

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 883162 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **883162**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification (IPC⁵)
C07H 21/02

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **01.07.1988**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **01.07.1988**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **04.01.1989**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

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

03.07.1987 JP 62-167433

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Nippon Shinyaku Co., Ltd., 14 Kisshoin Nishinosho Monguchicho Minami-ku, Kyoto, Japan, JAPANI, (JP)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Yano, Junichi, Japan, JAPANI, (JP)

2 •Ohgi, Tadaaki, Japan, JAPANI, (JP)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Nukleiinihappojohdannaisia.

Nukleinsyraderivat.

Nukleiinihappojohdannaisia

Tämä keksintö koskee nukleiinihappojohdannaisia joilla on lääkkeissä käyttökelpoinen fysiologinen vaikutus ja jotka ovat heikosti myrkyllisiä.

Nukleiinihapot koostuvat puriinirenkaista tai pyrimidiinirenkaista ja riboosista tai vastaavista sokeista sitoutuneina renkaisiin, joissa mainitut elementit ovat kytkeytyneinä toisiinsa fosfaattisillalla ketjura-

10 kenteen muodostamiseksi.

Nukleiinihapoista RNA (ribonukleotidipolymeeri) on ketjurakenteinen makromolekyyliyhdiste jossa on riboosi sokerina, jossa sokeriyksiköt ovat sitoutuneet toisiinsa fosfaattisillalla diesterisidoksen avulla. Kaksoissäkeis-

15 sissä nukleiinihapoissa nukleiinihapon muodostavien emästen (esim. inosiini, adensiini, sytidiini, uridiini jne.) puriinirengas- tai pyrimidiinirengasosat ovat sitoutuneet niin sanotulla komplementaarisella vetysidoksella, jolloin muodostuu kaksoiskierrestereorakenne. Koska rakenteeltaan

20 kaksoissäkeisillä nukleiinihapoilla oletetaan olevan käyttökelpoisia fysiologisia vaikutuksia, on mainituista nukleiinihapoista tähän mennessä suoritettu lukuisia tutkimuksia (Biochemical and Biophysical Research Communications, 58, 1974, jne.).

25 Tällaisista nukleiinihapoista synteettistä kaksoissäikeistä RNA, polyinosiinihappo·polysytidyylihappojohdannaisista kutsutaan tästä lähin "poly-I·poly-C" -johdannaiseksi; ja polyinosiinihappoa, joka on mainitun johdannaisen osa, kutsutaan nimellä "poly-I" ja polysytidyylihappoa nimellä "poly-C".

Viime aikoina on erilaisilla luontaisilla ja synteettisillä kaksoissäikeisillä RNA:illa todettu olevan interferonia indusoiva vaikutus (Field et al, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S., 58, 1 004, 1967; Field et al, Proc.

35 Nat Acad. Sci., U.S., 58, 2 102, 1967; Field et al, Proc. Nat. Acad. Sci, U.S., 61, 340, 1968; Tytell et al, Proc.

Nat. Acad. Sci., U.S., 58, 1 719, 1967, Field et al,
J. Gen. Physiol., 56, 905, 1970; De Clercq et al, Methods
in Enzymology, 78, 291, 1981).

5 Tyypillisiä esimerkkejä tunnetuista synteettisistä
nukleiinihappojohdannaisista on mainittu alla.

Synteettisiä nukleiinihappojohdannaisia interfero-
ni-indusoijaa varten

(I) Homopolymeeri-homopolymeerikompleksit (Kaksois-
säikeiset nukleiinihappopolymeerit joissa on poly-I·poly-C
10 lähtörakenteena):

(1) Emäsmodifioidut johdannaiset:

Polyinosiinihappo·poly(5-bromisytydyylihappo);

Polyinosiinihappo·poly(2-tiosytydyylihappo);

Poly(7-deatsainosiinihappo)·polysytydyylihappo;

15 Poly(7-deatsainosiinihappo)·poly(5-bromisytydyyli-
happo);

(2) Sokerimodifioidut johdannaiset:

Poly(2'-atsidoinosiinihappo)·polysytydyylihappo;

(3) Fosforihappomodifioidut johdannaiset:

20 Polyinosiinihappo·poly(sytidiini-5'-tiofosfori-
happo).

(II) Välimodifioidut kopolymeerit:

Poly(adenyylihappo-uridylihappo).

(III) Homopolymeeri-kopolymeerikompleksit:

25 Polyinosiinihappo·poly(sytydyylihappo, uridyli-
happo);

Polyinosiinihappo·(sytydyylihappo, 4-tiouridyy-
lihappo).

(IV) Synteettiset happo/polykationikompleksit:

30 Polyinosiinihappo·polysytydyylihappo·poly-L-ly-
siini (jota tästä lähin kutsutaan nimellä "poly-ICLC").

(V) Muita:

Polyinosiinihappo·poly(5-vinyylisytydyylihappo).

Kuten yllä mainittiin, viime vuosina on raportoi-
35 tu erilaisia kaksoissäikeisiä RNA:ita, erikoisesti joh-
dannaisia jotka sisältävät poly-I·poly-C runkoon. On

olemassa vakiintunut teoria nukleiinihappojohdannaissarjasta, joka sisältää ne katsoen johdannaisten rakenteen ja niiden funktioiden suhteen (De Clercq et al, Texas Reports on Biology and Medicine, 41, 77, 1982).

5 Erityisesti he sanovat raporteissaan että nukleiinihappojen, joilla on kyky tuottaa interferoneja, on oltava makromolekyyliyhdisteitä joiden sedimentaatiovakio on 4S tai enemmän.

Toisena poly-I·poly-C:n fysiologisena vaikutuksena johdannaisen tiedetään estävän eläimillä siirrettyjen syöpäsolujen lisääntymistä (Levy et al, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S., 62, 357, 1969).

