja RNA:n kanssa ja niiden on aktivoitava RNAasi H:ta
RNA:han hybridisoituna.

Keksinnön lyhyt yhteenveto

Keksinnöstä saadaan käyttöön hybridi-oligonukleo-
10 tideja, jotka jäävät pilkkoutumatta nukleolyttisesti,
muodostavat pysyviä duplekseja RNA:n tai DNA:n kanssa ja
aktivoivat RNAasi H:ta RNA:han hybridisoituna. Nämä omi-
naisuudet ovat käytettävissä tämän keksinnön mukaisissa
oligonukleotideissa sillä perusteella, että niissä on nuk-
15 leotidien välisiä fosforotioaatti- ja/tai fosforoditioaat-
tisidoksia ja oligodeoksiribonukleotideista muodostuvia
segmenttejä sekä joko oligoribonukleotideista tai 2'-ase-
masta substituoituista oligoribonukleotideista muodostuvia
segmenttejä. Tässä keksinnössä termi "2'-asemasta substi-
20 tuoitu" tarkoittaa riboosimolekyylin 2'-OH:n substituutio-
ta esimerkiksi ryhmillä, jotka ovat 2'-OMe, 2'-allyyli,
2'-aryyli, 2'-alkyyli, 2'-halogeeni tai 2'-amino, mutta ei
2'-H, jossa allyyli-, aryyli- tai alkyyli-ryhmät voivat
olla substituoimattomia tai substituoituja esimerkiksi
25 halogeeni-, hydroksi-, trifluorimetyyli-, syaani-, nitro-,
asyylioksi-, alkoksi-, karboksyyli-, karbalkoksyyli- tai
aminoryhmillä.

Tämän keksinnön tavoitteena on saattaa käyttöön
oligonukleotideja, joita voidaan käyttää analysoimaan ja
30 selittämään parametrien, kuten nukleaaresistenssin, dup-
leksin pysyvyyden ja RNAasi H:n aktivaation, merkitystä
antisense-oligonukleotidien tehokkuudelle. Toinen tämän
keksinnön tavoite on saattaa käyttöön oligonukleotideja,
joilla on solujen, patogeenin tai viruksen geenien ilmen-
35 tymistä säännöstelevä vaikutus mRNA:n tasolla. Vielä yksi

tämän keksinnön tavoite on saattaa käyttöön terapeuttisia oligonukleotideja, jotka ovat hyvin tehokkaita antisense-oligonukleotideihin perustuvassa hoitokäytännössä. Tämän keksinnön mukaiset oligonukleotidit ovat käyttökelpoisia kunkin näiden tämän keksinnön tavoitteiden saavuttamiseen.

Piirrosten lyhyt kuvaus

Kuvio 1 on nukleaaasilla käsiteltyjen oligonukleotidien ioninvaihto-HPLC-analyysi. Osakuviossa A ovat profiilit A, B ja C oligonukleotidien F, C ja A profiileja SVPD:lla suoritettun 420 minuutin pituisen pilkkomisen jälkeen. Osakuviossa B on profiili A pilkkomaton oligonukleotidifosfodiesteri ja profiili B tämä sama profiili sen jälkeen kun sitä on pilkottu 1 minuutin ajan SVPD:lla.

Kuvio 2 esittää tuloksia oligonukleotideilla esimerkiksi 4 kuvatulla tavalla tehdystä RNAasi H -aktivaatiotutkimuksista.

Edullisten sovellutusmuotojen yksityiskohtainen selitys

Tästä keksinnöstä saadaan sen ensimmäisessä kohteessa käyttöön oligonukleotideja, jotka ovat käyttökelpoisia sellaisten parametrien tutkimiseen, jotka ovat tärkeitä antisense-nukleotidien tehokkaalle toiminnalle. Tässä keksinnössä termiin oligonukleotidi sisältyvät polymeerit, jotka koostuvat kahdesta tai useammasta ribonukleotidista, deoksiribonukleotidista tai kummastakin näistä nukleotideista, joissa ribonukleotidi- ja/tai deoksiribonukleotidimonomeerit ovat liittyneet toisiinsa 5' - 3'-sidoksin, joita voivat olla mitä tahansa antisense-oligonukleotidien valmistuksen alalla tunnetuista sidoksista. Lisäksi termiin oligonukleotidit kuuluvat sellaiset molekyylit, joissa on modifioituja nukleiinihappoja/emäksiä ja/tai sokereita sekä sellaiset molekyylit, joissa on niihin liitettyjä substituentteja, kuten diamiineja, kolesteryyli-ryhmiä tai muita lipofiilisiä ryhmiä. Tiettyjä monomeerien

edullisia yhdistelmiä ja monomeerien välisiä sidoksia on tarkasteltu yksityiskohtaisemmin tuonnempana.

Tavallisesti arvellaan, että antisense-oligonukleotidin aktiivisuus riippuu oligonukleotidin sitoutumisesta kohteena olevaan nukleiinihappoon, mikä siten sekoittaa kohteen toiminnan joko hybridisoitumisen aiheuttaman toiminnan keskeytymisen johdosta tai RNAasi H:n vaikutuksesta tapahtuneen kohde-RNA:n tuhoutumisen johdosta. Nämä toimintamekanismit viittaavat siihen, että antisense-oligonukleotidin aktiivisuudelle pitäisi olla merkitystä kahdella parametrilla, jotka ovat dupleksin pysyvyys ja RNAasi H:n aktivaatio. Dupleksin pysyvyys on tärkeää, koska oligonukleotidin on otaksuttavasti muodostettava dupletiksi (tai Hoogsteenin pariutumismekanismissa tripleksi) kohteena olevan nukleiinihapon kanssa, jotta se kykenisi vaikuttamaan joko hybridisoitumisen aiheuttaman toiminnan keskeytymisen perusteella tai RNAasi H:n välityksellä tapahtuvan kohteen tuhoutumisen perusteella. Aiheen RNAasi H:n aktivaation (kyky aktivoida RNAasi H:ta kohde-RNA:han hybridisoituna) käyttöön antaa se, että kohdenukleiinihappo on RNA, koska tällaisesta aktivaatiosta voi seurauksena olla kohde-RNA-molekyylin tehokas hajoaminen. Lisäksi jotta antisense-oligonukleotidi voisi toimia in vivo -olosuhteissa, sen on säilyttävä ehyenä riittävän pitkään kyettäkseen vuorovaikutukseen kohteena olevan nukleiinihapon kanssa. Kun tunnetaan se tosiasia, että ympäristössä in vivo -olosuhteissa esiintyy endonukleaasi- ja eksonukleasiaktiivisuuksia, niin tämä vaatimus nostaa esiin kolmannen parametrin; nimittäin se, että antisense-oligonukleotidin on kyettävä kestämään nukleolyyttistä pilkkoutumista.

Kunkin näiden parametrin merkityksen analysoimiseksi ja selittämiseksi antisense-oligonukleotidien tehokkuudelle on välttämätöntä saada käyttöön oligonukleotideja, joissa kutakin näistä parametreista on muutettu. Useiden

tunnettujen oligonukleotidien ominaisuuksia on esitetty tuonnempana olevassa taulukossa I.

Taulukko I

Oligonukleotidien ominaisuuksia

	<u>Oligonukleotidi</u>	<u>Dupleksin pysyvyys¹</u>	<u>Nukleaasi- resis- tenssi²</u>	<u>RNAasi H:n akti- vaatio³</u>
5	Oligodeoksi-ribo- nukleotidi (fosfaatti)	-	-	kyllä
10	Oligodeoksi-ribo- nukleotidi- fosforotioaatti	heikohko	+	kyllä
	Oligodeoksi-ribo- nukleotidi- fosforoditioaatti	heikohko	++	kyllä
15	Oligodeoksi-ribo- nukleotidi- selenoaatti	heikohko	+	N.K.
20	Oligodeoksi-ribo- nukleotidi- fosforamidaatti	heikohko	+++	ei
	Oligoribonukleotidi (fosfaatti)	suurehko	-	ei
25	Oligoribonukleotidi- fosforotioaatti	suurehko	+	ei
	2'-OMe-oligonukleo- tidi (fosfaatti)	suurehko	+	ei
30	2'-OMe-oligoribo- nukleotidi (fosforotioaatti)	suurehko	++	ei
	Oligodeoksiribonuk- leotidi- metyylifosfonaatti	heikohko	+++	ei

35

1. Oligonukleotidin ja komplementaarisen oligoribonukleotidin välisen dupleksin pysyvyys fysiologisissa olosuhteissa verrattuna DNA-RNA -kompleksin pysyvyyteen.

