



⑫ A **Terinzagelegging** ⑪ **8801663**

Nederland

⑲ NL

- ⑤4 **Nucleinezuurderivaten alsmede anti-tumor en antivirale preparaten die deze derivaten bevatten.**
- ⑤1 Int.Cl⁴: A61K 31/70, C07H 21/00.
- ⑦1 Aanvrager: Nippon Shinyaku Co., Ltd. te Kyoto, Japan.
- ⑦4 Gem.: Drs. A. Kupecz c.s.
Octrooibureau Los en Stigter B.V.
Postbus 20052
1000 HB Amsterdam.

-
- ②1 Aanvraag Nr. 8801663.
- ②2 Ingediend 30 juni 1988.
- ③2 Voorrang vanaf 3 juli 1987.
- ③3 Land van voorrang: Japan (JP).
- ③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: 167433/87 .
- ⑥2 - -

-
- ④3 Ter inzage gelegd 1 februari 1989.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Nucleïnezuurderivaten alsmede anti-tumor- en antivirale preparaten die deze derivaten bevatten

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op nucleïnezuurderivaten die een fysiologische activiteit vertonen welke geschikt is voor medicijnen, en welke derivaten weinig toxisch zijn.

- 5 Nucleïnezuren zijn samengesteld uit purineringen of pyrimidineringen en aan de ringen gebonden ribose of soortgelijke suikers, waarbij deze samenstellende bestanddelen met elkaar zijn verbonden via een fosfaatbrug onder vorming van een ketenstructuur.
- 10 Onder de nucleïnezuren is RNA (ribonucleotide-polymer) een macromoleculaire verbinding met een ketenstructuur die ribose als een suiker bevat, waarin de suikereenheden met elkaar zijn verbonden via een fosfaatbrug door middel van de diesterbinding. In de dubbelstrengs nucleïnezuren zijn de
15 purinering- of pyrimidineringeenheden van het nucleïnezuur, welke de basen vormen (bijvoorbeeld inosine, adenosine, cytidine, uridine enz.) gebonden door middel van een zogenaamde complementaire waterstofbinding onder oplevering van een dubbele helix ruimtestructuur. Daar nucleïnezuren met
20 een dubbelstrengs structuur geacht worden bruikbare fysiologische functies te hebben, zijn tot op heden talrijke studies uitgevoerd met betrekking tot de nucleïnezuren (Biochemical and Biophysical Research Communications, 58, 1974, enz.).
- 25 Onder de nucleïnezuren van deze soort, wordt een synthetisch dubbelstrengs RNA polyinosinylzuur.polycytidylzuur-derivaat hierna aangeduid als "poly-I.poly-C"-derivaat; terwijl het polyinosinylzuur, dat een samenstellende eenheid is van dit derivaat, wordt aangeduid als "poly-I" en het polycytidylzuur als "poly-C".
- 30 Recentelijk is van verscheidene natuurlijke en synthetische dubbelstrengs RNA's bekend geworden dat ze een interferoninducerend vermogen hebben (Field et al, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S., 58, 1004, 1967; Field et al, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S., 58, 2102, 1967; Field et al, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S., 61, 340, 1968; Tytell et al, Proc. Nat.

Acad. Sci., U.S., 58, 1719, 1967; Field et al, J. Gen. Physiol., 56, 905, 1970; De Clercq et al, Methods in Enzymology, 78, 291, 1981).

Typische voorbeelden van bekende synthetische
5 nucleïnezuurderivaten zijn hieronder vermeld.

Synthetische nucleïnezuurderivaten voor interferon-inducer

- (I) Homopolymeer.homopolymeer-complexen (dubbelstrengs
nucleïnezuurpolymeren met poly-I.poly-C als de
basisstructuur)
- 10 (1) base-gemodificeerde derivaten:
polyinosinylzuur.poly(5-broomcytidylzuur);
polyinosinylzuur.poly(2-thiocytidylzuur);
poly(7-deazainosinylzuur).polycytidylzuur;
poly(7-deazainosinylzuur).poly(5-broomcytidylzuur).
- 15 (2) suiker-gemodificeerde derivaten:
poly(2'-azidoinosinylzuur).polycytidylzuur.
(3) fosforzuur-gemodificeerde derivaten:
polyinosinylzuur.poly(cytidine-5'-thiofosforzuur).
- (II) Intergemodificeerde copolymeren:
20 poly(adenylzuur-uridylzuur).
- (III) Homopolymeer.copolymeer-complexen
polyinosinylzuur.poly(cytidylzuur, uridylzuur);
polyinosinylzuur.poly(cytidylzuur, 4-thiouridylzuur).
- (IV) Synthetische zuur/polykation-complexen:
25 polyinosinylzuur.polycytidylzuur.poly-L-lysine
(hierna aangeduid als "poly-ICLC").
- (V) Andere:
polyinosinylzuur.poly(1-vinylcytidylzuur).

Zoals hierboven vermeld zijn in de laatste jaren
30 diverse soorten van dubbelstrengs RNA, in het bijzonder
derivaten die poly-I.poly-C als ouderlichaam hebben, gerap-
porteerd. Er bestaat een gevestigde theorie betreffende een
reeks van nucleïnezuurderivaten, waaronder deze, ten aanzien
van de relatie tussen de structuur van de derivaten en de
35 functies ervan (De Clercq et al, Texas Reports on Biology and
Medicine, 41, 77, 1982).

In het bijzonder vermelden zij in hun rapporten dat
nucleïnezuurpolymeren welke een vermogen tot het produceren
van interferonen hebben, macromoleculaire stoffen moeten zijn

met een sedimentatie constante-waarde van 4S of meer.

Het is bekend dat het poly-I.poly-C-derivaat ook een andere fysiologische werking heeft, te weten een werking bestaande uit het remmen van de verspreiding van dierlijk
5 getransplanteerde kankercellen (Levy et al, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S., 62, 357, 1969).

