



(19) Országkód

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR  
SZABADALMI  
HIVATAL**

# SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

**215 242 B**

(21) A bejelentés ügyszáma: 5302/90  
(22) A bejelentés napja: 1990. 08. 23.  
(30) Elsőbbségi adatok:  
89/11171 1989. 08. 23. FR

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

**C 07 H 21/02**  
A 61 K 48/00

(40) A közzététel napja: 1991. 07. 29.  
(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi Közlönyben: 1998. 11. 30.

(72) Feltalálók:

Braham, Abdel Karim, Saint Denis (FR)  
Smets, Pierre, Villennes/Seine (FR)  
Zalisz, René, Menucourt (FR)

(73) Szabadalmaz:

ROUSSEL UCLAF, Párizs (FR)

(74) Képviseelő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,  
Budapest

(54) **Eljárás anti-szensz anti-mRNS alfa-TNF oligonukleotid-szekvenciák és ezeket tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására**

KIVONAT

A találmány tárgya eljárás anti-szensz anti-mRNS alfa-TNF (I) általános képletű oligonukleotid-szekvenciák előállítására



ahol

X jelentése hidrogénatom vagy egy 1–17-tagú oligonukleotid, szabad formában, alkilezett formá-

ban, kénezett formában vagy poli-L-lizin-származéka formájában.

A találmány kiterjed az (I) általános képletű oligonukleotidokat tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására is, amelyek fertőzéses endotoxinos sokk, illetve a TNF túlermeléséből eredő patológiás állapotok kezelésére alkalmazhatók.

A találmány tárgya eljárás anti-szensz, anti-mRNS alfa-TNF oligonukleotid-szekvenciák előállítására.

Ismeretes, hogy a makrofágok által kiválasztott TNF (tumor nekrozis faktor) felelős az abszolút metabolikus katasztrófákért, amelyek fertőzőes endotoxin sokkot okoznak. A TNF-termelést leállító anyagok kutatása során jutottunk az anti-szensz, anti-mRNS oligonukleotid-szekvenciákhoz, amelyek leállíthatják a TNF termelését.

A különböző szekvenciák tanulmányozása során úgy találtuk, hogy ezt a tulajdonságot az oligonukleotidnak bizonyos szekvenciája jelenti.

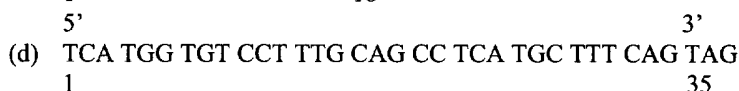
Oligonukleotidok foszfit-triészter-módszerrel történő előállítását az EP-090789 számú dokumentum, míg foszforamidit-módszerrel történő előállítását M. H. Caruters *et al.*, Gene Amplif. Anal., 1983(3), 1-26 helyen ismertetik.

A fentiek alapján a találmány tárgya eljárás anti-szensz irányú, anti-mRNS alfa-TNF oligonukleotidjainak új szekvenciái előállítására, amelyek a következő (I) általános képlettel szemléltethetők:



ahol

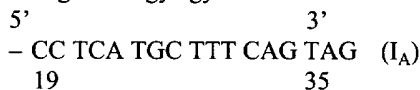
X jelentése hidrogénatom vagy egy 1-17 tagú oligonukleotid-szekvencia szabad formában, alkilezett formában, kénezett formában vagy poli-L-lizin származéka formájában.



Az (I) általános képletű termékeket a találmány értelmében úgy állítjuk elő, hogy a szintetizálendő lánc 3'-helyzetének első, (II) általános képletű nukleotidját egy hordozón rögzítjük – a képletben Z jelentése 2-20 szénatomos szénhidrogéncsoport, B<sub>1</sub> az első nukleotidnak megfelelő purin- vagy pirimidin-bázis, amelynek aminos csoportja védett és R jelentése védőcsoport – az 5'-helyzetű hidroxilcsoport védőcsoportját egy savas reagenssel eltávolítjuk, a kapott (III) általános képletű vegyületet, ahol Z és B<sub>1</sub> jelentése a fenti, a második nukleotid (IV) általános képletű monomerjével reagáltatjuk, ahol R jelentése a fenti, B<sub>2</sub> jelentése a második nukleotidnak megfelelő purin- vagy pirimidin-bázis, amelynek aminos csoportja védett, R<sub>1</sub> egy alkilcsoport vagy egy -OR'<sub>1</sub> vagy -SR'<sub>1</sub>-csoport, ahol R'<sub>1</sub> jelentése védőcsoport, R<sub>2</sub> jelentése védőcsoport, a kapott (V) általános képletű vegyületet, ahol R, R<sub>1</sub>, B<sub>1</sub> és B<sub>2</sub> jelentése a fenti, oxidáljuk, így egy (VI) általános képletű terméket kapunk, ahol R, R<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> és Z jelentése a fenti, X<sub>1</sub> jelentése oxigén-

Az (I) általános képletben és a leírás további részében az „1-17-tagú oligonukleotid-szekvencia” kifejezésen bármely olyan szekvenciát értünk, amely adenint és guanint (purin bázisok), citozint és timint (pirimidin bázisok) tartalmaz. Az „alkilezett forma” kifejezésen olyan alkilezett származékokat értünk, amelyek a foszfátcsoporton egy alkilcsoportot, közelebbről metil-, etil- vagy propilcsoportot tartalmaznak. Ezek a csoportok jelen lehetnek minden foszfátcsoporton vagy azok egy részén. A „kénezett forma” kifejezésen a foszfonát kénezett származékát értjük, és pedig tioátokat és ditioátokat. Ezek a csoportok jelen lehetnek minden foszfátcsoporton vagy azok egy részén.

A találmány szerinti eljárással előállított termékek közül kiemelhetők azok az (I) általános képletű oligonukleotid-szekvenciák, amelyekben X jelentése hidrogénatom vagy az (I<sub>A</sub>) képletnek megfelelő szekvencia egésze vagy egy része:



szabad formában, alkilezett formában, kénezett formában vagy poli-L-lizin-származéka formájában.