40

2. Verrattuna DNA:sta saatuihin tuloksiin (pilkkomiseen käytetty fosfodiesterasaasi).

3. Oligonukleotidin ja RNA:n välille muodostuneen dupleksin aikaansaama RNAasi H:n aktivaatio.

Tämän keksinnön mukaiset hybridi-oligonukleotidit muodostavat pysyvämpiä duplekseja komplementaarisen RNA:n kanssa kuin oligodeoksiribonukleotidifosforotioaatit. Lisäksi ne ovat vastustuskykyisempiä endonukleolyyttistä ja eksonukleolyyttistä pilkkoutumista vastaan kuin oligodeoksiribonukleotidifosforotioaatit ja ne aktivoivat normaalisti RNAasi H:ta. Tämän johdosta tämän keksinnön mukaiset oligonukleotidit täydentävät taulukossa I esitettyjä oligonukleotideja niiden parametrien tutkimuksissa, jotka liittyvät antisense-oligonukleotidien tehokkuuteen.

Tämän keksinnön ensimmäisen kohteen kyseessä ollessa voi tämän keksinnön mukaisten oligonukleotidien sekvenssi olla mikä tahansa oligonukleotidisekvenssi, koska tällaisessa tutkimuksessa voidaan komplementaariset oligonukleotidit valmistaa sellaisiksi, että niiden sekvenssinä on mikä tahansa sekvenssi. Tämän keksinnön tämän kohteen mukaisille oligonukleotideille on ominaista ainoastaan seuraavat ominaisuudet. Ensimmäiseksi ainakin jotkin tämän keksinnön mukaisissa oligonukleotideissa olevat nukleotidien väliset sidokset ovat fosforotioaatti- ja/tai fosforoditioaattisidoksia. Nukleotidien välisten fosforotioaatti- ja/tai fosforoditioaattisidosten lukumäärä voi useissa erilaisissa sovellutusmuodoissa vaihdella yhdestä sidoksesta niin moneen nukleotidin väliseen sidokseen kuin mitä oligonukleotidissa esiintyy. Siten tässä keksinnössä termin oligonukleotidifosforotioaatti ja/tai -fosforoditioaatti tarkoituksena on kattaa jokainen tällainen sovellutusmuoto. Edullisessa sovellutusmuodossa ovat tämän keksinnön mukaiset oligonukleotidit pituudeltaan noin 2 - noin 50 nukleotidia ja edullisemmin noin 6 - noin 50 nukleotidia. Tässä edullisessa sovellutusmuodossa on siten tämän keksinnön mukaisessa oligonukleotideissa nukleotidien välisiä fosforotioaatti- ja/tai fosforoditioaattisidoksia 1 - noin 49.

Toinen tämän keksinnön tämän kohteen mukaisten oligonukleotidien piirre on se, että niissä käytetään deoksiribonukleosideja. Tämän keksinnön mukaiset oligonukleotidit sisältävät ainakin yhden deoksiribonukleosidin.

5 Tämän keksinnön mukaiset oligonukleotidit sisältävät yhtä-
jaksoisella alueella olevat neljä deoksiribonukleotidia,
joiden määrä voi olla suurempikin, jotta tämä toimisi
RNAasi H:ta aktivoivana segmenttinä. Tietyissä edullisissa
sovellutusmuodoissa käytetään useampaa kuin yhtä tällaista
10 aktivoivaa segmenttiä. Nämä segmentit voivat esiintyä mis-
sä tahansa kohdassa oligonukleotidia. Tämän keksinnön mu-
kaisissa oligonukleotideissa voivat deoksiribonukleosidit
olla vallitsevia. Itse asiassa näissä oligonukleotideissa
voivat nukleosideista olla deoksiribonukleosideja niinkin
15 moni kuin kaikki nukleosidit yhteensä yhtä lukuun ottamat-
ta. Siten edullisessa sovellutusmuodossa, joissa on noin
2 - noin 50 nukleosidia tai edullisimmin noin 6 - noin 50
nukleosidia, on käytettyjen deoksiribonukleosidien luku-
määrä alueella 1 - noin 49 deoksiribonukleosidia.

20 Tämän keksinnön tämän kohteen mukaisten oligonukleotidien kolmas piirre on se, että niissä esiintyy ribonukleosideja, 2'-asemasta substituoituja ribonukleosideja tai näiden yhdistelmiä. Tässä keksinnössä "2'-asemasta substituoitu" tarkoittaa riboosimolekyylin 2'-OH:n substitutiota ryhmillä, jotka ovat esimerkiksi 2'-OMe, 2'-allyyli, 2'-aryyli, 2'-alkyyli, 2'-halogeeni tai 2'-amino, mutta ei 2'-H, jossa allyyli-, aryyli- tai alkyyli-ryhmät voivat olla substituoimattomia tai substituoituja esimerkiksi halogeeni-, hydroksi-, trifluorimetyyli-, syaani-,
25 nitro-, asyylioksi-, alkoksi-, karboksyyli-, karbalkoksyyli- tai aminoryhmillä. Tämän keksinnön mukaiset oligonukleotidit sisältävät ainakin yhden ribonukleosidin ja/tai 2'-asemasta substituoitun ribonukleosidin. Edullisessa sovellutusmuodossa tällaisissa oligonukleotideissa on dup-
35 leksin pysyvyyden parantamiseksi 6 ribonukleosidia, joita

voi olla useampikin, ja/tai 2'-asemasta substituoituja
 ribonukleosideja. Tällaiset ribonukleosidit ja/tai 2'-ase-
 masta substituoidut ribonukleosidit voivat esiintyä yksit-
 täin, pareittain tai suuremmissa yhtäjaksoisissa alueissa
 5 ja niitä voi esiintyä missä tahansa oligonukleotidin ase-
 massa tai useissa asemissa oligonukleotidia. Oligonukleo-
 tidien kaikista nukleosideista voivat tällaiset ribonuk-
 leosidit ja/tai 2'-asemasta substituoidut ribonukleosidit
 muodostaa yhtä nukleosidia lukuun ottamatta niin monta
 10 nukleosidia kuin oligonukleotidissa on nukleosideja. Siten
 edullisessa sovellutusmuodossa, jossa on noin 2 - noin 50
 nukleosidia tai edullisemmin noin 6 - noin 50 nukleosidia,
 on ribonukleosidien tai 2'-asemasta substituoitujen ribo-
 nukleosidien määrä noin 1 - noin 49 deoksiribonukleosidia.

15 Mahdollisuudet vaihdella nukleotidien välisten
 fosforotioaatti- ja/tai fosforoditioaattisidosten lukumää-
 riä ja asemia, deoksiribonukleosideja ja ribonukleosideja
 tai 2'-asemasta substituoituja ribonukleosideja antaa tut-
 kijalle mahdollisuuden tarkastella yksityiskohdissaan si-
 20 tä, kuinka kukin näistä muuttujista vaikuttaa parametrei-
 hin, jotka ovat nukleaasiresistenssi, dupleksin pysyvyys
 ja RNAasi H:n aktivaatio. Kyky vaihdella oligonukleotidin
 kokoa antaa mahdollisuuden tutkia vielä yhtä parametriä.
 Lisäksi pienekköjä oligonukleotideja (esimerkiksi dimee-
 25 reitä) voidaan käyttää suurempien oligonukleotidien raken-
 nusosina. Siten kukin tällainen mahdollinen edellä kuvattu
 sovellutusmuoto on käyttökelpoinen näissä tutkimuksissa.

