



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 35 525 T2** 2007.03.08

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 007 098 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 35 525.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/04914**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 911 615.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/040058**

(86) PCT-Anmeldetag: **12.03.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **17.09.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.06.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **09.08.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.03.2007**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 48/00** (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

40738 P	12.03.1997	US
846417	30.04.1997	US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:

Idera Pharmaceuticals, Inc., Cambridge, Mass., US

(72) Erfinder:

**ZHANG, Ruiwen, Birmingham, AL 35244, US;
AGRAWAL, Sudhir, Shrewsbury, MA 01545, US**

(74) Vertreter:

**GRUND Intellectual Property Group, 80802
München**

(54) Bezeichnung: **VERMINDERUNGSREGULATION DER GENEXPRESSION DURCH KOLOREKTALE VERABREI-
CHUNG VON SYNTHETISCHEN OLIGONUKLEOTIDEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**Hintergrund der Erfindung**

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Kontrolle der Genexpression. Genauer gesagt, bezieht sich diese Erfindung auf die Verwendung von synthetischen Oligonukleotiden, um die Expression eines Gens in einem Tier herunterzuregulieren.

[0002] Das Potential für die Entwicklung eines Antisense Oligonukleotide therapeutischen Ansatzes wurde zuerst in drei Artikeln, die 1977 und 1978 publiziert wurden, vorgeschlagen. Paterson et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1977) 74: 4370-4374) offenbart, dass zellfreie Translation von mRNA durch die Bindung eines Oligonukleotids, das zu der mRNA komplementär ist, gehemmt werden kann. Zamcnik et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1978) 75: 280-284 und 285-288) offenbart, dass ein 13mer synthetisches Oligonukleotid, das zu einem Teil des Rous Sarcoma Virus (RSV) Genoms komplementär ist, RSV Replikation in infizierten Hühner Fibroblasten hemmt und RSV vermittelte Transformation von primären Hühner Fibroblasten in maligne Sarcoma Zellen hemmt.

[0003] Diese frühen Indikationen, dass synthetische Oligonukleotide verwendet werden können, um Virus Verbreitung und Neoplasien zu hemmen, wurden gefolgt von der Verwendung synthetischer Oligonukleotide, um eine breite Vielzahl von Viren, wie HIV (siehe z.B. U.S. Patent Nr. 4,806,463); Influenza (siehe z.B. Leiter et al. (1990) (Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87: 3430-3434); Vesicular Stomatitis Virus (siehe z.B. Agris et al. (1986) Biochem. 25: 6268-6275); Herpes Simplex (siehe z.B. Gao et al. (1990) Antimicrob. Agents Chem. 34: 808-812); SV40 (siehe z.B. Birg et al. (1990) (Nucleic Acids Res. 18: 2901-2908); und humanes Papilloma Virus (siehe z.B. Storey et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 4109-4114) zu hemmen. Eine Übersicht über die Verwendung synthetischer Oligonukleotide und ihrer Analoge als antivirale Agentien wurden ausgiebig durch Agrawal (Trends in Biotech. (1992) 10: 152-158) geliefert.

[0004] Zusätzlich wurden synthetische Oligonukleotide verwendet, um eine Vielzahl von nicht viralen Pathogenen zu hemmen, wie auch um selektive die Expression von bestimmten zellulären Genen zu hemmen. Somit wurde die Verwendbarkeit von synthetischen Oligonukleotiden als Agenzien zur Hemmung der Virus Verbreitung, der Verbreitung von nicht-viralen Pathogenen und selektiven Expression von nicht zellulären Genen gut belegt.

[0005] Verbesserte Oligonukleotide wurden kürzlich entwickelt, die eine größere Wirksamkeit aufweisen bei der Hemmung solcher Viren, Pathogene und selektiver Genexpression. Einige dieser Oligonukleotide mit Modifikationen in ihren Internukleotid Verbindungen erwiesen sich als wirksamer als ihre nicht unmodifizierten Gegenstücke. Zum Beispiel lehrt Agrawal et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1988) 85: 7079-7083), dass Oligonukleotid Phosphorothioate und bestimmte Oligonukleotid Phosphoroamidate wirksamer bei der Inhibierung von HIV 1 sind als konventionelle Phosphodiester verbundenen Oligodeoxyukleotide. Agrawal et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1989) 86: 7790-7794) offenbart den Vorteil von Oligonukleotid Phosphorothioaten bei der Hemmung von HIV-1 bei früh und chronisch infizierten Zellen.