Mainitun vaikutuksen sanotaan myös vaikuttavan bioimmunitettiin aktivoivaan funktioon (Karter et al, J. Immunol. 104, 1 035, 1970).

Niinpä aiemmin odotettiin, että poly-I·poly-C voitaisiin käyttää kliinisesti virustenvastaisen vaikutuksensa ja karsinostaattisen vaikutuksensa ansiosta, mutta on huomattu että johdannainen yllättäen on voimakkaasti myrkyllinen. Niinpä johdannaisen käyttö ihmisiin on ongelma. Poly-I·poly-C:n parantavaa käyttöä kokeillaan kuitenkin nykyään.

Levy et al, kehittivät poly-ICLC:n, jolla on voimakas interferonia tuottava vaikutus (Levy et al, Texas Reports on Biology and Medicine, 41, 653, 1982).

Vaikka yllämainitulla poly-I·poly-C:llä ja sen johdannaisilla voitiin itse asiassa odottaa olevan riittävästi eri hyödyllisiä vaikutuksia, sen myrkyllisyydestä ei useimmissa tapauksissa päästy eroon (De Clercq et al, Infect. Immuni., 6, 344, 1972), ja siksi tarvitaan jokin tapa näiden aineiden käyttämiseen ihmisruumiissa.

Tämän keksinnön keksijät ovat jatkuvasti tutkineet eri nukleiinihappojen toimintoja yllä kuvatun tunnetun tiedon pohjalta pitkän aikaa ja ovat huomanneet että kontrolloimalla kaksoissäikeisten nukleiinihappojohdan-

naisten ketjujen pituuksia, johdannaisten myrkyllisyyttä voidaan suuresti vähentää, vaikka niiden tarpeelliset fysikaaliset vaikutukset voivat säilyä ennallaan, ja ovat siten saaneet aikaan tämän keksinnön.

5 Niinpä tämän keksinnön tyypillinen aspekti on kaksoisketjuisten nukleiinihappopolymeerien ketjujen pituuden rajoittaminen tietylle alueelle.

Tarkemmin tämän keksinnön tarkoitus on tuottaa kaksoisketjuisia nukleiinihappojohdannaisia, joiden perusrunkona on RNA, joissa koko johdannaisten molekyylikokojakauma on sellainen, että niiden sedimentaatiovakion arvo on alueella 4S - 13S.

Vielä tarkemmin tämän keksinnön mukaisesti tuotetaan kaksoisketjuisia nukleiinihappojohdannaisia, joiden 15 perusrunko on RNA, joissa molekyyli- ja joilla on maksimijakauma johdannaisten koko molekyyllipainojakaumasta, on 50 - 10 000 emästä.

Kuvio 1 esittää tämän keksinnön nukleiinihappojohdannaisten HPLC-geelisuodatuksen eluointikuvaa.

20 Tämän keksinnön keksijöitä on aiemmin kiinnostanut se, että poly-I·poly-C kaupallisena tuotteena tai syntesoituna tavanomaisella reaktiolla on toksinen ja he ovat toistuvasti suorittaneet tutkimuksia johdannaisten myrkyllisyyden syyn selvittämiseksi ja ovat sen seurauk- 25 sena saaneet aikaan tämän keksinnön merkittävän vaikutuksen, joka kuvataan yksityiskohtaisesti jäljempänä.

Täsmällisesti tämän keksinnön keksijät tutkivat nukleiinihappopolymeerejä liittyen sekä syöpäsoluja in- hiboivaan vaikutukseen syöpäisissä hiirissä ja hiiren 30 luuydinsoluja vahingoittavaan vaikutukseen indikaattoreina ovat huomanneet seuraavat asiat: Kun nukleiinihappopolymeerien molekyylikokojakauma on yli 13S sedimentaatiovakiona, polymeerit ovat aktiivisia ja myrkyllisiä; kun nukleiinihappopolymeerien molekyyllipainojakauma on 35 4S - 13S sedimentaatiovakiona, polymeerit ovat aktiivisia mutta niiden myrkyllisyys on erittäin vähäinen; ja

kun nukleiinihappopolymeerien molekyylipainojakauma on alle 4S, polymeerit eivät myrkyllisiä eivätkä aktiivisia.

Se tosiasia, että poly-I·poly-C -johdannaiset, joiden sedimentaatiovakio on alle 4S, ovat epäaktiivisia, vastaa melkein yllämainittua Declarkin raporttia, mutta tähän mennessä ei ole ollut olemassa tutkimusta nukleiinihappopolymeerien ketjunpituuden ja myrkyllisyyden suhteesta.

Tämän keksinnön keksijät ovat ensimmäiset jotka ovat huomanneet että poly-I·poly-C:n ja sen johdannaisten molekyylikoon (ketjunpituuden) säätäminen tietylle alueelle on tärkein tekijä polymeerinukleiinihappojen myrkyllisyyden merkittävässä vähentämisessä.

Tämän keksinnön mukaisesti säädettävien nukleiinihappojohdannaisten molekyylipainojakauma on edullisesti alueella 4S - 13S sedimentaatiovakion arvon mukaan (eli noin 50 - 10 000 emästä polymeerijohdannaisessa).

Mainitulla alueella maksimijakauman ketjunpituus sisältää yleensä noin 100 - 600 emästä.

Emäspari (jota tästä lähin kutsutaan "ep":ksi), jota yleensä käytetään yksikkönä kuvattaessa nukleiinihappojen molekyylikokoa, voidaan käyttää esittämään nukleiinihappojen molekyylikokoa nukleiinihapon muodostavien emästen lukumäärän avulla. (Esimerkiksi 10 ep tarkoittaa kaksoisketjuista polymeeria jossa on 10 emästä.) Tässä patenttijulkaisussa kuvataan myös muita nukleiinihappopolymeerejä kuin kaksoisketjuisia polymeerejä nukleiinihappopolymeerien lisäksi ja siksi tässä käytetään termiä "emäsluku (emästen lukumäärä)" "ep":n sijasta nukleiinihappojen molekyylikoon esittämiseen. (Esimerkiksi nukleiinihappopolymeeri jonka "emäsluku on 10" tarkoittaa, että polymeerissä on 10 emästä.