Deze activiteit wordt geacht tevens bij te dragen tot een bioimmunitets-activerende functie (Karter et al, J. Immunol. 104, 1035, 1970).

10 Aldus werd poly-I.poly-C geacht in staat te zijn om te worden aangewend voor klinisch gebruik vanwege zijn anti-virale werkzaamheid en de carcinostatische werkzaamheid in vroegere dagen, doch het bleek, dat op onverwachte wijze het derivaat een sterke toxiciteit heeft. Dienovereenkomstig
15 bestaat er een probleem bij het gebruik van het derivaat voor toediening aan mensen. De genezende werking van het poly-I.-poly-C-derivaat wordt echter heden nog uitgeprobeerd.

Levy et al ontwikkelden poly-ICLC met een sterke interferon-producerende activiteit (Levy et al, Texas Reports
20 on Biology and Medicine, 41, 653, 1982).

Ofschoon van het bovengenoemde poly-I.poly-C en zijn derivaten in feite kon worden verwacht dat ze verscheidene bruikbare werkingen vertoonden, kon de toxiciteit daarvan niet worden vermeden in de meeste gevallen (De Clercq et al, Infect.
25 Immuni., 6, 344, 1972), en derhalve zijn bepaalde middelen nodig voor de toepassing van deze stoffen op menselijke lichamen.

De onderhavige uitvinders hebben voortdurend de functies van diverse nucleïnezuren bestudeerd op basis van de
30 bovengenoemde stand van de techniek gedurende een lange tijdsperiode en hebben gevonden, dat door regeling van de lengte van de ketens van dubbelstrengs nucleïnezuurderivaten de toxiciteit van de derivaten zeer kan worden verlaagd, terwijl de noodzakelijke fysiologische activiteiten ervan onverlet
35 kunnen blijven, hetgeen de onderhavige uitvinding tot stand bracht.

Dientengevolge is het kenmerkende aspect van de onderhavige uitvinding gelegen in de beperking van de lengte

van de ketens van dubbelstrengs nucleïnezuurpolymeren tot een bepaald traject.

In het bijzonder is het onderwerp van de onderhavige uitvinding het verschaffen van dubbelstrengs nucleïnezuurderivaten welke RNA als het ouderlichaam hebben, met het kenmerk, dat de totale moleculaire grootteverdeling van de derivaten ligt binnen het traject van 4S tot 13S, uitgedrukt als de waarde van de sedimentatieconstante ervan.

Meer in het bijzonder worden volgens de onderhavige uitvinding dubbelstrengs nucleïnezuurderivaten met RNA als het ouderlichaam verschaft, met het kenmerk, dat de moleculen voor de maximale verdeling in de totale moleculaire grootteverdeling van de derivaten het aantal basen hebben dat ligt binnen het traject van 50 tot 10.000.

In figuur 1 is een elutiepatroon van HPLC-gelfiltratie van de nucleïnezuurderivaten volgens de onderhavige uitvinding weergegeven.

De onderhavige uitvinders hadden eerder interesse in het feit dat de poly-I.poly-C als een commercieel produkt of zoals gesynthetiseerd door een conventionele reactie, toxisch is en hebben herhaaldelijk studies uitgevoerd om de reden van de toxiciteit van de derivaten op te helderen. Het gevolg daarvan was, dat een significant effect werd gevonden en dienovereenkomstig werden octrooiaanvragen ingediend bij de Japanse Octrooiraad (Japanse octrooiaanvraag nr. 61-001076 en een andere Japanse octrooiaanvraag welke voorrang heeft ingeroepen van deze aanvraag nr. 61-001076) welke betrekking hebben op nucleïnezuurderivaten met een structuur van hogere orde. Daarna werd verder gestudeerd op de materie en thans is een ander nieuw feit gevonden hetgeen de onderhavige uitvinding vormt welke hierna in detail zal worden beschreven.

De onderhavige uitvinders hebben nucleïnezuurpolymeren onderzocht met betrekking tot zowel de kankercel-remmende werking in kanker-dragende muizen als ook de functie van beschadiging van mergstamcellen van muizen als indices en hebben het volgende vastgesteld: wanneer nucleïnezuurpolymeren een moleculaire grootteverdeling hebben welke meer is dan 13S, uitgedrukt als sedimentatieconstante, zijn de polymeren actief

en toxisch; wanneer nucleïnezuurpolymeren een moleculaire
grootteverdeling hebben die ligt tussen 4S en 13S, uitgedrukt
als sedimentatieconstante, zijn de polymeren actief, doch is de
toxiciteit ervan buitengewoon laag; en wanneer nucleïnezuur-
5 polymeren een moleculaire grootteverdeling hebben die kleiner
is dan 4S, zijn de polymeren noch toxisch noch actief.

Het feit dat de poly-I.poly-C-derivaten met een
sedimentatieconstante van minder dan 4S inactief zijn,
correspondeert bijna met het rapport van Declark zoals boven
10 vermeld, doch er bestaat geen aanwijzing omtrent een studie
over de nucleïnezuurpolymeren met betrekking tot de relatie
tussen de ketenlengte ervan en de toxiciteit ervan tot op
heden.

De onderhavige uitvinders waren de eerste die
15 gevonden hebben dat een regeling van de moleculaire grootte
(ketenlengte) van poly-I.poly-C en derivaten daarvan ten einde
te vallen binnen een vooraf bepaald traject, de meest belang-
ruike factor is voor een opmerkelijke vermindering van de
toxiciteit van de nucleïnezuurpolymeren.

20 Volgens de onderhavige uitvinding ligt de te regelen
moleculaire grootteverdeling van de nucleïnezuurderivaten bij
voorkeur binnen het traject van 4S tot 13S, uitgedrukt als
waarde van de sedimentatieconstante (dat wil zeggen, binnen
het traject van 50 tot 10.000 of daaromtrent, uitgedrukt als
25 het aantal basen van het polymere derivaat).