Ez utóbbiak közül előnyösek azok az (I) általános képletnek megfelelő oligonukleotid-szekvenciák, amelyekben X jelentése hidrogénatom, CC szekvencia vagy az (I<sub>A</sub>) képletnek megfelelő szekvencia szabad formában, alkilezett formában, kénezett formában vagy poli-L-lizin-származéka formájában, különösen a következő

szekvenciák:

vagy kénatom. Ezután a fenti módon a (II) általános képletű termékből ezzel a (VI) általános képletű termékkel és egy új nukleotid monomerjéből új gyűrűt képezünk, a kívánt lánc kialakításához a (VII) általános képletű végső termék előállítása érdekében. A (VII) általános képletben R, R<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, X<sub>1</sub> és Z jelentése a fenti, B<sub>2</sub> jelentése a szekvencia utolsó nukleotidja. Végül az oligonukleotidról a védőcsoportot eltávolítjuk, és a terméket a hordozóról lehasítjuk, így az (I) általános képletű terméket kapjuk, amelyet tisztítunk.

A találmány szerinti eljárást előnyösen a következő körülmények között végezzük:

– a (II) általános képletű termék 5'-helyzetében levő hidroxilcsoportról a védőcsoportot savas reagenssel, például ecetsavval, di- vagy triklór-ecetsavval távolítjuk el;

– a (III) általános képletű termék és a (IV) általános képletű termék kapcsolását tetrazol segítségével aktíválva, acetonitrilben végezzük;

– az (V) általános képletű foszfit (VI) általános képletű foszfátá történő oxidálását jóid segítségével oldószerben, előnyösen víz, lutidin és tetrahidrofurán elegyében, vagy víz, piridin és tetrahidrofurán elegyében végezzük;

– az (V) általános képletű foszfit (VI) általános képletű kénezett formába történő oxidálását kén segítségével oldószerben előnyösen szén-dioszulfid, vízmentes piridin és vízmentes trietil-amin elegyében végezzük;

– a szintézis végén az 5'-helyzetben levő terminális hidroxilcsoportról a védőcsoportot savas reagens, például ecetsav, di- vagy triklór-ecetsav segítségével távolítjuk el;

– a (VII) általános képletű oligonukleotidról a védőcsoportokat koncentrált ammónium-hidroxid segítségével a reakcióelegy enyhe melegítése közben távolítjuk el.

Az eljárás fenti műveleteinek elvégzésére előnyösen az Applied Biosystems Model 381A automatikus szintetizálót alkalmazzuk.

A találmány szerinti eljárásban hordozóként szilárd hordozót alkalmazunk, amely lehet szilícium-dioxid vagy porózus üveg. A 208 599 számú európai szabadalmi leírásban ismertetett hordozók szintén használhatók.

Z jelentése egy  $-(CH_2)_n-$  általános képletű csoport, ahol n értéke 2–20 egész szám. Előnyösek azok a termékek, amelyekben Z jelentése egy  $-(CH_2)_2-$  képletű csoport.

A (II)–(VII) általános képletekben a  $B_1, B_2 \dots B_z$  csoport purin- vagy pirimidin-bázis, amelyeknek az amincsoportjai védettek. A védőcsoportok lehetnek például benzoil- vagy izobutilcsoportok. Adenin és citozin esetén előnyös a benzoilcsoport. Guanin esetén előnyös az izobutiril-csoport.

Az 5'-helyzetben levő hidroxilcsoport R védőcsoportja lehet például tritil-, monometoxi-tritil-, dimetoxi-tritil- vagy pixilcsoport.

A foszfátcsoportok hidroxilcsoportjának  $R'_1$  védőcsoportja lehet például metil-, ciano-etil-, orto- vagy para-klór-fenil-csoport. Előnyös a ciano-etil-csoport alkalmazása. Az  $R_2$  védőcsoport lehet alkilcsoport, például metil-, etil-, izopropil- vagy morfolino- vagy piperidinocsoport. Előnyös az izopropilcsoport.

Az eljárás során a (III) általános képletű termék azon frakcióját, amely nem reagált el, azonnal észterré alakítjuk azért, hogy a következő kapcsolás során megakadályozzuk a számunkra nem megfelelő szekvencia kialakulását. Ezt az úgynevezett „sapkázási” reakciót előnyösen ecetsav-anhidrid segítségével lutidin és tetra-

hidrofurán elegyében, katalizátorként dimetil-amino-piridin vagy metil-imidazol jelenlétében végezzük.

Az oligonukleotid-szekvenciák poli-L-lizin-származékai úgy állíthatók elő, hogy egy (VIII) általános képletű 5 termék – ahol Z, R,  $B_1$  jelentése a fenti, egy (IV) általános képletű termékkel reagáltatunk, a kapott (IX) általános képletű termék – ahol R, Z,  $R_1, B_1$  és  $B_2$  jelentése a fenti – oxidáljuk, és az aktiválócsoportot és a hordozót lehasítjuk, a kapott (X) általános képletű termék terminális ribóz részét – ahol R,  $R_1, B_1$  és  $B_2$  jelentése a fenti,  $X_1$  jelentése oxigén- vagy kénatom – oxidáljuk, majd L-lizinnel reagáltatjuk redukálóközegben, így a (XI) általános képletű terméket kapjuk – ahol R,  $R_1, B_1, B_2$  és  $X_1$  jelentése a fenti, majd a szintézist a (VI) általános képletű termék képzésénél leírt módon folytatjuk.

A poli-L-lizin-származékok a J. P. Leonetti és munkatársai Gene 72, (1988) 323–332. irodalmi helyen ismert eljáráshoz hasonló eljárással állíthatók elő.

A találmány szerinti eljárással előállított új oligonukleotid-szekvenciák nagyon hasznos farmakológiai tulajdonságokkal rendelkeznek, különösen képesek megállítani a sejtek alfa-TNF termelését úgy, hogy specifikusan kapcsolódnak a 166–185 szekvencia cél mRNS-hez, amely átfogja az AUD kodont.