Tästä keksinnöstä saadaan käyttöön sen toisessa
 kohteessa hybridi-oligonukleotideja, jotka ovat tehokkaita
 30 inhiboimaan viruksia, patogeenisiä organismeja tai solun
 geenien ilmentymistä. Kyky inhiboida tällaisia tekijöitä
 on selvästi tärkeää useiden eri sairauksien hoidossa. Tä-
 män keksinnön tämän kohteen mukaisten oligonukleotidien
 ominaisuudet ovat edellä kuvattujen nukleotidien ominai-
 35 suuksien mukaiset lukuun ottamatta sitä, että tämän kek-

sinnön tämän kohteen mukaisten oligonukleotidien oligonukleotidisekvenssi on komplementaarinen viruksesta, patogeenisestä organismista tai solun geenistä peräisin olevan nukleeiinihapposekvenssin suhteen. Tällaiset nukleotidit
 5 ovat pituudeltaan edullisesti noin 6 - noin 50 nukleotidia. Tässä keksinnössä termi "oligonukleotidisekvenssi, joka on komplementaarinen nukleeiinihapposekvenssin suhteen" tarkoittaa oligonukleotidijaksoa (2 - noin 50 nukleotidia), joka hybridisoituu nukleeiinihapposekvenssiin
 10 fysiologisissa olosuhteissa, esimerkiksi Watsonin ja Crickin emäspariutumisen avulla (oligonukleotidin ja yksijuosteisen nukleeiinihapon vuorovaikutus) tai Hogsteenin emäspariutumisen välityksellä (oligonukleotidin ja kaksijuosteisen nukleeiinihapon välinen vuorovaikutus) tai millä
 15 tahansa muulla tavalla. Tällainen hybridisoituminen fysiologisissa olosuhteissa määritetään käytännön tasolla tarkastelemalla nukleeiinihapposekvenssin häiriintynyttä toimintaa.

Nukleeiinihapposekvenssi, jonka suhteen tämän keksinnön mukainen oligonukleotidi on komplementaarinen, on
 20 erilainen sen mukaan mikä agenssi on inhiboitava. Monissa tapauksissa nukleeiinihapposekvenssi on viruksen nukleeiinihapposekvenssi. Antisense-oligonukleotidien käyttö useiden eri virusten inhiboimiseen on tunnettua ja siitä on äskettäin esitetty katsaus julkaisussa Agrawal, Tibtech
 25 (1992) 152 - 158. Viruksen nukleeiinihapposekvenssejä, jotka ovat komplementaarisia tehokkaita anti-sense -oligonukleotideja kohtaan, on kuvattu useista viruksista, joihin kuuluvat humaan-
 30 i-immuunikatovirustyyppi 1 (US-patenttijulkaisu nro 4 806 463, jonka sisältö on liitetty tähän keksintöön siihen oikeuttavien säännösten nojalla), Herpes simplex -virus (US-patenttijulkaisu nro 4 689 320, jonka sisältö on liitetty tähän keksintöön siihen oikeuttavien säännösten nojalla) influenssavirus (US-patenttijulkaisu
 35 nro 5 XXX XXX; nro 07/516 275, myönnetty 30.7.1992; humaa-

ni-papillomavirus [Storey, et al., Nucleic Acids Res. 19 (1991) 4109 - 4114]. Sekvenssejä, jotka ovat komplementaarisia mitä tahansa näitä nukleiinihapposekvenssejä kohtaan, voidaan käyttää tämän keksinnön mukaisten oligonukleotidien kyseessä ollessa, samoin kuin niitä oligonukleotidisekvenssejä, jotka ovat komplementaarisia minkä tahansa muun viruksen nukleinihapposekvenssin suhteen. Muita viruksia, joilla on tunnettuja nukleiinihapposekvenssejä, joita vastaan antisense-oligonukleotideja voidaan valmistaa, ovat suu- ja sorkkatautivirus [tätä on käsitelty julkaisussa Robertson, et al., J. Virology 35 (1980) 651; Harris, et al., J. Virology 36 (1980) 659], Yellow fever -virus [tätä on käsitelty julkaisussa Rice, et al., Science 229 (1985) 726], Varicella-Zoster -virus [tätä on käsitelty julkaisussa Davison ja Scott, J. Gen. Virology 67 (1986) 2279 ja Cucumber mosaic -virus [tätä on käsitelty julkaisussa Richards, et al., Virology 89 (1978) 395].

Vaihtoehtoisesti voi tämän keksinnön mukaisten oligonukleotidien oligonukleotidisekvenssi olla komplementaarinen patogeenisen organismin nukleiinihapposekvenssin suhteen. Monien patogeenisten organismien, joihin kuuluvat malariaorganismi, Plasmodium falciparum, ja monia patogeenisiä bakteereita, nukleiinihapposekvenssejä on kuvattu. Tämän keksinnön mukaisissa oligonukleotideissa voidaan käyttää mistä tahansa tällaisesta patogeenisestä organismista peräisin olevien nukleiinihapposekvenssien suhteen komplementaarisia oligonukleotidisekvenssejä. Esimerkkejä patogeenisistä eukaryooteista, joissa on tunnettuja nukleiinihapposekvenssejä, joita vastaan voidaan valmistaa antisense-oligonukleotideja, ovat Trypanosoma brucei gambiensi ja Leishmania [tätä on käsitelty julkaisussa Campbell, et al., Nature 311 (1984) 350], Fasciola hepatica [tätä on käsitelty julkaisussa Zurita, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 2340]. Antifungaalisia oligonukleotideja voidaan valmistaa käyttäen kohteena

hybridisoituvaa aluetta, jossa on oligonukleotidisekvenssi, joka on komplementaarinen sellaisen nukleiinihapposekvenssin suhteen, joka on peräisin esimerkiksi kitiinisyn-tetaasigeenistä, ja antibakteriaalisia oligonukleotideja
 5 voidaan valmistaa käyttäen esimerkiksi alaniinirasemaasi-geeniä.

Vielä yhdessä sovellutusmuodossa voi tämän keksin-nön mukaisten oligonukleotidien oligonukleotidisekvenssi olla komplementaarinen sellaisen solun geenin tai sellai-
 10 sen geenin transkriptiomuodon suhteen, jonka epänormaali ilmentäminen tai epänormaali tuote aiheuttaa sairauden. Useiden tällaisten solun geenien nukleiinihapposekvenssiä on kuvattu, ja näihin kuuluvat prioniproteiini (Stahl ja Prusiner, FASEB J. 5 (1991) 2799-2807), Alzheimerin tau-
 15 tiin liittynyt amyloidia muistuttava proteiini (US-patent-tijulkaisu nro 5 015 570, jonka sisältö on liitetty tähän keksintöön siihen oikeuttavien säännösten nojalla), ja useat erilaiset tunnetut onkogeenit ja proto-onkogeenit, kuten c-myb, c-myc, c-abl ja n-ras. Lisäksi oligonukleoti-
 20 deja, jotka inhiboivat suureksi osaksi tai yksinomaan spermatogeneesiin, siittiöiden liikkuvuuteen, siittiön sitoutumiseen munasoluun ja mihin tahansa muuhun siittiön elinkykyyn vaikuttavaan vaiheeseen liittyvien rakennepro-teiinien tai entsyymien synteesiä, voidaan käyttää ehkäi-
 25 syvälineenä miehille. Samalla tavoin voivat naisille tar-koitetut ehkäisyvalmisteet olla oligonukleotideja, jotka inhiboivat ovulaatioon, hedelmöittymiseen, implantaatioon tai näihin tapahtumiin liittyvien hormonien biosynteesiin liittyviä proteiineja tai entsyymejä.

Kohonnutta verenpainetta voidaan säännöstellä oli-godeoksinukleotideilla, jotka estävät angiotensiinikonver-taasientsyymin tai tätä muistuttavien entsyymien synteesiä
 30 reniini/angiotensiinijärjestelmässä; verihiutaleiden agg-regaatiota voidaan säännöstellä estämällä tromboksaani
 35 A₂:n synteesiin tarvittavien entsyymien synteesiä käytet-

täväksi sydänlihas- ja aivoverenkiertosairauksissa, infarkteissa, arterioskleroosissa, embolismissa ja tromboosissa; kolesterolin kerääntyminen valtimon seinämiin voidaan inhiboida estämällä rasva-asyylikoentsyymi A: koles-

5 teroliasyyliitransferaasin synteesiä valtimonkovettumistaudissa; koliinifosfotransferaasin synteessin inhibitio voi olla käyttökelpoista hypolipidemiassa.