In dit traject omvat de ketenlengte in de maximum
verdeling in het algemeen 100 tot 600 basen of dergelijke.

Het begrip basepaar (hierna aangeduid als "bp"), dat
gewoonlijk wordt gebruikt als de eenheid voor het weergeven
30 van de moleculaire grootte van nucleïnezuren, kan worden
gebruikt voor het weergeven van de moleculaire grootte van
nucleïnezuren door middel van het aantal basen waaruit het
nucleïnezuur bestaat. (Bijvoorbeeld, 10 bp betekent een dubbel-
strengs polymeer dat 10 basen heeft.) In de onderhavige
35 beschrijving wordt tevens ook naar andere nucleïnezuurpoly-
meren verwezen dan naar dubbelstrengs nucleïnezuurpolymeren en
derhalve wordt de term "basegetal" (aantal basen) hierin
gebruikt ter vervanging van "bp" ten einde de moleculaire

grootte van nucleïnezuren weer te geven. (Bijvoorbeeld, een nucleïnezuurpolymeer met een "basegetal van 10" betekent dat het polymeer 10 basen heeft).

Wanneer de moleculaire grootte van een nucleïnezuur
5 wordt bepaald of geïdentificeerd, is hiervoor de waarde van de
zogenaamde sedimentatieconstante (S-waarde) algemeen
gebruikelijk. De onderhavige uitvinders konden het
bovengenoemde basegetal van nucleïnezuren echter verkrijgen
met behulp van high performance liquid chromatography (HPLC)
10 onder gebruikmaking van een gelfiltratiekolom of elektroforese
(hieronder in detail besproken), waarin dubbelstrengs DNA's
(M13 faag-DNA-fragmenten) met bekende moleculaire groottes
worden gebruikt als een merker en het basegetal van het te
bepalen nucleïnezuur wordt berekend op basis van het getal van
15 de controle.

Tot op heden werd de waarde van de sedimentatiecon-
stante (S-waarde) alom gebruikt voor het uitdrukken van het
moleculaire gewicht van macromoleculaire nucleïnezuursubstan-
ties. Macromoleculaire nucleïnezuursubstanties welke commer-
20 cieel verkrijgbaar zijn, worden aangeduid aan de hand van de
S-waarde ervan. Vanwege de voortgang van experimentele tech-
nieken in de laatste jaren, is echter een middel voor het meer
nauwkeurig vaststellen van het moleculaire gewicht van macro-
moleculaire stoffen tot stand gekomen, namelijk door gebruik
25 van gelelectroforese, gelfiltratie-chromatografie, ionuitwis-
selingschromatografie of dergelijke, zodat de bepaling van de
ketenlengte van macromoleculaire nucleïnezuursubstanties
mogelijk is geworden. Onder de omstandigheid zou de relatie
tussen de aanduiding met de S-waarde en de aanduiding
30 met de ketenlengte problematisch worden. Vooral wanneer de
betreffende nucleïnezuurmoleculen hun intrinsieke waarden in
het geval van de aanduiding met de S-waarde hebben, bestaat er
niet altijd een probleem betreffende het punt dat de aandui-
ding met de S-waarde en de aanduiding met de ketenlengte
35 nauwkeurig met elkaar overeenkomen met betrekking tot het
weergeven van het moleculaire gewicht van de nucleïnezuren.

Dienovereenkomstig is voor het weergeven van het

moleculaire gewicht van de nucleïnezuurpolymeren volgens de onderhavige uitvinding de S-waarde ook gebruikt in de beschrijving van de onderhavige aanvraag in overeenstemming met de conventionele manier in het gebied van de nucleïnezuur-
5 chemie. Aangezien de "S-waarde" een waarde is die verkregen is door middel van een methode voor het meten van het molecuulgewicht van macromoleculaire nucleïnezuursubstanties in de vorm van een moleculaire massa als een geheel (of in de vorm van een moleculaire toestand van de stof), is de aanduiding op
10 basis van de meting van de ketenlengte van de stof (welke hierin wordt aangeduid als "basegetal") eveneens hierin genoemd te zamen met de "S-waarde". Dit is vooral zo, omdat de grens in de molecuulgewichtsverdeling meer exact moet worden voorgesteld in de uitvoering van de onderhavige uitvinding.

15 Als nucleïnezuurderivaten van de onderhavige uitvinding kunnen worden genoemd die, welke verkregen zijn door het op-geschikte-grootte-brengen (ketenverkorting) van de voornoemde synthetische nucleïnezuurderivaten.

De aldus op geschikte grootte gebrachte derivaten
20 hebben dezelfde wezenlijke structuur als poly-I.poly-C. De nucleïnezuurderivaten volgens de onderhavige uitvinding worden echter gekenmerkt door de specifieke definitie van de moleculaire grootteverdeling van de derivaten.

Als nucleïnezuurderivaten van de onderhavige
25 uitvinding kunnen bijvoorbeeld de volgende substanties worden genoemd:

30 Polyinosinylzuur.poly(5-broomcytidylzuur) met een S-waarde van 4 tot 13, bij voorkeur die waarbij de moleculen voor de maximum moleculaire verdeling het aantal basen hebben tussen 100 en 600.

Polyinosinylzuur.poly(2-thiocytidylzuur) met een S-waarde van 4 tot 13, bij voorkeur die waarbij de moleculen voor de maximum moleculaire verdeling het aantal basen tussen 100 en 600 hebben.

35 Poly(7-deazainosinylzuur).polycytidylzuur met een S-waarde van 4 tot 13, bij voorkeur die waarbij de moleculen voor de maximum moleculaire verdeling het basegetal hebben tussen 100 en 600.