Kun nukleiinihapon molekyylikoko on määritettävä, käytetään laajalti niinsanottua sedimentaatiovakiota (S-arvoa). Tämän keksinnön keksijät saivat kuitenkin yl-

lämainitun nukleiinihappojen emäsluvun korkealaatuisella nestekromatografialla (HPLC) käyttäen geelisuodatuskolonnia tai elektroforeesia (mainittu alla yksityiskohtaisesti) jossa käytetään merkkiaineina kaksoisketjuisia DNA'ita
 5 (M13 fagi-DNA-fragmentteja) joiden molekyylikoot tiedetään ja tutkittavan nukleiinihapon emäsluku lasketaan kontrollin luvun perusteella.

Tähän saakka on makromolekyylisten nukleiinihappojen molekyylipainon esittämiseen käytetty laajalti sedimentaatiovakion arvoa (S-arvoa). Kaupallisesti saatavia makromolekyyllisiä nukleiinihappoja kuvataan S-arvojensa perusteella. Koementelmien viime vuosina tapahtuneen kehityksen vuoksi on kuitenkin kehitetty tapa tarkemmin määrittää makromolekyylisten aineiden molekyylipai-
 15 no käyttäen geelielektroforeesia, geelisuodatuskromatografiaa, ionivaihtokromatografiaa ja vastaavia niin että makromolekyylisten nukleiinihappoaineiden ketjunpituuden määrittäminen on tullut mahdolliseksi. Tässä tilanteessa suhde S-arvon esittämisen ja ketjunpituuden esittämisen
 20 välillä tulisi ongelmalliseksi. Erityisesti koska vastaavilla nukleiinihappomolekyyileillä on sisäiset arvonsa S-arvon mukaisen esityksen tapauksessa, ei aina ole mitään ongelmaa siinä, vastaisivatko S-arvon mukainen esitys ja ketjunpituuden mukainen esitys tarkasti toisiaan nukleiinihappojen molekyylipainon esitystapoina.
 25

Niinpä tämän keksinnön nukleiinihappojen molekyylipainon esitykseen käytetään myös S-arvon mukaista esitystä tämän julkaisun kuvauksessa nukleiinihappokemian alalla tavanomaiseen tapaan. Koska "S-arvo" kuitenkin
 30 saadaan mittaamalla makromolekyylisten nukleiinihappoaineiden molekylipaino molekyyli-massakokonaisuutena (tai aineen molekyyli-tilan muodossa), esitys aineen ketjunpituuden mittauksen mukaan (joka on tässä mainittu "emäsluku") mainitaan tässä myös yhdessä mainitun "S-arvon"
 35 kanssa. Tämä erityisesti siksi, että molekyylipainoja-kauman raja täytyy esittää tarkemmin tämän keksinnön toteutuksessa.

Tämän keksinnön nukleiinihappojohdannaisina voidaan mainita ne jotka saadaan leikkaamalla (lyhytketjutamalla) edellämainittuja synteettisiä nukleiinihappojohdannaisia. Niin leikatuilla johdannaisilla on sama perusrakenne kuin poly-I·poly-C:llä. Tämän keksinnön nukleiinihappojohdannaisille on kuitenkin tyypillistä johdannais-

5 ten molekyylipainojakauman tarkka määrittely.

Tämän keksinnön nukleiinihappojohdannaisina voidaan mainita esimerkiksi seuraavat aineet:

10 Polyinosiinihappo·poly(5-bromisytidyylihappo) jonka S-arvo on 4 - 13, edullisesti ne joiden maksimimolekyylijakauman molekyylin emäsluku on 100 - 600.

Polyinosiinihappo·poly(2-tiosytidyylihappo) jonka S-arvo on 4 - 13, edullisesti ne joiden maksimimolekyylijakauman molekyylin emäsluku on 100 - 600.

15

Poly(7-deatsainosiinihappo)·polysytidyylihappo jonka S-arvo on 4 - 13, edullisesti ne joiden maksimimolekyylijakauman molekyylin emäsluku on 100 - 600.

Poly(7-deatsainosiinihappo)·poly(5-bromisytidyylihappo) jonka S-arvo on 4 - 13, edullisesti ne joiden maksimimolekyylijakauman molekyylin emäsluku on 100 - 600.

20

Poly(2'atsidoinosiinihappo)·polysytidyylihappo jonka S-arvo on 4 - 13, edullisesti ne joiden maksimimolekyylijakauman molekyylin emäsluku on 100 - 600.

25

Polyinosiinihappo·poly(sytidiini-5'-tiofosforihappo) jonka S-arvo on 4 - 13, edullisesti ne joiden maksimimolekyylijakauman molekyylin emäsluku on 100 - 600.

30 Poly(adenyylihappo-uridyylihappo) jonka S-arvo on 4 - 13, edullisesti ne joiden maksimimolekyylijakauman molekyylin emäsluku on 100 - 600.

Polyinosiinihappo·poly(sytidyylihappo, uridyylihappo) jonka S-arvo on 4 - 13, edullisesti ne joiden maksimimolekyylijakauman molekyylin emäsluku on 100 - 600.

35

Polyinosiinihappo·poly(sytidyylihappo, 4-tiouridyylihappo) jonka S-arvo on 4 - 13, edullisesti ne joiden maksimimolekyylijakauman molekyyliden emäsluku on 100 - 600.

5 Polyinosiinihappo·polysytidyylihappo·poly-L-lysiini jonka S-arvo on 4 - 13, edullisesti ne joiden maksimimolekyylijakauman molekyyliden emäsluku on 100 - 600.