On useita neuraalisia sairauksia, joissa normaalien toimintojen keskeyttämisestä hybridisaation avulla voidaan

10 käyttää vähentämään tai poistamaan sairauden haitalliset vaikutukset. Esimerkiksi monoamiinioksidaasin synteessin ehkäisyä voidaan käyttää Parkinsonin taudissa; katekoli-o-

metyyliitransferaasin ehkäisyä voidaan käyttää depression hoitoon; ja indoli N-metyyliitransferaasin ehkäisyä voidaan

15 käyttää skitsofrenian hoidossa.

Prostaglandiineihin ja leukotrieeneihin johtavan arakidonihaposta alkavan entsyymien sarjan valittujen entsyymien estäminen voi olla käyttökelpoista verihitulehduksien

20 aggregaation, allergian, tulehduksen, kiputilan ja astman vastustamisessa.

Multidrug resistance (mdr) -geenin, joka aiheuttaa resistenssin kehittymisen useita erilaisia syöpää ehkäiseviä

25 lääkeaineita vastaan ja joka on tärkeä este kemoterapiassa, ilmentämien proteiinien syntymisen estäminen voi osoittautua hyödylliseksi syövän hoidossa. Oligonukleotidisekvenssejä, jotka ovat komplementaarisia mistä tahansa näistä geeneistä peräisin olevan nukleiinihapposekvenssin

30 suhteen, voidaan käyttää tämän keksinnön mukaisina oligonukleotideina, mikä pitää myös paikkansa sellaisten oligonukleotidisekvenssien suhteen, jotka ovat komplementaarisia minkä tahansa muun solun geenin tai geenin transskriptiotuotteen suhteen, jonka epänormaali ilmentyminen tai tuote aiheuttaa sairauden.

Geenin ilmentymisen säätelyä antisense-mekanismien

35 perusteella kasvisoluissa on kuvattu US-patenttijulkaisus-

sa nro 5 107 065, jonka sisältö on liitetty tähän keksintöön siihen oikeuttavien säännösten nojalla.

Tästä keksinnöstä saadaan sen kolmannessa kohteessa käyttöön oligonukleotidien terapeuttisia farmaseuttisia formulaatioita, jotka ovat tehokkaita hoidettaessa virusinfektiota, patogeenisten organismien aiheuttamia infektioita tai epänormaalista geenin ilmentymisestä tai epänormaalin geenituotteen ilmentymisestä johtuvaa sairautta. Tällaiset terapeuttiset farmaseuttiset formulaatiot sisältävät tämän keksinnön toisen kohteen mukaisia oligonukleotideja farmaseuttisesti hyväksyttävässä kantaja-aineessa.

Tästä keksinnöstä saadaan sen neljännessä kohteessa käyttöön menetelmä, jolla on tarkoitus inhiboida viruksen, patogeenisen organismin tai solun geenin geenien ilmentymistä, ja joka menetelmä käsittää vaiheen, jossa kahdessa edellisessä tapauksessa viruksen tai patogeenisen organismin infektoimaan soluun tai viimeksi mainitussa tapauksessa yleensä soluihin, tuodaan tämän keksinnön mukaisia oligonukleotideja. Nämä menetelmät ovat käyttökelpoisia geenien ilmentymisen ja spesifisten geenien toiminnan tutkimisessa.

Tästä keksinnöstä saadaan sen viidennessä kohteessa käyttöön menetelmä sillä tavoin sairastuneen ihmisen tai eläimen hoitamiseksi, että sairaus johtuu virusinfektiosta tai infektoitumisesta patogeenisellä organismilla tai solun geenin epänormaalista ilmentymisestä tai tuotteesta. Tämä menetelmä käsittää sen, että sairastuneelle ihmiselle tai eläimelle annetaan tämän keksinnön mukaisten oligonukleotidien farmaseuttisia formulaatioita. Tällaisessa annostelussa käytettäviin annosteluteihin kuuluvat edullisesti oraalinen, intranasaalinen, rektaalinen ja paikallinen annostelu. Näissä tämän keksinnön mukaisissa hoitomenetelmissä oligonukleotideja voidaan antaa yhdessä muiden terapeuttisten aineiden, esimerkiksi AZT:n kanssa AIDS:n kyseessä ollessa.

Tämän keksinnön mukaisella hoitomenetelmällä voidaan hoitaa useita erilaisia virussairauksia, joita ovat AIDS, ARC, oraali- tai genitaaliherpes, papilloomasyylät, influenssa, suu- ja sorkkatauti, keltakuume, vesirokko, 5 vyöruusu, HTLV-leukemia ja hepatiitti. Tämän keksinnön mukaisella hoitomenetelmällä hoidettavissa olevia sienisairauksia ovat kandidiaasi, histoplasmoosi, kryptokokkoosi, blastomykoosi, aspergilloosi, sporotrikoosi, kromomykoosi, dermatofytoosi ja kokkidioidomykoosi. Menetelmää 10 voidaan myös käyttää rikketsiasairauksien hoitoon, (esimerkiksi lavantauti, Rocky Mountain spotted fever) sekä sukupuoliteitse leviävien tautien hoitamiseen, joita saavat aikaan Chlamydia trachomatis tai Lymphogranuloma venereum. Tämän keksinnön mukaisella menetelmällä voidaan hoi- 15 taa useita erilaisia loistauteja, joita ovat amebiaasi, Chagan tauti, toksoplasmoosi, pneumokystoosi, giardiaasi, kryptosporidioosi, trikomoniaasi ja Pneumocystis carini - pneumonia; näitä ovat myös matosairaudet (helmintiaasit), kuten askariaasi, filariaasi, trikinoosi, skistosomiaasi 20 ja nematodi- tai kestodi-infektiot. Malariaa voidaan hoitaa tämän keksinnön mukaisella hoitomenetelmällä riippumatta siitä, onko se P. falciparumin, P. vivaxin, P. oralen tai P. malariaen aiheuttana.

Tämän keksinnön mukaisella hoitomenetelmällä voidaan 25 hoitaa kaikkia edellä mainittuja infektiotauteja, koska näitä sairauksia vastaavat infektoivat agenssit ovat tunnettuja ja voidaan siten valmistaa tämän keksinnön mukaisia oligonukleotideja, joissa on sitä nukleiinihapposekvenssiä vastaan komplementaarinen oligonukleotidisekvenssi, kuten olennainen geenin, joka on olennainen nukleiinihapposekvenssi infektoivan agenssin lisääntymiselle. 30

Muut sairaudet tai sairaustilat, jotka ovat hoidettavissa tämän keksinnön mukaisella menetelmällä, johtuvat solun geenin epänormaalista ilmentymisestä tai tuotteesta. 35 Näitä sairauksia voidaan hoitaa antamalla tämän keksinnön

mukaisia oligonukleotideja ja näitä on tarkasteltu edellä tässä patenttiselityksessä.

Tämän keksinnön mukaisia oligonukleotideja voidaan syntetisoida tällä alalla tunnetuilla menetelmillä. Toise-
 5 na vaihtoehtona, joka on samalla edullinen vaihtoehto, voidaan tällaisia oligonukleotideja syntetisoida H-fosfonaattilähestymistavalla, joka on selitetty US-patenttijulkaisussa nro 5 XXX XXX (nro 07/334 679; jätetty
 10 10.3.1992), jonka sisältö on liitetty tähän keksintöön siihen oikeuttavien säännösten nojalla, ja julkaisussa Agrawal ja Tang, Tetrahedron Lett. 31 (1990) 7541 - 7544. Tämän keksinnön mukaiset oligonukleotidit voidaan saada vieläkin vastustuskykyisemmäksi nukleolyyttisillä entsyymeillä pilkkoutumista vastaan lisäämällä 5'- ja/tai 3'-
 15 päähän pääterakenteita.