- Poly(7-deazainosinylzuur).poly(5-broomcytidylzuur) met een S-waarde van 4 tot 13, bij voorkeur die waarbij de moleculen voor de maximum moleculaire verdeling het basegetal dat ligt tussen 100 en 600 hebben.
- Poly(2'-azidoinosinylzuur).polycytidylzuur met een S-waarde van 4 tot 13, bij voorkeur die waarbij de moleculen voor de maximum moleculaire verdeling het basegetal van 100 tot 600 hebben.
- Polyinosinylzuur.poly(cytidine-5'-thiofosforzuur) met een S-waarde tussen 4 en 13, bij voorkeur die waarbij de moleculen voor de maximum moleculaire verdeling het basegetal van 100 tot 600 hebben.
- Poly(adenylzuur-uridylzuur) met een S-waarde tussen 4 en 13, bij voorkeur die waarbij de moleculen voor de maximum moleculaire verdeling het basegetal van 100 tot 600 hebben.
- Polyinosinylzuur.poly(cytidylzuur, uridylzuur) met een S-waarde van 4 tot 13, bij voorkeur die waarbij de moleculen voor de maximum moleculaire verdeling het basegetal van 100 tot 600 hebben.
- Polyinosinylzuur.polycytidylzuur.poly-L-lysine met een S-waarde van 4 tot 13, bij voorkeur die waarbij de moleculen voor de maximum moleculaire verdeling het basegetal van 100 tot 600 hebben.
- Polyinosinylzuur.poly(1-vinylcytidylzuur) met een S-waarde van 4 tot 13, bij voorkeur die waarbij de moleculen voor de maximum moleculaire verdeling het basegetal van 100 tot 600 hebben.
- Voor de bereiding van de nucleïnezuurderivaten volgens de onderhavige uitvinding, kunnen de fosfaat-zijketen-eenheden van de bovengenoemde polymeren of de polymeerderivaten (I) tot (V), zoals eerdergenoemd, worden gekleefd, zodat de polymeren of de polymeerderivaten kunnen worden opgesplitst in laag-moleculaire substanties.
- Voor het klieven van de polymeren of de polymeerderivaten kunnen thermische degradatie (hieronder in detail besproken) evenals alkali-begrensde hydrolyse of partiële

hydrolyse met RNase of dergelijke worden gebruikt.

Slechts door het kenmerkende aspect van de nucleïnezuurderivaten volgens de onderhavige uitvinding, teweegebracht door de begrenzing van de moleculaire grootte-
5 verdeling ervan tot een bijzonder traject, vanwege de bovengenoemde klieving van de fosfaat-zijketeneenheden in de derivaten ten einde de derivaten op te splitsen in laag-moleculaire verbindingen, kan het effect volgens de onderhavige uitvinding omvattende ten eerste een verhoging van de fysiologische
10 activiteit en ten tweede een verhoging van de veiligheid worden bereikt.

De fysiologische activiteit van de nucleïnezuurderivaten volgens de onderhavige uitvinding is buitengewoon nuttig voor medicijnen. De nucleïnezuurderivaten volgens de onder-
15 havige uitvinding hebben een sterke carcinostatische activiteit, hetgeen hierna gedetailleerd zal worden toegelicht. Deze activiteit is slechts één van een aantal verscheidene fysiologische activiteiten van de nucleïnezuurderivaten volgens de onderhavige uitvinding.

20 Als andere fysiologische activiteiten van de nucleïnezuurderivaten van de onderhavige uitvinding, welke poly-I.poly-C als ouderlichaam hebben, kunnen verder worden genoemd: TNF-producerend vermogen, interferon-producerend vermogen, interleukin 2-producerend vermogen, macrofaag-
25 activerend vermogen, NK cel-activerend vermogen, remmende werking op de proliferatie van tumorcellen, remmende werking op de proliferatie van tumorcellen in naakte muizen die een menselijke tumorcel dragen, remmende werking op de metastase van tumorcellen in de long, enz.

30 De nucleïnezuurderivaten van de onderhavige uitvinding hebben een veiligheid die zeer veel hoger is dan het conventionele poly-I.poly-C en soortgelijke interferon-inducers. Bijgevolg zijn de verbindingen volgens de onderhavige uitvinding bruikbaar als een antiviraal middel, anti-
35 tumormiddel enz.

Voor gebruik van de nucleïnezuurderivaten van de onderhavige uitvinding als geneesmiddelen, kunnen de derivaten rechtstreeks worden toegediend aan dieren waaronder de mens,

of alternatief kunnen zij worden verenigd met een farmaceutisch aanvaardbare niet-toxische en inerte drager onder oplevering van een medisch preparaat dat bijvoorbeeld het werkzame bestanddeel bevat in een concentratie van 0,1 % tot 5 99,5 %, bij voorkeur van 0,5 % tot 90 %, en het verkregen geneeskundige preparaat kan worden toegediend aan dieren inclusief de mens.

Als drager kunnen één of meer medische hulpmiddelen zoals een vloeibaar, vast of half-vast verdunningsmiddel, 10 vulstof, enz. worden gebruikt. Het geneeskundige preparaat wordt bij voorkeur toegediend in de vorm van een eenheidsdosis. De nucleïnezuurderivaten van de onderhavige uitvinding kunnen langs diverse toedieningsroutes worden toegediend, bijvoorbeeld, per os, toepassing op weefsels, locale 15 toediening of rectale toediening. Het zal duidelijk zijn, dat het geneeskundige preparaat wordt gebruikt in de preparaatvorm die geschikt is voor de betreffende toedieningsroute, bijvoorbeeld, in de vorm van diverse per os preparaten, injecties, inhalatie, oftalmische oplossing, zalf, suppositorium enz. 20 In het bijzonder verdienen toediening aan weefsels en locale toediening bijzondere voorkeur als toediening van de geneeskundige preparaten van de onderhavige uitvinding.