Polyinosiinihappo·poly(1-vinyylisytidyylihappo) jonka S-arvo on 4 - 13, edullisesti ne joiden maksimimolekyylijakauman molekyyliden emäsluku on 100 - 600.

Tämän keksinnön nukleiinihappojohdannaisten valmistamiseksi yllämainittujen polymeerien tai edellämainittujen polymeerijohdannaisten (I) - (V) fosfaattisivuketjuosat voidaan irrottaa niin että polymeerit tai polymeerijohdannaiset voidaan jakaa pienimolekyyllisiksi aineiksi.

Polymeerien tai polymeerijohdannaisten leikkaamiseksi voidaan käyttää lämpöhajoamista (mainittu alla yksityiskohtaisesti) samoin kuin emäsrajoitettua hydrolyysiä tai osittaista hydrolyysiä RN-aasilla tai vastaavalla.

Vain tämän keksinnön nukleiinihappojohdannaisten tyyppillisen piirteen, niiden molekyylilikojakauman rajoittuneisuuden tietylle alueelle yllämainitun johdannaisten fosfaattisivuketjuosien leikkaamisen johdosta johdannaisten jakamiseksi pienimolekyyllisiksi yhdisteiksi, voidaan saada aikaan tämän keksinnön vaikutus, johon kuuluu (1) fysiologisen vaikutuksen lisäys ja (2) turvallisuuden lisäys.

30 Tämän keksinnön nukleiinihappojohdannaisten fysiologinen vaikutus on erittäin hyödyllistä lääkkeisiin. Tämän keksinnön nukleiinihappojohdannaisilla on voimakas karsinostaattinen vaikutus, joka mainitaan alla yksityiskohtaisesti. Vaikutus on vain yksi tämän keksinnön nukleiinihappojohdannaisten erilaisista fysiologisista vaikutuksista.

Muina tämän keksinnön nukleiinihappojohdannaisten, joiden perusrunkona on poly-I·poly-C, fysiologisina vaikutuksina voidaan mainita TNF-tuottokyky, interferonin-tuottokyky, interleukiini-2-tuottokyky, makrofagien aktiivointikyky, NK-solujen aktiivointikyky, tuumorisolujen lisääntymistä estävä vaikutus ihmisen tuumorisoluja kantavissa kaljuissa hiirissä, keuhkon tuumorisolujen metastaasin inhibointikyky jne.

Tämän keksinnön nukleiinihappojohdannaisten turvallisuus on erittäin paljon suurempi kuin tavanomaisten poly-I·poly-C- ja vastaavien interferoni-indusoijien. Niinpä tämän keksinnön yhdisteet ovat käyttökelpoisia virustenvastaisina aineina, tuumorienvastaisina aineina jne.

Tämän keksinnön nukleiinihappojohdannaisten käyttämiseksi lääkkeinä johdannaisia voidaan suoraan antaa eläimille, ihminen mukaanlukien, tai vaihtoehtoisesti niitä voidaan lisätä farmaseuttisesti kelvolliseen myrkyttömään ja inerttiin kantajaan, jolloin saadaan lääkevalmiste, joka esimerkiksi sisältää aktiivista ainetta konsentraationa 0,1 % - 99,5 %, edullisesti 0,5 % - 90 %, ja syntyvää lääkevalmistetta voidaan antaa eläimille ihminen mukaanlukien. Kantajana voidaan käyttää yhtä tai useampaa lääketieteellistä apua kuten nestemäistä, kiinteää tai puolikiinteää laimennetta, täyteainetta jne. Lääkevalmiste on edullista antaa annosmuodossa. Tämän keksinnön nukleiinihappojohdannaisia voidaan antaa eri tavoin, esimerkiksi peroraalisesti, antaa kudokseen, antaa paikallisesti tai perrektaalisesti. On selvää että lääkevalmistetta käytetään sellaisessa muodossa joka sopii mainittuihin antotapoihin, esimerkiksi erilaisina peroraalisina valmisteina, injektiona, inhalaattorina, oftalmisena liuoksena, salvana, peräpuikkona jne. Eri-tyisesti antaminen kudokseen ja paikallisesti ovat erityisen edullisia tapoja tämän keksinnön lääkevalmisteen antamiseen.

Toivotaan, että tämän keksinnön lääkevalmisteiden annostus pahanlaatuisten tuumorien hoitoon määritetään asianmukaisesti potilaan kunnon mukaan, esimerkiksi tämän painon ja iän mukaan, samoin kuin antotapa ja taudin oire ja aste. Yleensä tätä valmistetta annetaan aikuisille suunnilleen 0,05 - 1 000 mg/annos tämän keksinnön nukleiinihappojohdannaisen aktiivista aineosaa. Edullisesti käytetään yleensä suonensisäistä tiputusta määrän ollessa 5 - 100 mg mainittua johdannaista. Saattaa myös olla, että yllämainittua alempi arvo on riittävä, tai päinvastoin tarvitaan suurempi määrä kuin yllämainittu. Varsinaisessa käytössä valmistetta voidaan antaa kerran tai useampia kertoja yhden tai useiden päivien välein.

Kun tämän keksinnön lääkevalmistetta käytetään parannettaessa hyvänlaatuisia tuumoreja tai virustauteja, annostusmäärä halutaan myöskin määrittää taudin oireen ja asteen, antotavan ja potilaan kunnon yms. mukaan. Yleensä annos voi olla suunnilleen yksi tai useampia kymmenyksiä yllämainitusta pahanlaatuisten tuumorien hoitoon käytetystä annoksesta.

Tämän keksinnön nukleiinihappojohdannaisia voidaan käyttää yhdessä erilaisten biologisten vastaanmuuntimien (BRM) kanssa ja yhdessä eri karsinostaattien kanssa, jotka mainitaan alla. Yhteiskäytössä voidaan odottaa sekä mainitun lisäaineen että tämän keksinnön nukleiinihappojohdannaisen synergististä vaikutusta sekä viimeksimainitun johdannaisen vahingollisen sivuvaikutuksen vähenemistä.