Ezeket a tulajdonságokat a kísérleti részben mutatjuk be.

Ezek a tulajdonságok alkalmassá teszik a találmány szerinti eljárással előállított (I) általános képletű új oligonukleotid-szekvenciákat, hogy gyógyszerhatóanyagokként alkalmazzuk.

A találmány tárgya tehát továbbá eljárás gyógyszerkészítmények előállítására, amelyek hatóanyagként az (I) általános képletű, alfa-TNF ellentétes irányú, anti-mRNS új oligonukleotid-szekvenciáit tartalmazzák, a 35 képletben X jelentése hidrogénatom, egy 1–17-tagú oligonukleotid-szekvencia szabad formában, alkilezett formában, kénezett formában vagy poli-L-lizin-származéka formájában. Különösen előnyösek azok az (I) általános képletű vegyületek, ahol X jelentése hidrogénatom vagy az ( $I_A$ ) szekvencia egésze vagy annak egy része, szabad formában, alkilezett formában, kénezett formában, vagy poli-L-lizin-származéka formájában.

A találmány szerinti eljárással előállított gyógyszerkészítmények közül különösen előnyösek azok, amelyek olyan fenti oligonukleotid-szekvenciát tartalmaznak, ahol X jelentése hidrogénatom,  $-CC$  szekvencia vagy az ( $I_A$ ) szekvencia, szabad formában, alkilezett formában, kénezett formában vagy poli-L-lizin-származéka formájában. Különösen előnyösek azok a gyógyszerkészítmények, amelyek a következő oligonukleotid-szekvenciákat tartalmazzák:

(d) TCA TGG TGT CCT TTG CAG CC  
1 20

(d) TCA TGG TGT CCT TTG CAG  
1 18

(d) TCA TGG TGT CCT TTG CAG CC TCA TGC TTT CAG TAG  
1 35

szabad formában, alkilezett formában, kénezett formában vagy poli-L-lizin-származék formájában.

A találmány szerinti eljárással előállított gyógyszerkészítmények mindenfajta eredetű fertőzéses endotoxin sokk, illetve az alfa-TNF hiperszekréciójával kapcsolatos patológiás állapot kezelésére alkalmazhatók.

Az alkalmazott dózis az alkalmazott terméktől, a kezelt személytől és a kérdéses betegségtől függően változik, például 1 µg és 30 mg között változhat napon-ta intravénás úton adagolva embernek.

A találmány szerinti eljárással előállított gyógyszerkészítmények hatóanyagként legalább egy (I) általános képletű új oligonukleotid-szekvenciát tartalmaznak. Ezek lehetnek szabad formában, alkilezett formában, kénezett formában vagy poli-L-lizin-származékok formájában. A gyógyszerkészítmények elkészíthetők emésztethető, parenterális vagy helyi kezelésre szánt formában.

A gyógyszerkészítmények lehetnek például szilárd vagy folyékony formájúak a humán gyógyászatban alkalmazott szokásos formáknak megfelelően, így például sima vagy cukorral bevont tabletták, kapszulák, granulátumok, kúpok vagy injektálható készítmények vagy aeroszolok formájában, amelyek szokásos módszerrel állíthatók elő. A készítmények a hatóanyag mellett az ilyen gyógyszerkészítményekben szokásosan alkalmazott segédanyagokat és vivőanyagokat tartalmazhatják, így például talkumot, gumiarábikumot, laktózt, keményítőt, magnézium-sztearátot, kakaóvaját, vizes vagy nemvizes vivőanyagot, állati vagy növényi eredetű zsíradékot, paraffinszármazékokat, glikolokat, különböző nedvesítő-, diszpergáló- vagy emulgeálószerket és konzerválószerket.

A találmány szerinti eljárást a következő példákkal szemléltetjük a korlátozás szándéka nélkül.

#### 1. példa

5' 3'

(d) TCA TGG TGT CCT TTG CAG szekvencia (18 mer anti-alfa-TNF) szabad formában

#### Berendezés:

„Applied Biosystems Model 381 A” automata szintetizálót alkalmazunk. A berendezést feltöltjük a szükséges reagensekkel. A (IV) képletű terméket enyhe argon túlnyomás alatt oldjuk acetónitrilben, ami lehetővé teszi az automatikus adagolást az elektromos szelepek nyitásával akkor és úgy, ahogyan szükséges.

Rögzítjük a szintetizálandó nukleotid-szekvenciát, és jelezzük az előállítandó termék mennyiségét.

A végső detritilezést úgy programozzuk, hogy az (I) általános képletű terméket az 5'-helyzetben hidroxilezett formában vagy tritilezett formában kapjuk meg.

Egy kis, előzőleg a (II) képletű funkcionális hordozót tartalmazó oszlopot helyezünk a berendezésbe (CPG porózus üveg hordozó).

A szintézist ezután végig lefolytatjuk kézi közbeavatkozás nélkül.

A detritilező oldatokat automatikusan visszanyerjük minden lépésben egy, a berendezéshez kapcsolt frakciógyűjtőben, így minden lépés kitermelése mérhetővé válik.

#### Reagensek:

Minden használt reagensnek nagyon tisztának kell lennie.

A (IV) általános képletű 4-foszforamiditet (B<sub>2</sub> jelölése adenin, citozin, guanin vagy timin) kis üvegekbe helyezjük. A berendezésbe történő helyezés előtt a szükséges mennyiségű oldószert adagolni kell.

A berendezésbe a következő további oldatokat helyezjük:

10 – 4% tetrazol acetónitrilben a kapcsolás aktiválásához,

– ecetsav-anhidrid, lutidin és tetrahydrofurán 1:1:8 térfogatarányú elegye egyrészt, másrészt dimetil-amino-piridin és tetrahydrofurán 7:93 térfogatarányú elegye helyben összekeverve a „sapkázó” reakcióhoz,

15 – jód, víz, lutidin és tetrahydrofurán 3:2:2:93 térfogatarányú elegye az (V) általános képletű foszfit (VI) általános képletű foszfátá történő oxidációjához,

20 – 2% triklór-ecetsav diklór-metánban a detritilezési reakcióhoz,

– tiszta acetónitril a foszforamiditek oldásához.