Het is wenselijk, dat de dosis van het geneeskundige preparaat van de onderhavige uitvinding als een remedie voor 25 kwaadaardige tumoren op geschikte wijze wordt vastgesteld met inachtneming van de toestand van de patiënt, bijvoorbeeld leeftijd en gewicht ervan, evenals de toedieningsroute en de symptomen en de mate van de ziekte. In het algemeen wordt het preparaat aangewend voor volwassenen in een hoeveel- 30 heid van 0,05 tot 1000 mg/één dosis als de hoeveelheid van het werkzame bestanddeel van het nucleïnezuurderivaat volgens de onderhavige uitvinding. Bij voorkeur wordt de intraveneuze indruppeling in het algemeen uitgevoerd met een hoeveelheid van 5 tot 100 mg van het derivaat. Al naar gelang het geval 35 kan een lagere hoeveelheid dan de bovengenoemde voldoende zijn, of anderzijds zou een grotere hoeveelheid dan de bovengenoemde noodzakelijk kunnen zijn. Bij de feitelijke toediening kan het preparaat worden aangewend éénmaal tot

verscheidene malen per dag met intervallen van één dag tot verscheidene dagen.

Wanneer het geneeskundige preparaat volgens de onderhavige uitvinding wordt gebruikt als een remedie voor
5 goedaardige tumoren of virale ziekten, is het eveneens wenselijk dat de hoeveelheid van de dosis wordt vastgesteld met inachtneming van de symptomen en de mate van ziekte, de toedieningsroute en de toestand van de patiënt, enz. In het algemeen kan de dosis liggen binnen het traject vanaf dezelfde
10 hoeveelheid als de dosis voor de bovengenoemde remedie voor kwaadaardige tumoren tot één of verscheidende tienden daarvan.

De nucleïnezuurderivaten volgens de onderhavige uitvinding kunnen worden gebruikt te zamen met verscheidene biologische responsmodificatoren (BRM) en verscheidene
15 carcinostatica, welke hieronder zullen worden vermeld. Bij gebruik in combinatie, kan een synergistisch effect door zowel het extra bestanddeel als ook het nucleïnezuurderivaat volgens de onderhavige uitvinding worden verwacht, te zamen met een vermindering van de schadelijke bijwerking van het laatstge-
20 noemde derivaat.

Voorbeelden van BRM:

Interferonen (α , β , γ);
Interleukinen (IL-1, IL-2);
CSF (kolonie-stimulerende factor);
25 TNF (tumor-necrosefactor);
Levamisool, Bestatin, retinoïnezuur, LAK-cellen; enz.

Voorbeelden van Carcinostatica:

5-FU (5-fluoruracil);
Ara-C (cytosine-arabinoside);
30 Ara-A (adenine-arabinoside);
CDDP (cisplatin);
Cyclofosfamide;
AZT (azidothymidine).

Fysiologische activiteiten van nucleïnezuurderivaten van de
35 uitvinding

De fysiologische activiteiten van de nucleïnezuurderivaten van de onderhavige uitvinding zullen hieronder worden beschreven.

Remmende werking op de proliferatie van tumorcellen in tumor-
dragende muizen:

De remmende werking op de proliferatie van tumorcel-
len in Meth A-dragende muizen (muizen die isooloog getransplan-
teerde carcinoma bevatten) werd onderzocht met de volgende
methode. Meth-A-cellen (3×10^5 / 0,2 ml) werden gesuspendeerd
in een fysiologische zoutoplossing en de verkregen suspensie
werd subcutaan geïnjecteerd bij balb/c-muizen (5 weken oud,
mannelijk). Twee dagen na de injectie werd de te onderzoeken
werkzame stof (teststof) intraveneus geïnjecteerd bij de
muizen volgens een schema van drie maal per week gedurende
twee weken. Twee dagen na de laatste injectie werd het
gedeelte van de tumorcellen uitgenomen en het gewicht ervan
gemeten. De verkregen resultaten zijn opgenomen in de onder-
staande tabel.

De teststof (I) is poly-I.poly-C met een moleculaire
grootteverdeling van meer dan 13S; de teststof (II) is
poly-I.poly-C met een moleculaire grootteverdeling van 4S tot
13S (S-waarde = 8); de teststof (III) is poly-I.poly-(C₁₂, U)
(namelijk, poly-C-derivaat waarin de cytidylzuren zijn gesub-
stitueerd door uridylzuur in een hoeveelheid van één uridyl-
zuur per 12 cytidylzuren) met een moleculaire grootteverdeling
van meer dan 13S; en teststof (IV) is poly-I.poly(C₁₂, U), met
een moleculaire grootteverdeling van 4S tot 13S (S-waarde = 9).

De controlegroep kreeg slechts een fysiologische
zoutoplossing toegediend.

Teststof (µg/muis)	Aantal geteste muizen	Gemiddelde ± S.E.	Inhibitie %
controle	10	2,73 ± 0,21	-
teststof (I) (100)	10	0,46 ± 0,05	83*
teststof (II) (100)	10	1,01 ± 0,17	63*
teststof (III) (100)	10	0,69 ± 0,04	73*
teststof (IV) (100)	10	1,80 ± 0,20	34*

(*) : P 0,01 voor significant verschil.

Uit de bovenstaande tabel blijkt duidelijk, dat de
nucleïnezuurderivaten volgens de onderhavige uitvinding een
significante werking met betrekking tot de remming van de

proliferatie van tumorcellen in carcinoma-dragende muizen hebben.

Remmende werking op de metastase van tumorcellen in de long:

Isoloog transplanteerbare melanoma B16F10-cellen
5 (2×10^5) werden geïmplantéerd bij C57BL/6-muizen (mannelijk, 5 weken oud) in hun ader. Twee weken na de implantatie werd het aantal tumor-getransplanteerde nodi in de long (het aantal kolonies) geteld. De teststof werd intraveneus toegediend aan de dieren 24 uur voorafgaande aan de transplantatie van B16F10-
10 melanomacellen in hun ader. Het aantal van de testdieren bedroeg 9. De verkregen resultaten zijn vermeld in de onderstaande tabel. De teststof (I), teststof (II) en controle waren hetzelfde als eerdervermeld.