Esimerkkejä BRM:istä:

Interferonit (α , β , γ);
 Interleukiinit (IL-1, IL-2);
 CSF (pesäkkeitä stimuloiva faktori);
 TNF (tuumorinekroosifaktori);
 Levamisole, Bestatin, Retinahappo, LAK-solut;, jne.

Esimerkkejä karsinostaateista:

5-FU (5-fluoriurasiili);

Ara-C (Sytosiiniarabinosidi);

Ara-A (Adeniiniarabinosidi);

5 Syklofosfamidi;

AZT (Atsidotymiini);

Tämän keksinnön nukleiinihappojohdannaisten fysiologiset vaikutukset mainitaan alla.

Tuumorisolujen lisääntymistä ehkäisevää vaikutusta
10 tutkittiin Meth-A-kantajahiirissä (isologista siirrettyä karsinoomaa kantavissa hiirissä) seuraavalla menetelmällä. Meth-A-soluja suspensoitiin fysiologiseen suolaliuokseen ja syntyvää suspensiota ruiskutettiin subkutaanisesti balb/c hiiriin (5 viikon ikäisiä, uroksia). Kaksi
15 päivää injektion jälkeen tutkittavaa aktiivista ainetta ruiskutettiin hiiriin suonensisäisesti kolme kertaa viikossa 2 viikon ajan. Kaksi päivää viimeisen injektion jälkeen tuumorisoluosa otettiin pois ja sen paino punnittiin. Saadut tulokset on esitetty taulukossa alla.

20 Testiaine (I) poly-I·poly-C, jonka molekyylikokojakauma on yli 13S; testiaine (II) on poly-I·poly-C, jonka molekyylipainojakauma on 4S - 13S (S-arvo = 8); testiaine (III) on poly-I·poly-(C₁₂,U) (nimittäin poly-C-johdannainen jossa sytidyylihapot on korvattu uridyylihapolla
25 la jonka määrä on yksi uridyylihappo 12 sytidyylihappoa kohden), jonka molekyylikokojakauma on yli 13S; testiaine (IV) on poly-I·poly(C₁₂,U), jonka molekyylikokojakauma on 4S - 13S (S-arvo = 9); testiaine (V) on poly-I·poly-(C₂₀,S⁴U) (nimittäin poly-C-johdannainen jossa sytidyylihapot on korvattu 4-tiouridyylihapolla jonka määrä on
30 yksi 4-tiouridyylihappo 20 sytidyylihappoa kohden), jonka molekyylikokojakauma on yli 13 S; ja testiaine (VI) on poly-I·poly(C₂₀, S⁴U), jonka molekyylikokojakauma on yli 4S - 13S (S-arvo = 9).

35 Kontrolliryhmä tarkoittaa, että annettiin vain fysiologista suolaliuosta.

	Testiaine	Annos (µg/hiiri)	Testattujen hiir- ten lukumäärä	Inhibitio %
	Kontrolli	-	10	-
	Testiaine (I)	100	10	83*
5	Testiaine (II)	100	10	63*
	Testiaine (III)	100	10	73*
	Testiaine (IV)	100	10	34*
	Testiaine (V)	100	10	75*
	Testiaine (VI)	100	10	52*

10

(*): $P < 0,01$, merkitsevä ero.

Yllä oleva taulukko osoittaa selvästi, että tämän keksinnön nukleiinihappojohdannaisilla on merkitsevä tuu-
 15 morisolujen kasvua inhiboiva vaikutus karsinoomaisiin hii-
 riin.

Tuumorisolujen metastaasia ehkäisevä vaiku-
 tus keuhkossa

Isologisia transplantaatiokelpoisia melanooma
 20 B16F10 -soluja (2×10^5) implantoitiin C57BL/6 hiiriin
 (uros, ikä 5 viikkoa) niiden suoneen. Kaksi viikkoa im-
 plantaation jälkeen tuumoritransplanttinodien lukumäärä
 (pesäkkeiden lukumäärä) laskettiin. Testiainetta annet-
 tiin suonensisäisesti eläimille 24 tuntia ennen B16F10-
 25 melanoomasolujen transplantaatiota niiden suoneen. Koe-
 eläinten lukumäärä oli 9. Saadut tulokset esitetään tau-
 lukossa alla. Testiaine (I), testiaine (II) ja kontrolli
 ovat samat kuin yllämainitut.

Testiaine	Annos ($\mu\text{g}/\text{hiiri}$)	Pesäkkeiden lukumäärä	Inhibitio %
Kontrolli	-	85 $\pm$ 5	-
Testiaine (I)	5	25 $\pm$ 8*	71*
5 Testiaine (II)	50	11 $\pm$ 3*	87*
Testiaine (III)	500	1 $\pm$ 1*	99*
Testiaine (IV)	5	58 $\pm$ 8*	33*
Testiaine (V)	50	25 $\pm$ 7*	72*
Testiaine (VI)	500	13 $\pm$ 2*	84*

10

(*): $P < 0,01$, merkitsevä ero.

Yllä oleva taulukko osoittaa selvästi, että tämän keksinnön nukleiinihappojohdannaisilla on merkitsevä tuu-
15 morisolujen metastaasia keuhkoon inhiboiva vaikutus hiirissä.

Keksinnön nukleiinihappojohdannaisten turvallisuus mainitaan alla.

Sytotoksisuus hiiren luuydinsoluille

20 Tämän keksinnön nukleiinihappojohdannaiset tutkittiin myrkyllisyyden suhteen hiiren luuydinsoluille. Testiaine (I), testiaine (II), testiaine (III), testiaine (IV), testiaine (V) ja testiaine (VI) ovat samat kuin yllämainitut. Kontrolliryhmälle annettiin vain fysiolo-
25 gista suolaliuosta.