#### Módszer:

25 A reakciót 0,95 µmol mennyiségben hajtjuk végre. A terméket a berendezésben detritilezzük a szintézis végén.

A tiszta termék kitermelése a szintézisben 79%.

30 A (VII) általános képletű termékről a védőcsoportokat a következőképpen távolítjuk el:

1 – 28% ammónium-hidroxid 1 óra hosszat szobahőmérsékleten,

2 – telített ammónium-hidroxid (60 °C, 5 óra).

#### Tisztítás:

35 1 – sóatlanítás NAP10 (Pharmacia) Sephadex G50<sup>R</sup> oszlopon,

2 – HPLC Partisil 10 SAX<sup>R</sup> oszlopon.

A oldat 50–99%-ig változó gradiense A és B oldat elegyében 20 percig

40 A: 0,3 mol/l-es foszfát-puffer és metil-cianid 7:3 arányú elegye, pH = 6,2.

B: 10<sup>-3</sup> mol/l-es foszfát-puffer és metil-cianid 7:3 arányú elegye, pH = 6,2.

átfolyási arány 2 ml/perc.

45 3 – sóatlanítás NAP 25 (Pharmacia) Sephadex G50<sup>R</sup> oszlopon.

#### A tisztított termék analízise:

– HPLC Partisil 10 SAX<sup>R</sup> oszlopon, ugyanolyan körülmények között, mint fent, R<sub>t</sub> = 13,92 perc.

50 – HPLC inverz fázisú microbondapack C18<sup>R</sup> oszlopon, 8,4%-tól 15%-ig változó metil-cianid gradiens 10<sup>-2</sup> mol/l-es trietil-ammónium-acetátban, pH = 5,5, 20 percig, átfolyási arány 2 ml/perc, R<sub>t</sub> = 12,12 perc.

55 Végül 0,125 µmol tiszta terméket kapunk, kitermelés 13%.

#### 2. példa

5' 3'

60 (d) TCA TGG TGT CCT TTG CAG szekvencia (18 mer, anti-alfa-TNF) tioát formában

Az 1. példa szerinti módon járunk el, azonban a jóddal végzett oxidálási lépést kénnel 450 másodpercig végzett oxidálással helyettesítjük, így a cím szerinti terméket kapjuk.

A jóddal végzett oxidálás helyett, amelyben jód, víz, lutidin és tetrahidrofuran elegyét alkalmazzuk, kénnel végzett oxidálást végzünk, amelynek során a következő oldatot alkalmazzuk:

3 g kén  
28,5 ml szén-diszulfid  
28,5 ml vízmentes piridin  
3 ml vízmentes trietil-amin.

Kénnel végzett oxidálás esetén elengedhetetlenül fontos az oszlopot az oxidálás előtt és után ismételt mosni szén-diszulfid és piridin 1:1 arányú elegyével a kénmaradék eltávolítása céljából.

Az eljárás többi része változatlan.

Szintézis kitermelése: 1,24  $\mu\text{mol}$  56,5%.

*Védőcsoport-eltávolítás:*

1 – 28% ammónium-hidroxid, 1 óra, szobahőmérséklet  
2 – telített ammónium-hidroxid, egy éjszakán át, 50 °C-on.

*Tisztítás:*

1 – sótalanítás NAP 25 (Sephadex)<sup>R</sup> oszlopon, eluálószer: víz.

2 – HPLC microbondapack C18<sup>R</sup> oszlopon,  $R_f = 24,46$ , A oldat 30%-tól 50%-ig változó gradiens 20 percen át, átfolyási arány 2 ml/perc

A:  $10^{-2}$  mol/l trietil-ammónium-acetát, pH = 5,5 és metil-cianid 7:3 arányú elegye,

B:  $10^{-2}$  mol/l trietil-ammónium-acetát, pH = 5,5.

Tiszta termék kitermelése: 40,3%.

*3. példa*

5' 3'

(d) TCA TGG TGT CCT TTG CAG CC szekvencia (20 mer anti-alfa-TNF) szabad formában

Az eljárást az 1. példa szerinti módon végezzük.

*4. példa*

5'

(d) TCA TGG TGT CCT TTG CAG CC TCA TGC 3'

TTT CAG TAG szekvencia (35-mer anti-alfa-TNF) szabad formában

A terméket az 1. példa szerinti módon állítjuk elő.

*5. példa*

Injektálható oldatot készítünk a következő összetétellel:

– 1. példa terméke 10  $\mu\text{g}$   
– steril injekciós víz 2 ml

*6. példa*

Tablettákat készítünk a következő összetétellel:

– 2. példa terméke 20  $\mu\text{g}$   
– tablettázási segédanyagok 100 mg-ig  
(Segédanyagok: laktóz, keményítő, talkum, magnézium-sztearát).

*7. példa*

Injektálható oldatot készítünk a következő összetétellel:

– 3. példa terméke 10  $\mu\text{g}$   
– steril vizes vivőanyag 2 ml

*A 3. példa szerint előállított*

*oligonukleotid-szekvencia vizsgálata*

*1. Biológiai teszt*

10 – Humán monocitákat ( $4 \times 10^6$  sejt) inkubálunk 6  $\mu\text{mol}$  ellentétes irányú oligonukleotiddal, 4 formában 3 óra hosszat.

– Hozzáadunk 10  $\mu\text{g/ml}$  LPS-t és  $5 \times 10^3$  egység/ml INF-t.

15 – 18 óra hosszat inkubálunk.

– A tenyészet felülúszóját elválasztjuk.

– A felülúszót TNF (L 929) által okozott lízisre érzékeny sejtekhez adjuk, és 24 óra hosszat reagáltatjuk.

20 – Mérjük sejtek életképességét, kristályibolya segítségével, kolorimetrián.