	Hoeveelheid	Aantal	Inhibitie
15 Teststof	dosis ($\mu\text{g/kg}$)	kolonies	%
controle	-	85 5	
teststof (I)	5	25 8*	71
	50	11 3*	87
	500	1 1*	99
20 teststof (II)	5	58 8*	33
	50	24 7*	72
	500	13 2*	84

(*) : $P < 0,01$ voor significant verschil.

De bovenstaande tabel laat duidelijk zien, dat de
25 nucleïnezuurderivaten van de onderhavige uitvinding een significante werking hebben met betrekking tot de remming van de metastase van tumorcellen in longen van muizen.

Veiligheid van nucleïnezuurderivaten volgens de uitvinding:

De veiligheid van de nucleïnezuurderivaten volgens
30 de onderhavige uitvinding zal hieronder worden beschreven.

Cytotoxiciteit ten opzichte van mergstamcellen van muizen:

De nucleïnezuurderivaten van de onderhavige uitvinding werden onderzocht met betrekking tot de cytotoxiciteit ten opzichte van mergstamcellen van muizen. De teststof
35 (I), teststof (II), teststof (III) en teststof (IV) waren hetzelfde als eerder beschreven. Voor de controlegroep werd slechts een fysiologische zoutoplossing toegediend.

Elke teststof werd intraveneus geïnjecteerd bij

Balb/c-muizen (8 weken oud, mannelijk) in een hoeveelheid van 0,5 mg/kg. Elke testgroep bestond uit 5 muizen. 24 uur na de injectie werden de mergcellen verwijderd uit elke muis. De cellen werden gefixeerd en vervolgens gekleurd met de kleuring volgens Giemsa. De cellen in het uitstrijkje werden bekeken met een microscoop en het variatiepercentage werd berekend op basis van het aantal van de verschijnende reticulocyten, volgens de volgende vergelijking:

$$\text{Variatie-percentage (\%)} = \frac{(\text{controle}) - (\text{testgroep})}{(\text{testgroep})} \times 100$$

De verkregen resultaten zijn vermeld in de onderstaande tabel.

	Variatie-percentage (%)
teststof (I)	61
teststof (II)	0
teststof (III)	59
teststof (IV)	0

Uit de bovenstaande tabel blijkt duidelijk, dat de nucleïnezuurderivaten volgens de onderhavige uitvinding buitengewoon veilig zijn bij gebruik.

Acute toxiciteitsproef:

De acute toxiciteitsproef werd uitgevoerd onder gebruikmaking van balb/c-muizen. De teststof werd intraveneus toegediend aan muizen in één keer en de LD₅₀ werd berekend aan de hand van het aantal muizen dat na één week was gestorven. De verkregen resultaten zijn vermeld in de onderstaande tabel.

Testdier	Toedienings- route	LD ₅₀ Teststof (I)	Teststof (II)
balb/c-muis	i.v.	35 mg/kg	> 150 mg/kg

Zoals blijkt uit de bovenstaande tabel is de toxiciteit van de teststof (II) veel lager dan die van de teststof (I). Hieruit volgt, dat de toxiciteit een nauwe verwantschap vertoont met de ketenlengte van de nucleïnezuurderivaten.

. 8801663

De volgende voorbeelden zijn bestemd om de bereiding van de nucleïnezuurderivaten volgens de onderhavige uitvinding meer gedetailleerd toe te lichten, zonder echter de beschermingsomvang van de onderhavige uitvinding te beperken.

5 Voorbeeld

(A) Bereiding van dubbelstrengs nucleïnezuurderivaten

Equimolaire hoeveelheden van commercieel poly-C (met een S-waarde van 6 tot 12) en poly-I (met een S-waarde van 6 tot 12) werden opgelost in een 50 mM NaCl-bevattende Tris-
10 buffer onder oplevering van een oplossing met een concentratie van 10 tot 20 mg/ml. Deze oplossing werd geleidelijk verhit in een waterbad vanaf kamertemperatuur tot aan 68°C. Vervolgens werd de oplossing gehouden op 68°C gedurende circa 10 minuten, werd zij spontaan afgekoeld tot kamertemperatuur. Daarna werd
15 de oplossing opgeslagen bij 4°C.

De aldus geprepareerde oplossing werd gevriesdroogd onder verkrijging van 1,2 g van een witte vaste stof van het nucleïnezuurderivaat, hetgeen de bovengenoemde teststof (I) (met een S-waarde van 13 tot 24) was.

20 Op dezelfde wijze als hierboven beschreven, behalve dat een copolymeer van poly(C₁₂, U) werd gebruikt in plaats van poly-C, werd een poly-I.poly(C₁₂, U) (teststof (III) met een S-waarde van 13 tot 24) verkregen.

Aangezien de bovengenoemde methode een algemene
25 methode is, kunnen alle hierboven genoemde nucleïnezuurderivaten eveneens worden bereid op dezelfde wijze als het poly-I.poly-C.

(B) Omzetting van nucleïnezuurderivaten in laagmoleculaire verbindingen:

30 1 g van de in de bovenbeschreven stap (A) verkregen teststof (I) werd opgelost in 120 ml water, en 30 ml van een oplossing van 5M NaCl en 150 ml formaldehyde werd daaraan toegevoegd. Het verkregen mengsel werd krachtig geroerd onder oplevering van een homogene oplossing. Nadat de reactieoplos-
35 sing was verhit op 80°C gedurende 8 uur, werd deze volledig gedialyseerd tegen water en gevriesdroogd onder oplevering van 0,95 g van een witte vaste stof.

Deze witte vaste stof was de teststof (II) (met een

S-waarde van 8).

1 g van de teststof (III) verkregen in de bovenstaande stap (A) werd opgelost in 120 ml water, waarna 30 ml van een oplossing van 5M NaCl en 150 ml formaldehyde 5 daaraan werden toegevoegd. Het verkregen mengsel werd krachtig geroerd onder oplevering van een homogene oplossing. Nadat de reactieoplossing gedurende 12 uur werd verhit 60°C, werd deze volledig gedialyseerd tegen water en vervolgens gevriesdroogd onder oplevering van 0,95 g van een witte vaste stof welke de 10 testverbinding (IV) (met een S-waarde van 9) was.