Kutakin testiainetta ruiskutettiin suonensisäisesti Balb/c-hiirin (ikä 8 viikkoa, uros) 0,5 mg/kg. Kukaan testiryhmään kuului viisi hiirtä. 24 tuntia ruiskeen jälkeen luuydinsolut poistettiin kustakin hiirestä. Solut kiinnitettiin ja värjättiin giemsavärjäyksellä. Pyyhkäisyn soluja tutkittiin mikroskoopilla ja variaatioprosentti laskettiin muodostuneiden retikulosyyttien määrän perusteella seuraavan kaavan mukaan.

35 vaihteluprosentti (%) =
$$\frac{(\text{Kontrolli}) - (\text{Testiryhmä})}{(\text{Testiryhmä})} \times 100$$

Saadut tulokset esitettiin alla olevassa taulukossa.

		<u>vaihteluprosentti (%)</u>
	Testiaine (I)	61
5	Testiaine (II)	0
	Testiaine (III)	59
	Testiaine (IV)	0
	Testiaine (V)	30
	Testiaine (VI)	0

10

Yllä oleva taulukko osoittaa selvästi, että tämän keksinnön nukleiinihappojohdannaisten ovat erittäin turvallisia.

Akuutti toksisuustesti suoritettiin käyttäen
15 balb/c hiiriä. Testiaine annettiin hiirille suonensisäisesti kerran ja LD₅₀ laskettiin kuolleiden hiirien määrästä yhden viikon jälkeen. Saadut tulokset esitettiin taulukossa alla.

			LD ₅₀	
20	<u>Koe-eläin</u>	<u>Antotapa</u>	<u>Testiaine (I)</u>	<u>Testiaine (II)</u>
	balb/c			
	hiiret	i.v.	35 mg/kg	> 150 mg/kg

Kuten yllä olevasta taulukosta selvästi näkyy, testiaine (II):n myrkyllisyys on paljon alempi kuin testiaineen (I). Tästä ilmenee että myrkyllisyys on läheisesti yhteydessä nukleiinihappojohdannaisten ketjunpituuteen.

Seuraavat esimerkit on tarkoitettu kuvaamaan tämän keksinnön nukleiinihappojohdannaisten valmistusta yksityiskohtaisemmin, mutta ei rajoittamaan tämän keksinnön laajuutta.

Esimerkki

(1) Kaksoisketjuisten nukleiinihappojohdannaisten valmistus

35 Yhtä suuret moolimäärät kaupallista poly-C:tä (jonka S-arvo on 6 - 12) ja poly-I:tä (jonka S-arvo on

6 - 12) ja poly-I:tä (jonka S-arvo on 6 - 12) liuotettiin 50 mM NaCl sisältävään Tris-puskuriin, jolloin saatiin liuos jossa konsentraatio oli 10 - 20 mg/ml. Tämä kuumennettiin vähitellen vesihauteessa huoneenlämmöstä 5 68 °C:seen. Kun sitä oli pidetty 68 °C:ssa noin 10 minuuttia sen annettiin jäähtyä huoneenlämpöön. Sitten se varastoitiin 4 °C:ssa.

Siten valmistettu liuos pakastekuivattiin, jolloin saatiin 1,2 g valkoista kiinteää nukleiinihappojohdannaista. 10

Tämä on yllämainittu testiaine (I), (jonka S-arvo on 13 - 24).

Samaan tapaan kuin yllä, paitsi että poly-C:n sijasta käytettiin poly(C₁₂, U), saatiin poly-I·poly(C₁₂, U) 15 (testiaine (III), jonka S-arvo on 13 - 24). Myöskin samaan tapaan kuin yllä, paitsi että poly-C:n sijasta käytettiin poly(C₂₀, S⁴U), saatiin poly-I·poly(C₂₀, S⁴U) (testiaine (V), jonka S-arvo on 13 - 24).

Koska yllämainittu menetelmä on yleinen, kaikki 20 yllämainitut nukleiinihapot voitaisiin myös valmistaa samoin kuin poly-I·poly-C.

(2) Nukleiinihappojohdannaisten muuttaminen pienimolekyyllisiksi yhdisteiksi

1 g yllämainitussa vaiheessa (1) saatua testiainet- 25 ta (I) liuotettiin 120 g:aan vettä ja siihen lisättiin 30 ml liuosta jossa oli 5M NaCl ja 150 ml formaldehydiä. Syntyvää seosta sekoitettiin voimakkaasti, jolloin saatiin homogeeninen liuos. Kun reaktioliuosta oli kumennettu 80 °C:ssa 8 tuntia, se dialysoitiin täysin vettä vasten ja pakastekuivattiin jolloin saatiin 0,95 g valkoista kiinteää ainetta. 30

Tämä on testiaine (II) (jonka S-arvo on 8).

1 g yllämainitussa vaiheessa (1) saatua testiainet- ta (III) liuotettiin 120 g:aan vettä ja siihen lisättiin 35 30 ml liuosta jossa oli 5M NaCl ja 150 ml formaldehydiä. Sytyvää seosta sekoitettiin voimakkaasti, jolloin saatiin

homogeeninen liuos. Kun reaktioliuosta oli kuumennettu 60 °C:ssa 12 tuntia, se dialysoitiin täysin vettä vasten ja pakastekuivattiin jolloin saatiin 0,95 g valkoista kiinteää ainetta.

5 Tämä on testiaine (IV) (jonka S-arvo on 9).

1 g yllämainitussa vaiheessa (1) saatua testiainetta (V) liuotettiin 120 g:aan vettä ja siihen lisättiin 20 ml liuosta jossa oli 5M NaCl ja 150 ml formaldehydiä. Syntyvää seosta sekoitettiin voimakkaasti, jolloin saatiin homogeeninen liuos. Kun reaktioliuosta oli kuumennettu 80 °C:ssa 8 tuntia, se dialysoitiin täysin vettä vasten ja pakastekuivattiin jolloin saatiin 0,95 g valkoista kiinteää ainetta.