Seuraavien esimerkkien tarkoituksena on antaa lisävalaistusta tiettyihin edullisiin tämän keksinnön sovellutusmuotoihin eikä niitä ole tarkoitettu tätä keksintöä rajoittaviksi.

20 **Esimerkki 1**

Hybridi-oligonukleotidifosforotioaattien synteesi

Hybridi-oligonukleotidifosforotioaatit syntetisoitiin GPC:n avulla 5 - 6 mikromoolin mittakaavassa automaattisessa syntetointilaitteessa (malli 8700, Millipore,
 25 Milford, MA) käyttäen US-patenttijulkaisussa nro 5, XXX XXX (nro 07/344 679; jätetty 19.3.1992) H-fosfonaattilähestymistapaa. 2'-OMe-ribonukleotidi-H-fosfonaatit syntetisoitiin vakiomenetelmiä noudattaen. Oligonukleotidien segmentit, jotka sisältävät 2'-OMe-nukleosidia, koottiin
 30 käyttäen halutuissa sykleissä 2'-OMe-ribonukleosidi-H-fosfonaatteja. Samalla tavoin koottiin oligonukleotidien segmentit, jotka sisälsivät deoksiribonukleosideja, käyttämällä halutuissa sykleissä deoksinukleosidi-H-fosfonaatteja. Kokoamisen jälkeen GPC:hen kiinnittynyt oligonukleotidi-H-fosfonaatti hapetettiin rikillä fosforotioaattisidok-

sen aikaansaamiseksi. Tämän jälkeen oligonukleotideistä poistettiin suojaus väkevässä NH_4OH :ssa 40°C :ssa 48 tunnin ajan.

5 Oligonukleotidiraakatuote (noin A_{260} yksikköä) analysoitiin käänteis-matalapainekromatografialla C_{18} -käänteisfaasimediumissa. DMT-ryhmä poistettiin käsittelemällä 80-%:isella vesipitoisella etikkahapolla, minkä jälkeen oligonukleotidit dialysoitiin tislattua vettä vastaan ja ne lyofilisoitiin.

10 Syntetisoidut oligonukleotidit on esitetty seuraavassa taulukossa II.

Taulukko II

Syntetoiduthybridi-oligonukleotidifosforotioaatit*

15	Oligo- nukleotidi	Rakenne
	A	$5' \text{A C A C C C A A T T C T G A A A A T G G} 3'$
	B	<u>A C A C C C A A T T C U G A A A A U G G</u>
	C	<u>A C A C C C A A T T C T G A A A A U G G</u>
20	D	<u>A C A C C C A A T T C U G A A A A U G G</u>
	E	<u>A C A C C C A A U T C T G A A A A T G G</u>
	F	<u>A C A C C C A A U U C U G A A A A U G G</u>

Alleiviivatut sekvenssit sisältävät 2'-OMe-ribonukleosidin.

25 *Kaikki nukleotidien väliset sidokset ovat A-G-oligonukleotidien kyseessä ollessa fosforotioaattisidoksia.

Esimerkki 2

Hybridi-oligonukleotidifosforotioaattiensuhteellinen nukleaasiresistenssi

30 Useiden erilaisten hybridi-oligonukleotidifosforotioaattien suhteellisen nukleaasiresistenssin tutkimiseksi käsiteltiin oligonukleotideja käärmeenmyrkyn fosfodiesterasilla (SVPD). Noin $0,2 A_{260}$ -yksikköä oligonukleotideja A,

C ja F liuotettiin 500 µl:aan puskuria (40 mM NH_4CO_3 , pH 0,4 + 20 mM MgCl_2) ja seokseen yhdistettiin ____ yksikköä SVPD:tä. Seosta inkuboitiin 37 °C:ssa 420 minuuttia. 0, 200 ja 420 minuutin jälkeen otettiin 165 µl:n suuruisia
 5 näytteitä ja ne analysoitiin käyttäen ioninvaihto-HPLC:tä. Tulokset on esitetty kuviossa 1. Oligonukleotidi F oli hyvin resistentti fosfodiesterasille, kun taas oligonukleotidi A pilkkoutui melkein täydellisesti ja oligonukleotidi C pilkkoutui 50-%:isesti (osakuviot A). Oligonukleotidifosfodiesteri pilkkoutui noin 80-%:isesti yhdessä minuutissa yhdellä kymmenesosalla SVPD-konsentraatiota.

Nämä tulokset viittaavat siihen, että 2'-OMe-ribonukleosidien esiintyminen oligonukleotidifosforotioaatissa parantaa resistenssiä eksonukleolyyttistä pilkkoutumista
 15 vastaan ja että tämä parantunut resistenssi parani edelleen käytettäessä suurempaa 2'-OMe-ribonukleotidien osuutta. Ribonukleotidien, muiden 2'-asemasta substituoitujen ribonukleotidien ja 2'-OMe-ribonukleotidien samanlaisen luonteen ja käyttäytymisen johdosta nämä tulokset myös
 20 viittaavat siihen, että samanlainen nukleasiresistenssin parantuminen saataisiin hybridi-oligonukleotidifosforotioaateilla ja/tai -fosforotioaateilla, joissa on ribonukleotideja, 2'-asemasta substituoituja ribonukleotideja tai ribonukleotidien ja 2'-asemasta substituoitujen ribonukleotidien seosta.
 25

Esimerkki 3

Hybridi-oligonukleotidifosforotioaattien dupleksin suhteellinen stabiilisuus

Oligonukleotideista A - F tutkittiin niiden suhteellinen sellaisten dupleksien stabiilisuus, jotka olivat
 30 muodostuneet komplementaaristen oligodeoksiribonukleotidien sekä komplementaaristen oligoribonukleotidien kanssa. Erillisissä reaktioissa yhdistettiin kutakin oligonukleotidia A - F vastaavaan määrään (0,2 A_{260} -yksikköä) vastaavaa
 35 oligonukleotidia seoksessa, joka sisälsi 150 mM NaCl,

10 mM Na_2PO_4 , 1 mM EDTA ja jonka pH oli 7. Seosta kuumentettiin 85 °C:ssa 5 minuuttia, minkä jälkeen se jäädytettiin 30 °C:seen. Lämpötila nostettiin tämän jälkeen 30 °C:sta 80 °C:seen nopeudella, joka oli 1 °C minuuttia kohti ja A_{260} -arvoa seurattiin lämpötilan funktiona. Tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa III.

Taulukko III

Oligo-nukleotidin numero	DNA-DNA-dupleksi		DNA-RNA-dupleksi		Tm TNA-dupleksissa - Tm RNA-dupleksissa	DNA-RNA-dupleksin ja magnesiumin seos
	Tm:n ero verrattuna oligonukleotidiin A (°C)		Tm:n ero verrattuna oligonukleotidiin A (°C)			
	DNA:n Tm (°C)	Tm	RNA:n Tm (°C)	Tm		
A	51,1	0	43,4	0	-7,7	0
B	48,3	-2,8	50,9	7,5	2,6	10,3
C	49,9	-1,2	48,9	5,5	-1,0	6,1
D	45,1	-6,0	50,9	7,5	5,8	8,0
E	47,2	-3,9	51,1	7,7	3,9	8,4
F	47,6	-3,5	61,1	17,7	13,5	21,0

Näistä tuloksista käy ilmi, että kun komplementaarinen oligonukleotidi on oligoribonukleotidi, niin 2'-OMe-ribonukleotidien käyttö parantaa dupleksin stabiilisuutta ja että tämä parantuminen tehostuu käyttämällä suurempia osuuksia 2'-OMe -ribonukleosideja. Näiden tulosten tulisi olla samalla tavoin sovellettavissa hybridi-oligonukleotidifosforotioaatteihin ja/tai -fosforoditioaatteihin, jotka sisältävät ribonukleotideja, 2'-asemasta substituoituja ribonukleotideja tai ribonukleotidien ja 2'-asemasta substituoitujen ribonukleotidien seoksia. Siten tämän keksinnön mukaisten oligonukleotidifosforotioaattien ja/tai -fosforoditioaattien tulisi sitoutua viruksen RNA:han tai viruksen, patogeenisen organismin tai solun mRNA:han suuremmalla affiniteetillä kuin tavalliset oligodeoksinukleotidifosforotioaatit.