*2. Immunológiai teszt*

– Humán monocitákat ( $4 \times 10^6$  sejt) 6  $\mu\text{mol}$  ellentétes irányú oligonukleotiddal inkubálunk 4 formában, 25 3 óra hosszat.

– Hozzáadunk 10  $\mu\text{g/ml}$  LPS-t és  $5 \times 10^3$  egység/ml INF-t a TNF termelésének stimulálására.

– 18 óra hosszat inkubálunk.

– A tenyészet felülúszóját elválasztjuk.

30 – Bevonatot készítünk ezzel a tenyészet felülúszójával.

– Jóddal jelzett (RIA-hoz), illetve enzimmal jelzett (ELISA-hoz) anti-TNF antitestet adunk hozzá.

– 3 óra hosszat inkubálunk.

*Leolvasások:*

35 a) Hozzáadjuk az enzim-szubsztrátot (ELISA) és leolvassuk az optikai sűrűséget.

b) Mérjük a radioaktivitást (RIA).

– Mérjük a monociták által termelt TNF mennyiségét.

– Számoljuk a TNF-termelés gátlásának értékét.

40 – *Eredmények:*

Anti-szensz oligonukleotidokkal kezelt monociták által termelt alfa-TNF gátlási értéke.

*Gátlási érték:*

45  $1 - \frac{V/\text{ml oligonukleotid jelenlétében}}{V/\text{ml oligonukleotid hiányában}} \times 100 = 63,5 \pm 9.$

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

50 1. Eljárás anti-szensz, anti-mRNS alfa-TNF (I) általános képletű oligonukleotid-szekvenciák előállítására

5' 3'

(d) TCA TGG TGT CCT TTG CAG – X (I)

55 1 18

ahol

X jelentése hidrogénatom, vagy egy 1–17-tagú oligonukleotid, szabad formában, alkilezett formában, kénezett formában vagy poli-L-lizin-származéka formájában,

azzal jellemezve, hogy a szintetizálandó lánc 3'-helyzetében levő első, (II) általános képletű nukleotidot egy hordozón rögzítünk, ahol Z jelentése 2–20 szénatomos szénhidrogéncsoport, B<sub>1</sub> jelentése az első nukleotidnak megfelelő purin- vagy pirimidin-bázis, amelynek aminocsoportja védett, R jelentése védőcsoport, az 5'-helyzetben levő hidroxilcsoportról a védőcsoportot egy savas reagenssel eltávolítjuk, így egy (III) általános képletű terméket kapunk, ahol Z és B<sub>1</sub> jelentése a fenti, amelyet a második nukleotid (IV) általános képletű monomerjével reagáltatunk, ahol R jelentése a fenti, B<sub>2</sub> jelentése a második nukleotidnak megfelelő purin- vagy pirimidinbázis, amelynek aminocsoportja védett, R<sub>1</sub> jelentése alkilcsoport vagy –OR'<sub>1</sub> vagy –SR'<sub>1</sub> általános képletű csoport, ahol R'<sub>1</sub> jelentése védőcsoport, R<sub>2</sub> jelentése védőcsoport, a kapott (V) általános képletű terméket, ahol R, R<sub>1</sub>, B<sub>1</sub> és B<sub>2</sub> jelentése a fenti, oxidáljuk, így egy (VI) általános képletű terméket kapunk, ahol R, R<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> és Z jelentése a fenti, X<sub>1</sub> jelentése oxigén- vagy kénatom, majd a fenti módon a (II) általános képletű termékből kiindulva a (VI) általános képletű termékkel és új nukleotid monomerrel az eljárást a végső, (VII) általános képletű lánc kialakításáig folytatjuk, ahol R, R<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, X<sub>1</sub> és Z jelentése a fenti, B<sub>2</sub> jelentése a szekvencia utolsó nukleotidja, majd az oligonukleotidról a védőcsoportokat eltávolítjuk, és a hordozót lehasítjuk, és a kapott (I) általános képletű terméket tisztítjuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy

– a (II) általános képletű termék 5'-helyzetében levő hidroxilcsoportról a védőcsoportot egy savas reagenssel, előnyösen ecetsavval, di- vagy triklór-ecetsavval hasítjuk le,

– a (III) általános képletű termék és a (IV) általános képletű termék kapcsolási reakcióját tetrazollal aktiváljuk, és acetonitrilben hajtjuk végre,

– az (V) általános képletű foszfit (VI) általános képletű foszfáttá történő oxidálását jóid segítségével oldószerben, előnyösen víz, lutidin és tetrahydrofuran elegyében vagy víz, piridin és tetrahydrofuran elegyében hajtjuk végre,

– az (V) általános képletű foszfit (VI) általános képletű kénezett formává történő oxidálását kén segítségével, oldatban, előnyösen szén-diszulfid, vízmentes piridin és vízmentes trietil-amin elegyében hajtjuk végre,

– a szintézis végén az 5'-helyzetben levő terminális hidroxilcsoportról a védőcsoportot savas reagens, előnyösen ecetsav, di- vagy triklór-ecetsav segítségével távolítjuk el,

– a (VII) általános képletű oligonukleotidról a védőcsoportokat koncentrált ammónium-hidroxid segítségével, a reakcióközeg enyhe melegítésével távolítjuk el.



szekvenciával rendelkező oligonukleotid előállítására szabad formában, alkilezett formában, kénezett formában

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás az (I) általános képletű oligonukleotid-szekvenciák poli-L-lizin-származékainak előállítására, azzal jellemezve, hogy egy (VIII) általános képletű vegyületet, ahol Z, R, B<sub>1</sub> jelentése a fenti, egy (IV) általános képletű vegyülettel reagáltatunk, a kapott (IX) általános képletű terméket, ahol R, Z, R<sub>1</sub>, B<sub>1</sub> és B<sub>2</sub> jelentése a fenti, oxidáljuk, és az aktiválócsoporthoz és a hordozóhoz lehasítjuk, a kapott (X) általános képletű termék terminális ribóz-részét oxidáljuk, ahol R, R<sub>1</sub>, B<sub>1</sub> és B<sub>2</sub> jelentése a fenti, majd redukálóközegben L-lizinnel reagáltatjuk, a kapott (XI) általános képletű termékkel, ahol R, R<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> és X<sub>1</sub> jelentése a fenti, a szintézist a (VI) általános képletű vegyülettől kezdődő módon folytatjuk.