Tämä on testiaine (VI) (jonka S-arvo on 9).

15 Kuvio 1 esittää geelisuodatuksena tehdyn korkealuokkaisen nestekromatografiaeluointikuvion vastaavista testiaineista, joissa ordinaatta kuvaa absorbanssia 260 nm ja abskissa kuvaa pidätysaikaa (min) ja vastaavaa bp:tä. (1) on testiaine (I), (2) on testiaine (III), (3) on testiaine (IV), (4) on testiaine (II), (5) on testiaine (V) ja (6) on testiaine (VI).

HPLC-olosuhteet olivat seuraavat: käytettiin TSK-geeli G-DNA-PW -geelisuodatuskolonnia. Eluointi saatiin aikaan 1 mM EDTA:lla ja 0,3 M NaCl -liuosta sisältävällä Tris-HCl-puskurilla (pH 7,5). Eluointinopeus oli 0,2 ml/min. ja eluointiaika kuvattiin vastaavan eluointikuvion yläpuolella (abskissa). Ultraviolettia absorboivaa aallonpituutta 260 nm käytettiin havaitsemiseen ja absorbanssi täydellä skaalalla 0,04 OD/ml esitettiin kuvion ordinaatta-akselilla.

Numerot abskissan (bp) alapuolella tarkoittavat DNA:n emästen lukumäärää.

Merkkeinä käytettiin hydrolysoituja fragmentteja M13 fagi RF-DNA:sta hydrolysoituina restriktioentsyymeillä.

Eluointikuviot testiaineelle (I) ((1) piirroksessa), testiaineelle (III) ((2) piirroksessa) ja testiaineelle (V) ((5) piirroksessa) muistuttavat selvästi toisiaan ja niissä eluointikuvion käyrät ilmestyvät 34 minuuttia näytteen lisäyksen jälkeen kaikissa tapauksissa. Huippu osoittaa tyhjää aluetta alueella, josta huomataan että melkein kaikkien testiaineiden komponenttien emäsluku on 6 000 tai enemmän.

Lisäksi huomataan että pineimolekyylisten testiaineiden, testiaineen (II) ((4) piirroksessa), testiaineen (IV) ((3) piirroksessa) ja testiaineen (VI) ((6) piirroksessa) molekyylikojakauma (huippu) oli lähellä 150 (emäsluku) ja 600 (emäsluku) näille pienimolekyyli-

15 Jos molekyylikokoa kuvataan "emäsluvulla", "emäsluvun" yksikkö voi olla sama kuin "bp":n kuviossa 1.

Esimerkiksi poly-I·poly-C valmistettiin leikattavaksi pienimolekyylliseksi rakennusaineikseen, minkä jälkeen reaktioaikaa ja reaktiolämpöä jatkuvasti muutettiin. Syntyvät prosessista saadut pienimolekyylliset aineet määritettiin alla maksimimolekyylikojakauman (emäsluku) ja molekyylikojakauman (emäsluku) suhteen.

25	Reaktiolämpö	Reaktio-	Maksimimolekyyli-	Molekyyli-
		aika	jakauma (emäsluku)	jakauma (emäsluku)
	-	0 tuntia	-	>10 000
	80 °C	24 tuntia	30	10-55
	80 °C	16 tuntia	100	50-800
30	60 °C	8 tuntia	1000	200-6000
	60 °C	12 tuntia	600	50-5000

Yllä olevassa esimerkissä kaksisäikeistä RNA:ta valmistettiin leikattavaksi pienimolekyylliseksi aineiksi. Analogisesti yksisäikeistä RNA:ta voidaan käsitellä juuri samoin.

Vaikka keksintöä on kuvattu yksityiskohtaisesti ja viitaten sen spesifisiin toteutustapoihin, on selvää alaa taitaville, että erilaisia muutoksia ja muunnelmia voidaan tehdä siihen poikkeamatta sen hengestä ja piiristä.

Patenttivaatimukset:

1. Kaksoissäikeiset nukleiinihappojohdannaiset, joiden perusrakenteena on RNA, t u n n e t t u siitä, 5 että johdannaisten kokonaismolekyyli-painojakauma on alueella 4S - 13S ilmaistuna niiden sedimentaatiovakion arvona.

2. Kaksoissäikeiset nukleiinihappojohdannaiset, joiden perusrakenteena on RNA, t u n n e t t u siitä, 10 että johdannaisten molekyylien maksimijakaumaa varten kokonaismolekyyli-painojakaumassa emäsluku on alueella 50 - 10 000.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukaiset nukleiinihappojohdannaiset, t u n n e t t u siitä, että ne on 15 valittu joukosta, johon kuuluvat polyinosiinihappo·poly(5-bromisytidyylihappo) jonka S-arvo on 4 - 13, edullisesti ne joiden molekyyli-ssä maksimimolekyylijakauma varten on emäsluku 100 - 600; polyinosiinihappo·poly(2-tiosytidyylihappo) jonka S-arvo on 4 - 13, edullisesti 20 ne joiden molekyyli-ssä maksimimolekyylijakauma varten on emäsluku 100 - 600; poly(7-deatsainosiinihappo)·poly-sytidyylihappo jonka S-arvo on 4 - 13, edullisesti ne joiden molekyyli-ssä maksimimolekyylijakauma varten on emäsluku 100 - 600; poly(7-deatsainosiinihappo)·poly(5- 25 bromisytidyylihappo) jonka S-arvo on 4 - 13, edullisesti ne joiden molekyyli-ssä maksimimolekyylijakauma varten on emäsluku 100 - 600; poly(2'-atsidoinosiinihappo)·poly-sytidyylihappo jonka S-arvo on 4 - 13, edullisesti ne joiden molekyyli-ssä maksimimolekyylijakauma varten on 30 emäsluku 100 - 600; polyinosiinihappo·poly(sytidiini-5'-tiofosforihappo) jonka S-arvo on 4 - 13, edullisesti ne joiden molekyyli-ssä maksimimolekyylijakauma varten on emäsluku 100 - 600; polyinosiinihappo·poly(sytidyyli- 35 happo, uridyylihappo) jonka S-arvo on 4 - 13, edullisesti ne joiden molekyyli-ssä maksimimolekyylijakauma varten on emäsluku 100 - 600; polyinosiinihappo·poly(sytidyyli-