Esimerkki 4

RNAasi H:n aktivaatio hybridi-oligonukleotidifosforotioaateilla

Oligonukleotidifosforotioaateista ja useista erilaisista hybridi-oligonukleotidifosforotioaateista tutkittiin niiden ominaisuudet RNAasi H:n aktivaation suhteen. Kontrollina käytettiin oligonukleotidia A (taulukko II), joka on oligonukleotidifosforotioaatti, jonka tiedetään aktivoivan RNAasi H:ta. Oligonukleotidista F (tämä on oligonukleotidifosforotioaatin 2'-OMe-analogi) ja oligonukleotideista C, B ja E, jotka ovat hybridi-oligonukleotideja) tutkittiin niiden kykyä aktivoida RNAasi H:ta.

Kokeen suorittamiseksi syntetisoitiin komplementaarinen 32-meerinen oligoribonukleotidi (kuvio 2) ja sille suoritettiin 5'-puoleisen pään kinaasikäsittely, ^{32}P -leimalla varustettu 32-meerinen RNA (0,003 A_{260} -yksikköä; 0,01 μg) ja oligonukleotideja (0,0635 A_{260} -yksikköä; 1,9 μg) yhdistettiin 20 μl :aan puskuria (tämän koostumus oli 0,15 M NaCl, 0,01 MgCl_2 , 0,01 M Tris-kloridi ja sen pH oli 7,9 ja se sisälsi 0,001 M DTT:tä). Seosta inkuboitiin

37 °C:ssa siten, että siihen yhdistettiin 6 yksikköä RNAasi H:tä (E. coli). Seoksesta poistettiin 4,5 µl:n suuruisia näytteitä 0, 15, 30 ja 60 minuutin kohdalla ja ne analysoitiin polyakryyliamidigeelielektroforeesilla.

5 Oligonukleotidissa A (dupleksi A) havaittiin kohtaspesifinen RNA:n pilkkoutuminen RNAasi H:lla. Oligonukleotidista F (2'-OMe-analogi; dupleksi B) ei havaittu RNA:n pilkkoutuvan RNAasi H:n läsnäollessa. Hybridi-oligonukleotideista B, C ja E (dupleksit C, D, E) havaittiin RNA:n
10 kohtaspesifinen pilkkoutuminen RNAasi H:lla. Dupleksissa F, jossa tutkittiin epäyhteensopivaa oligonukleotidifosforotioaattia, ei havaittu RNA:n pilkkoutumista. Kanavasta G käy ilmi, että RNAasi H:n läsnäollessa RNA ei pilkkoutunut.

15 **Esimerkki 5**

HIV:n inhibitio hybridi-oligonukleotidifosforotioaateilla

Hybridi-oligonukleotidifosforotioaateista tutkittiin niiden kyky inhiboida HIV-1:tä kudosisoluviljelmässä.
20 H9-lymfosyyttejä infektoitiin HIV-1 -virioneilla ($\approx 0,01 - 0,1$ TCID₅₀/solu) tunnin ajan 37 °C:ssa. Tunnin kuluttua adsorboitumattomat virionit pestiin pois ja infektoidut solut jaettiin 24-kuoppaisille levyille. Infektoituihin soluihin lisättiin asianmukainen konsentraatio (kanta-
25 liuoksesta) oligonukleotidia vaaditun konsentraation aikaansaamiseksi 2 ml:ssa mediumia. Positiivisessa kontrollikokeessa lisättiin ddC:tä tai AZT:tä. Tämän jälkeen soluja viljeltiin kolme päivää. Kolmen päivän kuluttua koottiin supernatantit infektoidusta viljelmästä talteen ja
30 niistä määritettiin p24:n ilmentyminen ELISA:lla. -24:n ilmentymistasoa verrattiin oligonukleotidilla käsiteltyjen ja käsittelemättä jätettyjen (ei lääkettä) infektoitujen solujen kesken.

Kaikkien tutkittujen hybridi-oligonukleotidifosforotioaattien havaittiin inhiboivan merkittävästi p24:n
35

ilmentymistä mikrog/ml-konsentraatioissa ilman merkittävää
sytotoksisuutta (näitä tuloksia ei ole esitetty). Nämä
tulokset viittaavat siihen, että 2'-OMe-ribonukleotideja
sisältävät hybridi-oligonukleotidifosforotioaatit ovat
5 tehokkaita geenien ilmentymisen inhibiittoreita. Samanlai-
nen tehokkuus voitaisiin odottaa saatavan hybridi-oligo-
nukleotidifosforotioaateista ja/tai -fosforotioaateista,
jotka sisältävät ribonukleosideja, 2'-asemasta substituoi-
tuja ribonukleosideja tai ribonukleosidien ja 2'-asemasta
10 substituoitujen ribonukleosidien seosta.

Patenttivaatimukset

1. Hybridi-oligonukleotidifosforotioaatti ja/tai
-fosforoditioaatti, t u n n e t t u siitä, että se si-
5 sältää yhden kustakin komponentista, jotka ovat: deoksiri-
bonukleosidi, ribonukleosidi tai 2'-asemasta substituoitu
ribonukleosidi ja nukleotidien välinen fosforotioaatti-
ja/tai fosforoditioaattisidos.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen hybridi-oligonuk-
10 leotidifosforotioaatti ja/tai -fosforoditioaatti, t u n -
n e t t u siitä, että deoksiribonukleosidi esiintyy seg-
mentissä, jossa on ainakin neljä peräkkäistä deoksiribo-
nukleosidia.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen hybridi-oligonuk-
15 leotidifosforotioaatti ja/tai -fosforoditioaatti, t u n -
n e t t u siitä, että ribonukleosidia tai 2'-asemasta
substituoitua ribonukleosidia esiintyy ainakin kahden pe-
räkkäisen ribonukleosidin ja/tai 2'-asemasta substituoitun
ribonukleosidin muodostamassa segmentissä.

20 4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen hybridi-oligonuk-
leotidifosforotioaatti ja/tai -fosforoditioaatti, t u n -
n e t t u siitä, että sillä on sellainen oligonukleotidi-
sekvenssi, joka on komplementaarinen viruksesta, patogee-
nisestä organismista tai solun geenistä peräisin olevan
25 nukleiinihapposekvenssin suhteen.

5. Patenttivaatimuksen 2 mukainen hybridi-oligonuk-
leotidifosforotioaatti ja/tai -fosforoditioaatti, t u n -
n e t t u siitä, että sillä on sellainen oligonukleotidi-
sekvenssi, joka on komplementaarinen viruksesta, patogee-
30 nisestä organismista tai solun geenistä peräisin olevan
nukleiinihapposekvenssin suhteen.

6. Patenttivaatimuksen 3 mukainen hybridi-oligonuk-
leotidifosforotioaatti ja/tai -fosforoditioaatti, t u n -
n e t t u siitä, että sillä on sellainen oligonukleotidi-
35 sekvenssi, joka on komplementaarinen viruksesta, patogee-

nisesta organismista tai solun geenistä peräisin olevan nukleiinihapposekvenssin suhteen.

7. Terapeuttinen farmaseuttinen formulaatio, t u n n e t t u siitä, että se sisältää patenttivaatimuksen 4 mukaista oligonukleotidia farmaseuttisesti hyväksyttävässä kantaja-aineessa.

8. Terapeuttinen farmaseuttinen formulaatio, t u n n e t t u siitä, että se sisältää patenttivaatimuksen 5 mukaista oligonukleotidia farmaseuttisesti hyväksyttävässä kantaja-aineessa.

9. Terapeuttinen farmaseuttinen formulaatio, t u n n e t t u siitä, että se sisältää patenttivaatimuksen 6 mukaista oligonukleotidia farmaseuttisesti hyväksyttävässä kantaja-aineessa.