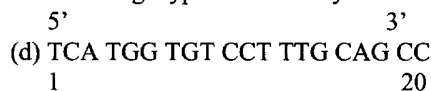
4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás olyan (I) általános képletű oligonukleotid-szekvencia előállítására, ahol a szintetizálandó első nukleotid X jelentése hidrogénatom esetén a végső szekvencia első nukleotidja vagy az (I<sub>A</sub>) képletű szekvencia egy nukleotidja:



szabad formában, alkilezett formában, kénezett formában vagy poli-L-lizin-származéka formájában, azzal jellemezve, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

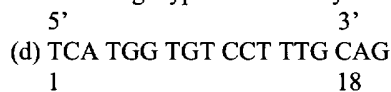
5. Az 1–4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás olyan (I) általános képletű oligonukleotid-szekvenciák előállítására, ahol a szintetizálandó lánc 3'-helyzetében levő első nukleotid a –CC szekvencia vagy az (I<sub>A</sub>) képletű szekvencia első nukleotidja, azzal jellemezve, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

6. Az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás



szekvenciával rendelkező oligonukleotid előállítására szabad formában, alkilezett formában, kénezett formában vagy poli-L-lizin-származéka formájában, azzal jellemezve, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

7. Az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás



szekvenciával rendelkező oligonukleotid előállítására szabad formában, alkilezett formában, kénezett formában vagy poli-L-lizin-származéka formájában, azzal jellemezve, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

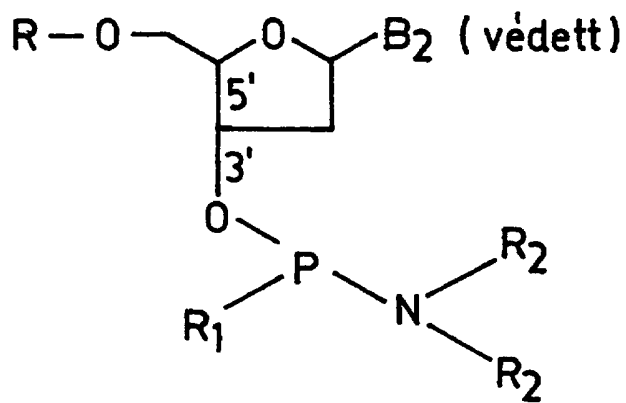
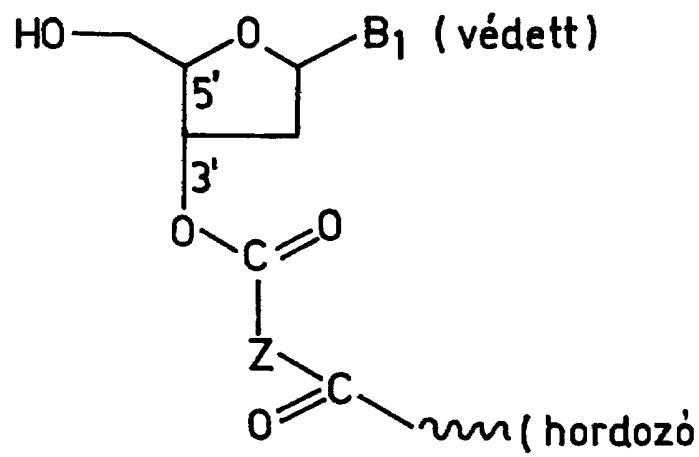
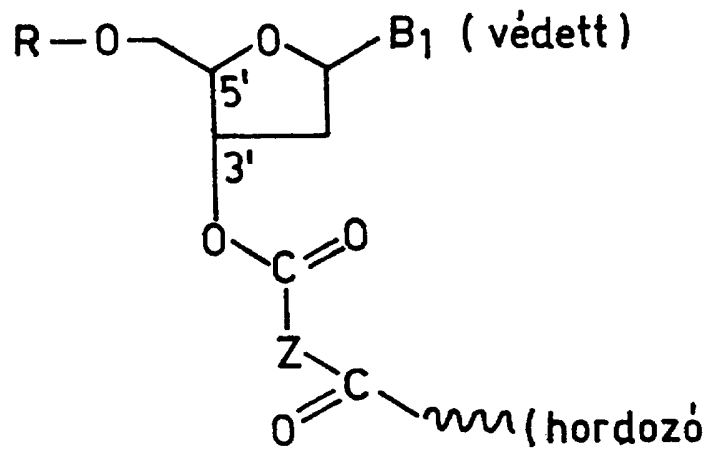
8. Az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás

vagy poli-L-lizin-származéka formájában, azzal jellemezve, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