happo, 4-tiouridyylihappo) jonka S-arvo on 4 - 13, edullisesti ne joiden molekyyliissä maksimimolekyylijakauma varten on emäsluku 100 - 600; polyinosiinihappo·polysytidyylihappo·poly-L-lysiini jonka S-arvo on 4 - 13, edullisesti ne joiden molekyyliissä maksimimolekyylijakauma varten on emäsluku 100 - 600; polyinosiinihappo·poly(1-vinyylisytidyylihappo) jonka S-arvo on 4 - 13, edullisesti ne joiden molekyyliissä maksimimolekyylijakauma varten on emäsluku 100 - 600.

10 4. Tuuromien vastainen valmiste, t u n n e t t u siitä, että se sisältää aktiivisena aineena minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 3 mukaista kaksoissäikeistä nukleiinihappojohdannaista.

15 5. Virusten vastainen valmiste, t u n n e t t u siitä, että se sisältää aktiivisena aineena minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 3 mukaista kaksoissäikeistä nukleiinihappojohdannaista.

20 6. Patenttivaatimuksen 4 mukainen tuumorien vastainen valmiste, t u n n e t t u siitä, että se lisäksi sisältää yhtä tai useampaa biologista vasteenmuunninta ja/tai karsinostaattia.

25 7. Patenttivaatimuksen 5 mukainen virusten vastainen valmiste, t u n n e t t u siitä, että se lisäksi sisältää yhtä tai useampaa biologista vasteenmuunninta ja/tai karsinostaattia.

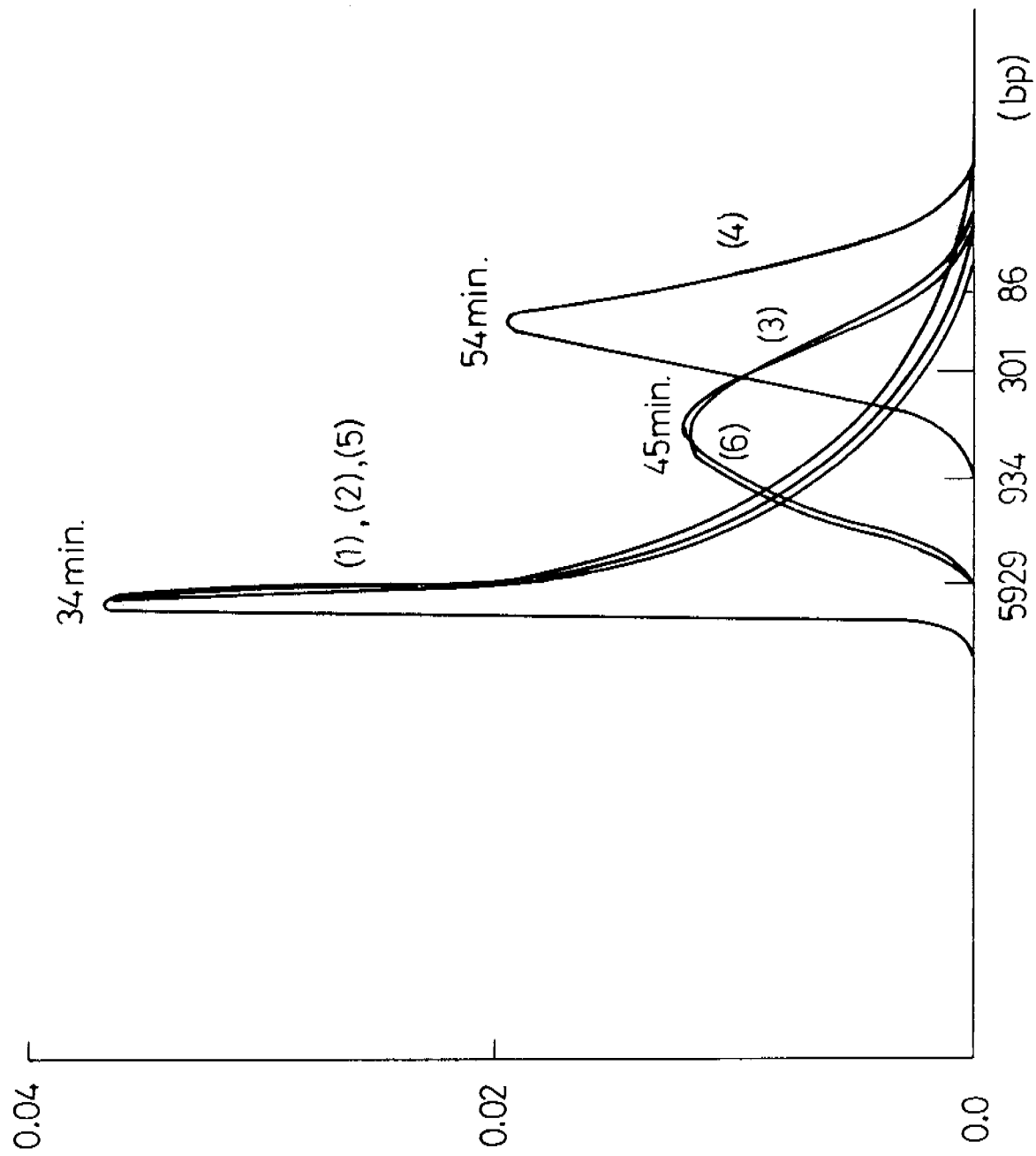


fig.1