10. Menetelmä viruksen, patogeenisen organismin tai solun geenin geenien ilmentymisen inhiboimiseksi, t u n n e t t u siitä, että menetelmä käsittää vaiheen, jossa, samassa järjestyksessä mainittuna, viruksella infektoiduun soluun, patogeeniseen organismiin tai soluun tuodaan patenttivaatimuksen 4 mukaista oligonukleotidia.

11. Menetelmä viruksen, patogeenisen organismin tai solun geenin geenien ilmentymisen inhiboimiseksi, t u n n e t t u siitä, että menetelmä käsittää vaiheen, jossa, samassa järjestyksessä mainittuna, viruksella infektoiduun soluun, patogeeniseen organismiin tai soluun tuodaan patenttivaatimuksen 5 mukaista oligonukleotidia.

12. Menetelmä viruksen, patogeenisen organismin tai solun geenin geenien ilmentymisen inhiboimiseksi, t u n n e t t u siitä, että menetelmä käsittää vaiheen, jossa, samassa järjestyksessä mainittuna, viruksella infektoiduun soluun, patogeeniseen organismiin tai soluun tuodaan patenttivaatimuksen 6 mukaista oligonukleotidia.

Patentkrav

1. Hybridoligonukleotid-fosforotioat och/eller
-fosforoditioat, k ä n n e t e c k n a t av, att det om-
5 fattar vardera av följande: en deoxiribonukleosid, en ri-
bonukleosid eller en 2'-substituerad ribonukleosid, och en
fosforotioat- och/eller -fosforoditioatbindning mellan
nukleotiderna.

2. Hybridoligonukleotid-fosforotioat och/eller
10 -fosforoditioat enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k -
n a t av, att deoxiribonukleosiden förekommer i ett seg-
ment om minst fyra på varandra följande deoxiribonukleosi-
der.

3. Hybridoligonukleotid-fosforotioat och/eller
15 -fosforoditioat enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k -
n a t av, att ribonukleosiden eller den 2'-substituerade
ribonukleosiden förekommer i ett segment om minst två på
varandra följande ribonukleosider eller en 2'-substituerad
ribonukleosider.

20 4. Hybridoligonukleotid-fosforotioat och/eller
-fosforoditioat enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k -
n a t av, att det uppvisar en oligonukleotidsekvens vil-
ken utgör komplement till en nukleinsyresekvens från ett
virus, en patogen organism eller en cellulär gen.

25 5. Hybridoligonukleotid-fosforotioat och/eller
-fosforoditioat enligt patentkrav 2, k ä n n e t e c k -
n a t av, att det uppvisar en oligonukleotidsekvens vil-
ken utgör komplement till en nukleinsyresekvens från ett
virus, en patogen organism eller en cellulär gen.

30 6. Hybridoligonukleotid-fosforotioat och/eller
-fosforoditioat enligt patentkrav 3, k ä n n e t e c k -
n a t av, att det uppvisar en oligonukleotidsekvens vil-
ken utgör komplement till en nukleinsyresekvens från ett
virus, en patogen organism eller en cellulär gen.

7. Terapeutisk, farmaceutisk formulering, k ä n -
n e t e c k n a d av, att den omfattar en oligonukleotid
enligt patentkrav 4 i en farmaceutiskt acceptabel bärsub-
stans.

5 8. Terapeutisk, farmaceutisk formulering, k ä n -
n e t e c k n a d av, att den omfattar en oligonukleotid
enligt patentkrav 5 i en farmaceutiskt acceptabel bärsub-
stans.

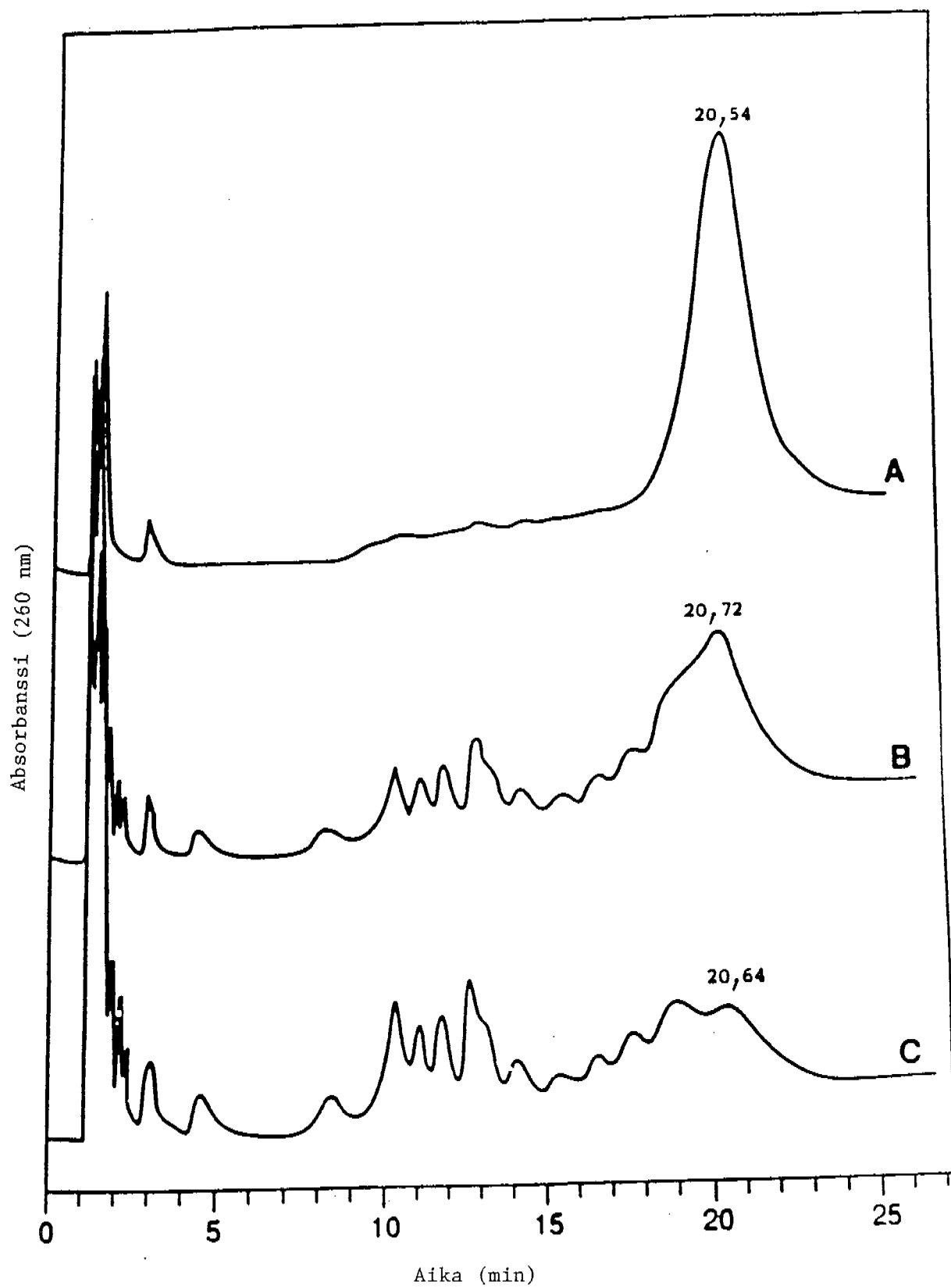
10 9. Terapeutisk, farmaceutisk formulering, k ä n -
n e t e c k n a d av, att den omfattar en oligonukleotid
enligt patentkrav 6 i en farmaceutiskt acceptabel bärsub-
stans.

15 10. Förfarande för att inhibera genexpressionen hos
ett virus, en patogen organism eller en cellulär gen,
k ä n n e t e c k n a t av, att det omfattar ett skede i
vilket en oligonukleotid enligt patentkrav 4 göres till-
gänglig för, i respektive fall, en virusinfekterad cell,
en patogen organism eller en cell.