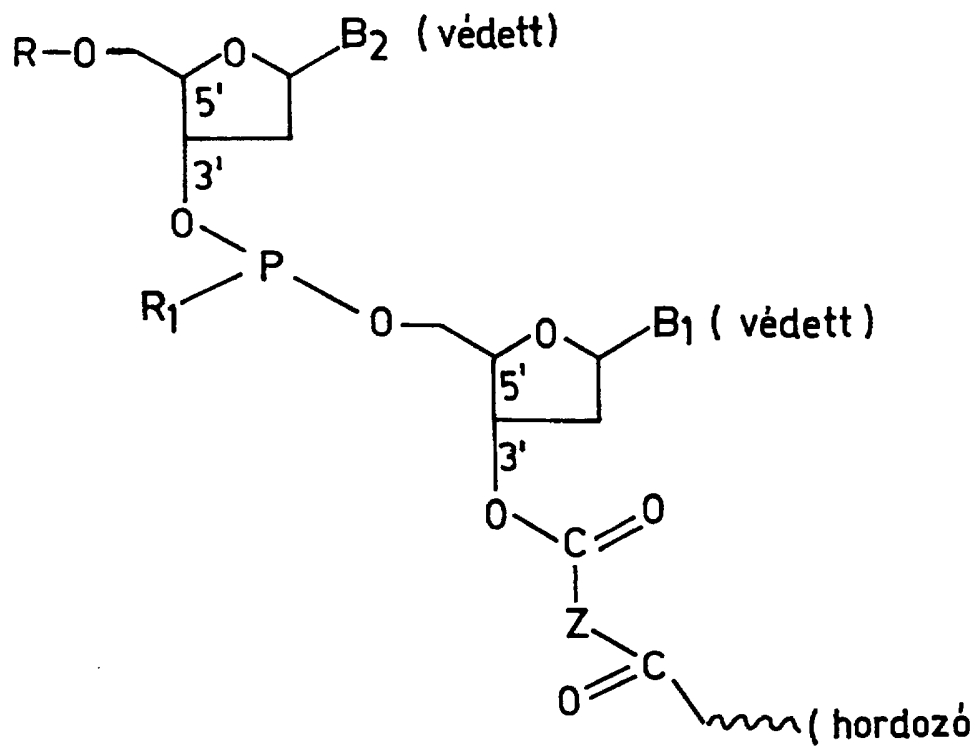
9. Eljárás gyógyszerkészítmények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy valamely, az 1. igénypont szerinti eljárással előállított (I) általános képletű oligonukleotid-szekvenciát, ahol X jelentése az 1. igénypont szerinti, a gyógyszerkészítésben szokásos vivő- és/vagy egyéb segédanyagokkal összekeverve gyógyszerkészítménnyé alakítunk.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hatóanyagként valamely, a 2–8. igénypontok bármelyike szerinti eljárással előállított oligonukleotid-szekvenciát alkalmazunk.