Figuur 1 toont een elutiepatroon van high performance liquid chromatography door gel-filtratie van de betreffende teststoffen, waarbij langs de ordinaat de absorptie bij 260 nm en langs de abscis de retentietijd (min) 15 en de corresponderende bp zijn weergegeven. (1) is de teststof (I), (2) is de teststof (III), (3) is de teststof (IV) en (4) is de teststof (II).

De omstandigheden van de HPLC waren als volgt: TSK-gel G-DNA-PW-gelfiltratiekolom werd gebruikt. De elutie 20 werd uitgevoerd met een 1mM EDTA en 0,3M NaCl-oplossing bevattende Tris-HCl-buffer (pH 7,5). De elutiesnelheid bedroeg 0,2 ml/min en de elutietijd is beschreven aan de hand van het betreffende elutiepatroon (langs de abscis). Een ultraviolet-absorptiegolflengte van 260 nm werd gebruikt voor de detectie 25 en de absorptie bij een volle schaal van 0,04 OD/ml is weergegeven langs de ordinaat van de grafiek.

Het cijfer voor de merkers, dat beneden de abscis is weergegeven (bp) stelt het basengetal van DNA voor.

Als merkers werden gebruikt gehydrolyseerde 30 fragmenten van M13 faag RF-DNA, die gehydrolyseerd waren met restrictie-enzymen.

Het elutiepatroon van de teststof (I) ((1) in de tekening) en dat van de teststof (III) ((2) in de tekening) lijken sterk op elkaar, waarbij de elutiepatroonkrommen 35 verschijnen bij 34 minuten na de inbrenging van het monster in elk geval. De piek geeft het ledige gebied in de kolom weer, waaruit wordt opgemerkt, dat nagenoeg alle samenstellende bestanddelen in deze teststoffen het basegetal van 6000 of meer

hebben.

Bovendien wordt opgemerkt, dat de moleculaire grootteverdeling van de laagmoleculaire teststoffen, de teststof (II) ((4) in de tekening) en de teststof (IV) ((3) in de 5 tekening) vallen binnen het vastgestelde gebied, en de maximum moleculaire verdeling (piek) verscheen in de buurt van 150 (basegetal) en 600 (basegetal) voor deze laagmoleculaire testverbindingen.

Wanneer de moleculaire grootte wordt uitgedrukt aan 10 de hand van het "basegetal" kan de eenheid van het "basegetal" hetzelfde zijn als die van "bp" in figuur 1.

Als een voorbeeld werd te werk gegaan door poly-I.poly-C te klieven in de samenstellende laagmoleculaire stoffen, waarbij de reactieduur en de reactietemperatuur 15 werden veranderd. De door de werkwijze verkregen laagmoleculaire stoffen zijn hieronder vermeld met betrekking tot de maximum moleculaire grootteverdeling (basegetal) en de moleculaire grootteverdeling (basegetal).

Reactie	Reactietijd	Maximum molecu- laire verdeling (basegetal)	Moleculaire verdeling (basegetal)
20 temperatuur			
-	0 h	-	> 10.000
80°C	24 h	30	10-55
80°C	16 h	100	50-800
25 60°C	8 h	1000	200-6000
60°C	12 h	600	50-5000

In het bovenstaande voorbeeld werd een dubbelstrengs-RNA gekliefd in zijn laagmoleculaire bestanddelen. Analooch kan eveneens een enkelstrengs RNA op juist dezelfde wijze 30 worden verwerkt.

Ofschoon de uitvinding in het voorafgaande in detail en onder verwijzing naar specifieke uitvoeringsvormen ervan is beschreven, zal het duidelijk zijn voor een deskundige op het betreffende gebied, dat diverse veranderingen en modificaties 35 daarin kunnen worden aangebracht zonder af te wijken van de gedachte en reikwijdte ervan.

C O N C L U S I E S

1. Dubbelstrengs nucleïnezuurderivaten die RNA als het ouderlichaam hebben, met het kenmerk, dat de gehele moleculaire grootteverdeling van de derivaten valt 5 binnen het traject van 4S tot 13S, uitgedrukt als de waarde van de sedimentatieconstante daarvan.

2. Dubbelstrengs nucleïnezuurderivaten die RNA als het ouderlichaam hebben, met het kenmerk, dat de moleculen voor de maximum verdeling in de gehele moleculaire 10 grootteverdeling van de derivaten het basegetal hebben dat valt in het traject van 50 tot 10000.

3. Dubbelstrengs nucleïnezuurderivaten volgens conclusie 1 of 2, gekenmerkt doordat ze zijn gekozen uit de groep die bestaat uit polyinosinylzuur.poly(5- 15 broomcytidylzuur) met een S-waarde van 4 tot 13, bij voorkeur die waarbij de moleculen voor de maximum moleculaire verdeling het basegetal hebben van 100 tot 600; polyinosinylzuur.poly-(2-thiocytidylzuur) met een S-waarde van 4 tot 13, bij voorkeur die waarbij de moleculen voor de maximum moleculaire 20 verdeling het basegetal hebben van 100 tot 600; poly(7-deazainosinylzuur).polycytidylzuur met een S-waarde van 4 tot 13, bij voorkeur die waarbij de moleculen voor de maximum moleculaire verdeling het basegetal hebben van 100 tot 600; poly(7-deazainosinylzuur).poly(5-broomcytidylzuur) met een 25 S-waarde van 4 tot 13, bij voorkeur die waarbij de moleculen voor de maximum moleculaire verdeling het basegetal van 100 tot 600 hebben; poly(2'-azidoinosinylzuur).polycytidylzuur met een S-waarde van 4 tot 13, bij voorkeur die waarbij de moleculen voor de maximum moleculaire verdeling het basegetal van 30 100 tot 600 hebben; polyinosinylzuur.poly(cytidine-5'-thiofosforzuur) met een S-waarde van 4 tot 13, bij voorkeur die waarbij de moleculen voor de maximum moleculaire verdeling het basegetal van 100 tot 600 hebben; poly(adenylzuur-uridylzuur) met een S-waarde van 4 tot 13, bij voorkeur die waarbij de 35 moleculen voor de maximum moleculaire verdeling het basegetal hebben van 100 tot 600; polyinosinylzuur.poly(cytidylzuur, uridylzuur) met een S-waarde van 4 tot 13, bij voorkeur die waarbij de moleculen voor de maximum moleculaire verdeling het