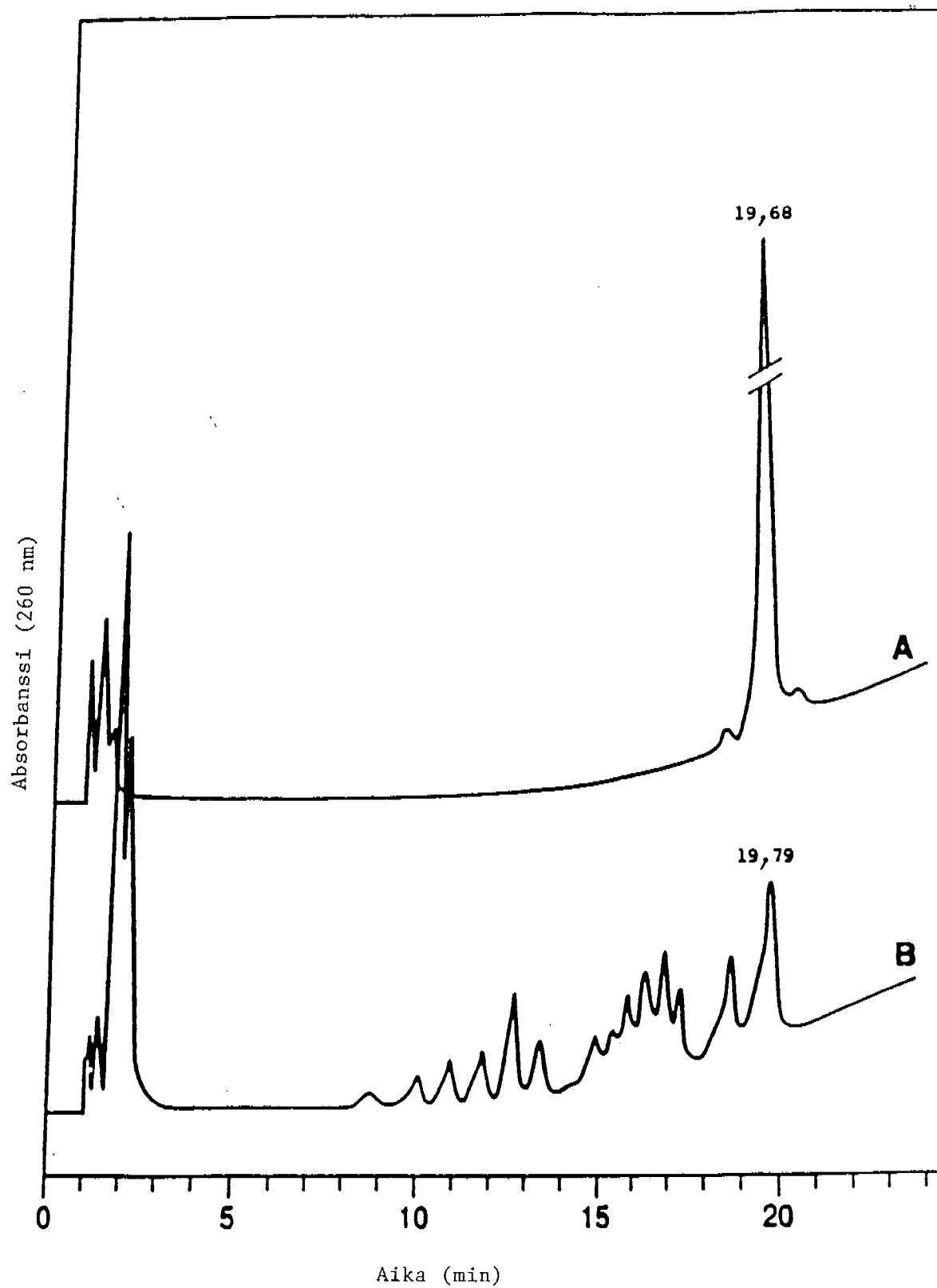
20 11. Förfarande för att inhibera genexpressionen hos
ett virus, en patogen organism eller en cellulär gen,
k ä n n e t e c k n a t av, att det omfattar ett skede i
vilket en oligonukleotid enligt patentkrav 5 göres till-
gänglig för, i respektive fall, en virusinfekterad cell,
en patogen organism eller en cell.

25 12. Förfarande för att inhibera genexpressionen hos
ett virus, en patogen organism eller en cellulär gen,
k ä n n e t e c k n a t av, att det omfattar ett skede i
vilket en oligonukleotid enligt patentkrav 6 göres till-
gänglig för, i respektive fall, en virusinfekterad cell,
30 en patogen organism eller en cell.

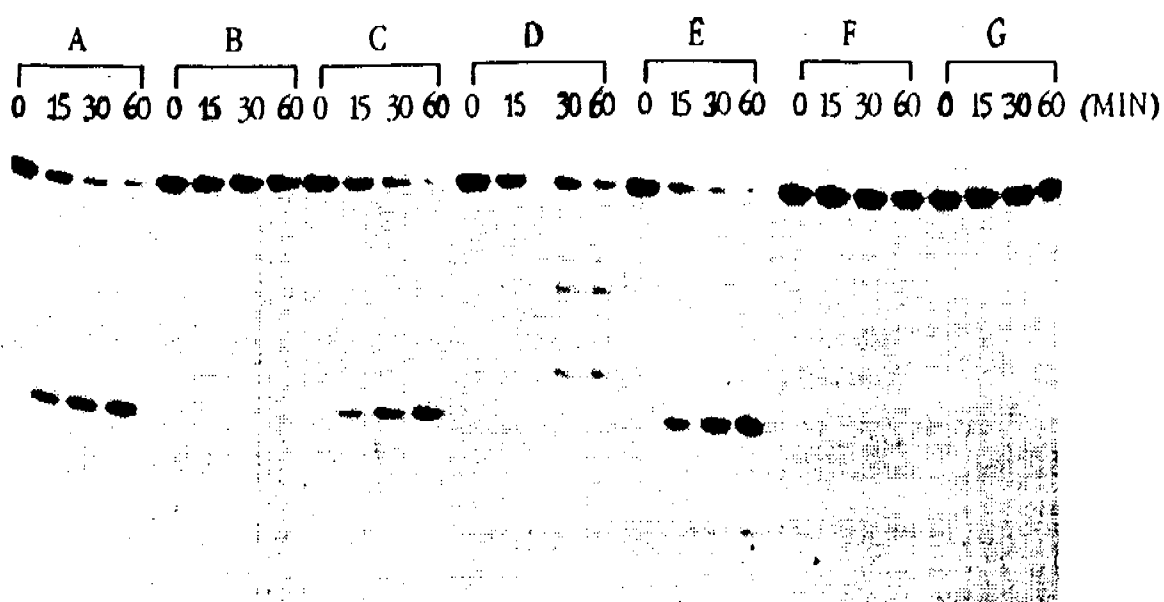
Kuvio 1a



Kuvio 1b



Kuvio 2



	Oligonuk- leotidi	Duplek- si
RNA 3' UACAGCUGUGGGUUAAGACUUUUACCUAUUUG 5' 5' ACACCCAATTCTGAAAATGG 3'	A	1
RNA 3' UACAGCUGUGGGUUAAGACUUUUACCUAUUUG 5' 5' <u>ACACCCA</u> AUUCUGAAAUG 3'	F	2
RNA 3' UACAGCUGUGGGUUAAGACUUUUACCUAUUUG 5' 5' <u>ACA</u> CCCAATTCTGAAA <u>UG</u> 3'	C	3
RNA 3' UACAGCUGUGGGUUAAGACUUUUACCUAUUUG 5' 5' ACACCCAATT <u>CU</u> GAAAUG 3'	B	4
RNA 3' UACAGCUGUGGGUUAAGACUUUUACCUAUUUG 5' 5' A <u>CACCCA</u> U TCTGAAAATGG 3'	E	5
RNA 3' UACAGCUGUGGGUUAAGACUUUUACCUAUUUG 5' 5' ACAGACTTACCTCAGATAAT 3'	Epäyhteen- sopivat	6
RNA 3' UACAGCUGUGGGUUAAGACUUUUACCUAUUUG 5'	—	—
= 2' -OCH ₃ -RIBO -yksiköt		