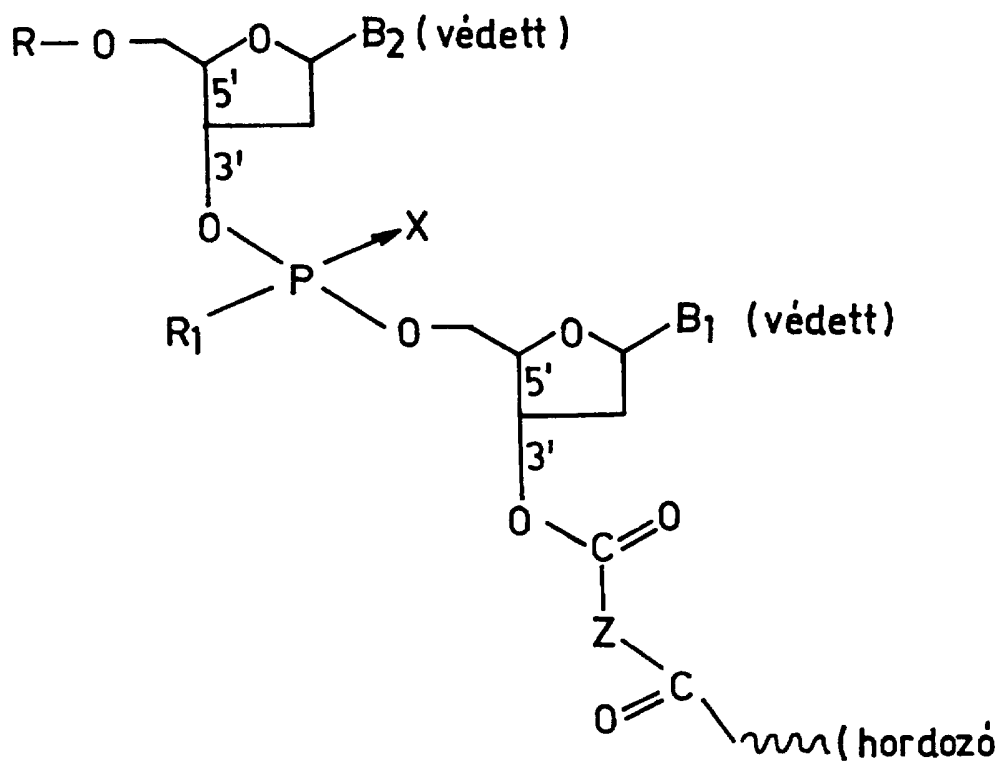
5



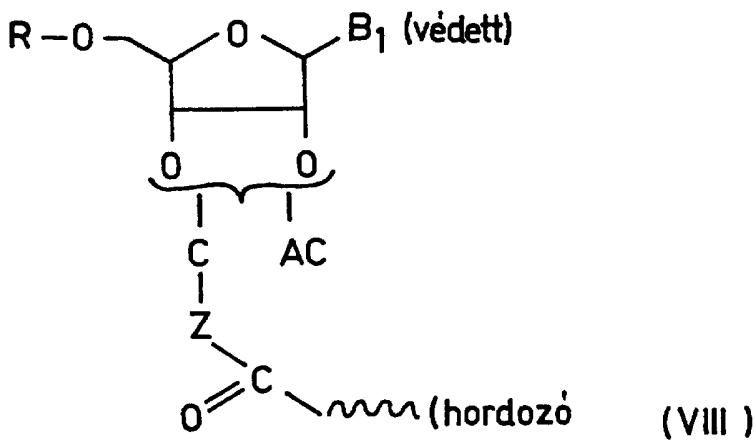
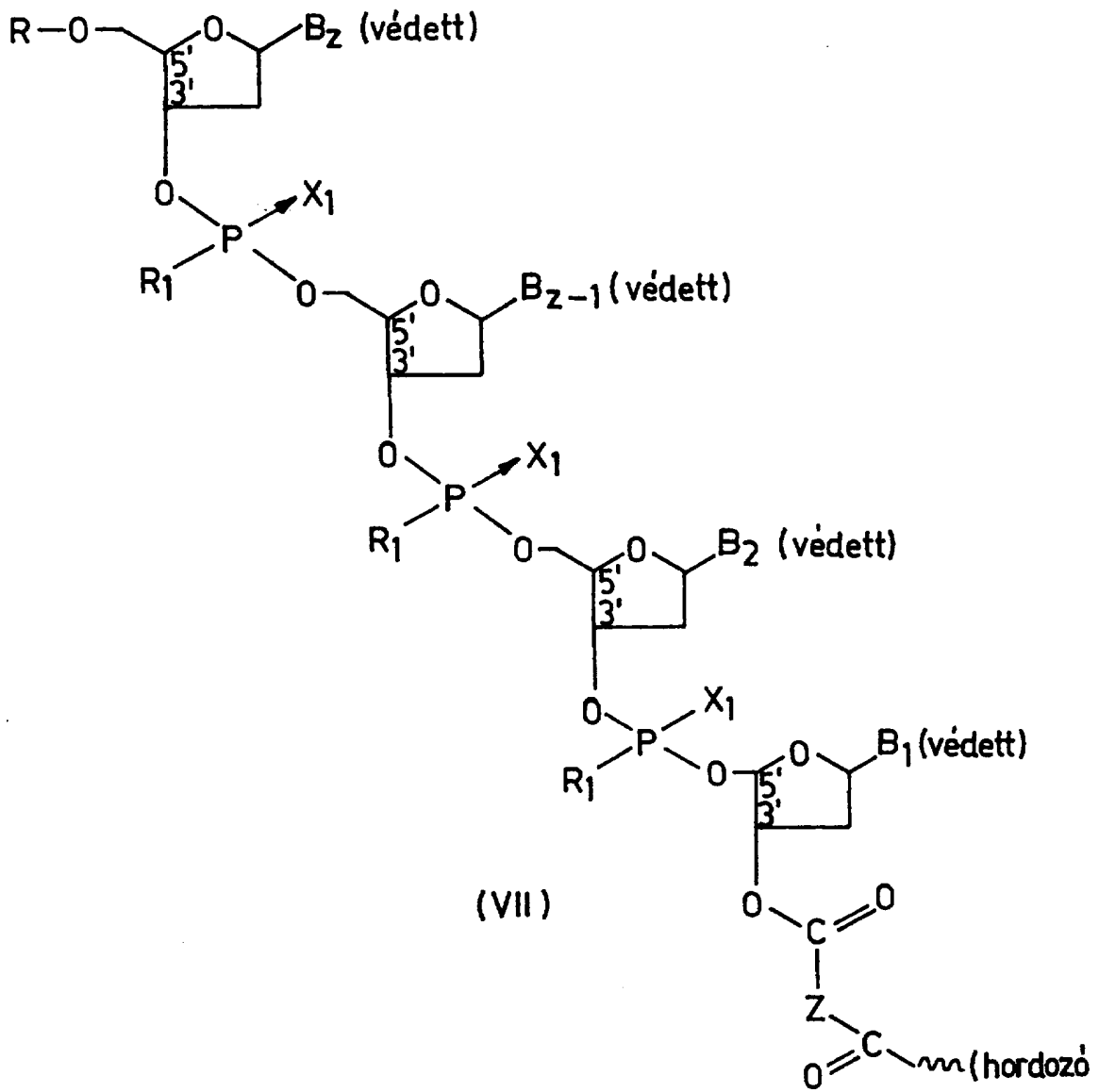


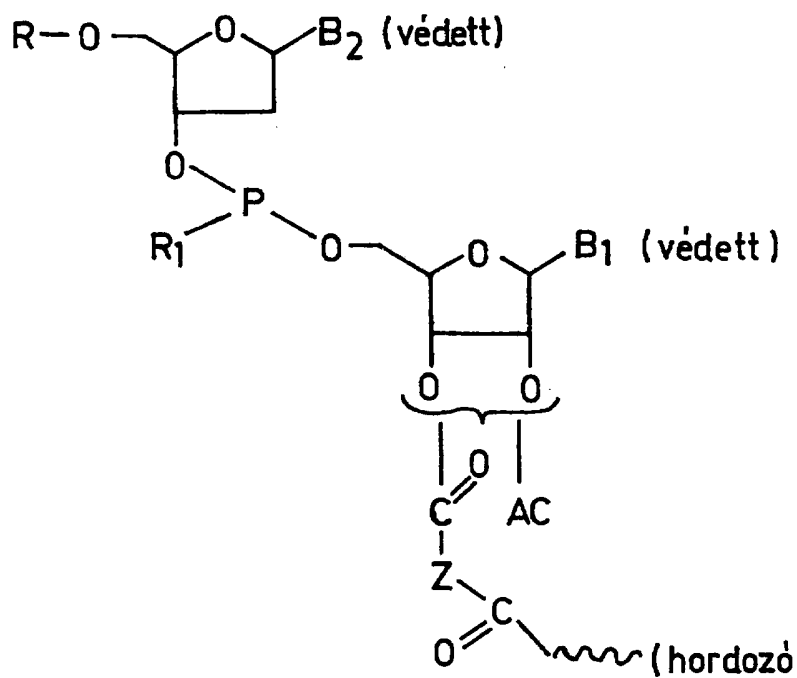


( V )

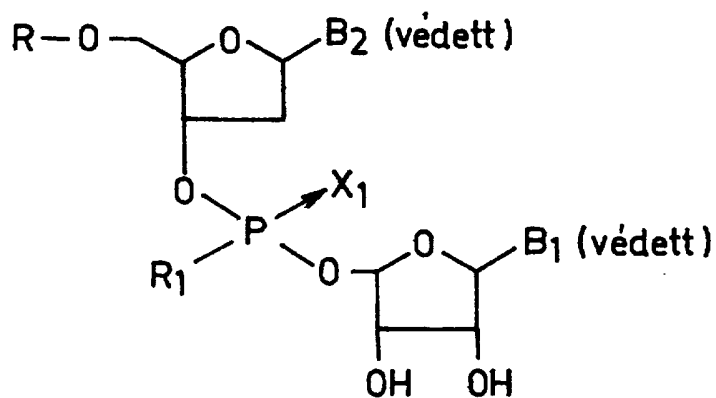


( VI )





(IX)



(X)