basegetal hebben van 100 tot 600; polyinosinylzuur.polycytidyl-
zuur.poly-L-lysine met een S-waarde van 4 tot 13, bij voorkeur
die waarbij de moleculen voor de maximum moleculaire gewichts-
verdeling het basegetal hebben van 100 tot 600; en polyino-
5 synylzuur.poly(1-vinylcytidylzuur) met een S-waarde van 4 tot
13, bij voorkeur die waarbij de moleculen voor de maximum
moleculaire verdeling het basegetal hebben van 100 tot 600.

4. Antitumorpreparaat, g e k e n m e r k t doordat
het als een werkzaam bestanddeel het dubbelstrengs nucleïne-
10 zuurderivaat volgens één der conclusies 1 tot 3 bevat.

5. Antiviraal preparaat, g e k e n m e r k t
doordat het als een werkzaam bestanddeel het dubbelstrengs
nucleïnezuurderivaat volgens één der conclusies 1 tot 3 bevat.

6. Antitumorpreparaat volgens conclusie 4, g e -
15 k e n m e r k t doordat het verder één of meer biologische
responsmodificatoren en/of carcinostatica bevat.

7. Antiviraal preparaat volgens conclusie 5, g e -
k e n m e r k t doordat het verder één of meer biologische
responsmodificatoren en/of carcinostatica bevat.

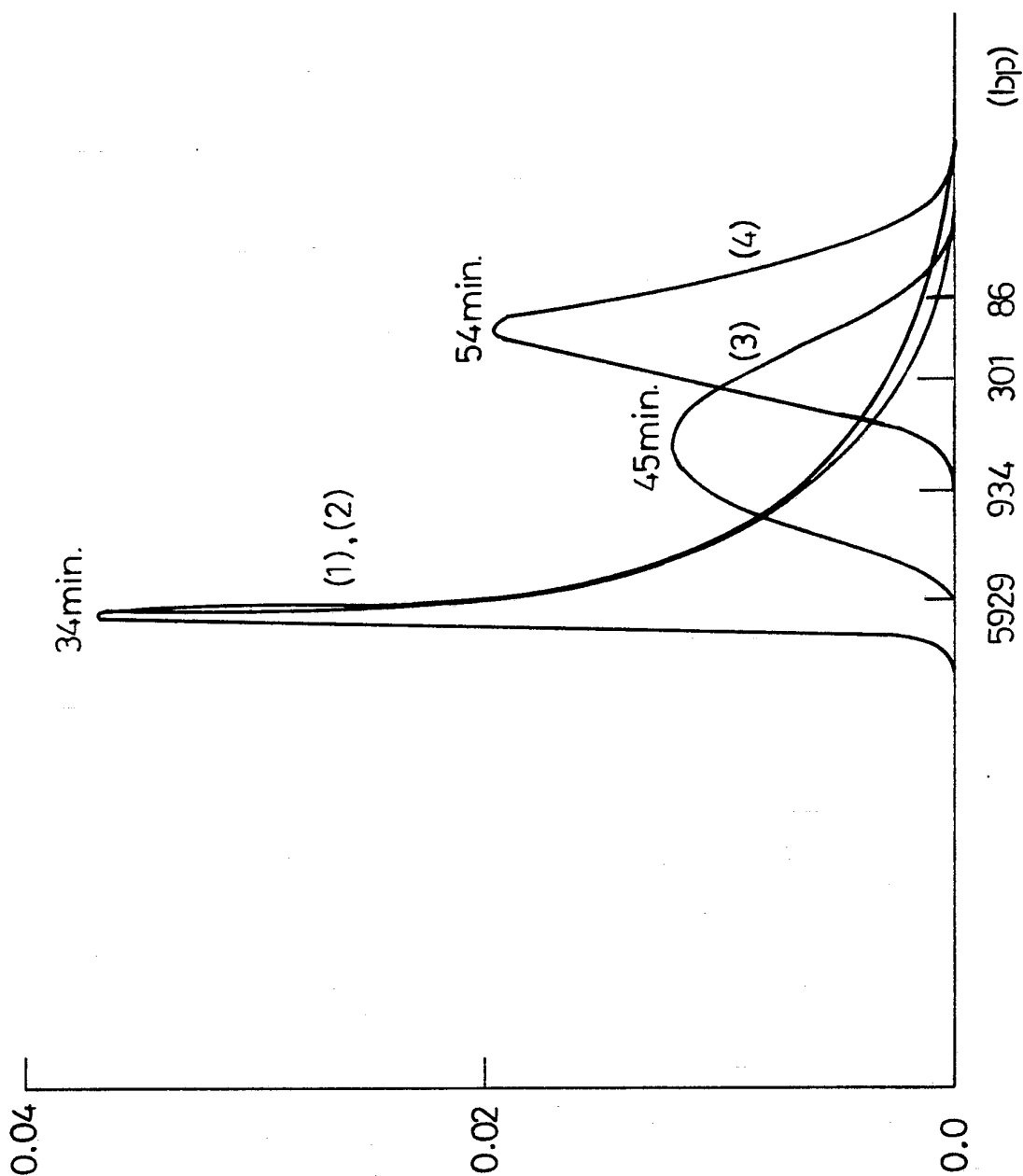


fig.1