[0006] Zusätzlich wurden chimäre Oligonukleotide mit mehr als einem Typ von Internukleotid Verbindung innerhalb des Oligonukleotids entwickelt. Pederson et al. (U.S. Patent Nr. 5,149,797 und 5,220,007) offenbart chimäre Oligonukleotide mit einer Oligonukleotid Phosphodiester oder Oligonukleotid Phosphorothioat Kernsequenz flankiert durch Nukleotid Methylphosphonate oder Phosphoramidate. Furdon et al. (Nucleic Acids Res. (1989) 17: 9193-9204) offenbart chimäre Oligonukleotide mit Bereichen von Oligonukleotid Phosphodiestern zusätzlich zu entweder Oligonukleotid Phosphorothioat oder Methylphosphonat Bereichen. Quartin et al. (Nucleic Acids Res. (1989) 17: 7523-7562) offenbart chimäre Oligonukleotide mit Bereichen aus Oligonukleotid Phosphodiestern und Oligonukleotid Methylphosphonaten, Inoue et al. (FEBS Lett. (1987) 215: 237-250) offenbart chimäre Oligonukleotide mit Bereichen aus Deoxyribonukleotiden und 2'-O-Methyl-Ribonukleotiden.

[0007] Viele dieser modifizierten Oligonukleotide trugen bei die potentielle Wirksamkeit des Antisense Oligonukleotid therapeutischen Ansatzes zu verbessern. Jedoch, bestimmte Defizite sind in den bekannten Oligonukleotide vorhanden, und diese Defizite können die Wirksamkeit solcher Oligonukleotide als therapeutische Agenzien begrenzen. Zum Beispiel lehrt Wickstrom (J. Biochem. Biophys. Meth. (1986) 13: 97-102), dass Oligonukleotid Phosphodiester für Nuklease vermittelten Abbau empfänglich sind, wodurch ihre Bioverfügbarkeit in vivo begrenzt wird. Agarawal et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1990) 87: 1401-1405) lehrt, dass Oligonukleotid Phosphoramidate oder Methylphosphonate, wenn sie an RNA hybridisiert sind, RNase H nicht aktivieren, wobei deren Aktivierung wichtig sein kann für die Funktion der Antisense Oligonukleotide. Somit gibt es

einen Bedarf für Verfahren zur Kontrolle der Genexpression, die Oligonukleotide mit verbesserten therapeutischen Eigenschaften verwenden.

[0008] Zahlreich Berichte wurden veröffentlicht bezüglich der Entwicklung von Phosphorothioat verbundenen Oligonukleotiden als potentielle anti-AIDS therapeutische Agenzien. Obgleich ausgiebige Studien der chemischen und molekularen Mechanismen der Oligonukleotide den potentiellen Wert dieser neuartigen therapeutischen Strategie belegten, ist wenig bekannt über die Pharmakokinetiken und den Metabolismus dieser Verbindungen in vivo.

[0009] Zahlreiche vorläufige Studien bezüglich dieses Themas wurden veröffentlicht. Agrawal et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1991) 88: 7595-7599) beschreibt die intravenöse und intraperitoneale Verabreichung an Mäuse eines 20mer Phosphorothioat verbundenen Oligonukleotids. In dieser Studie wurden ungefähr 30% der verabreichten Dosis in dem Urin über die ersten 24 Stunden ausgeschieden mit Anhäufung vorzugsweise in der Leber und Niere. Die Plasma Halbwertszeiten reichten von ungefähr 1 Stunde ($t_{1/2\alpha}$) bis beziehungsweise 40 Stunden ($t_{1/2\beta}$). Ähnliche Ergebnisse wurden in nachfolgenden Studien berichtet (Iversen (1991) Anti-Cancer Drug Design 6: 531-538; Iversen (1994) Antisense Res. Devel. 4: 43-52); und Sands (1994) Mol. Pharm. 45: 932-943). Jedoch können Stabilitätsprobleme auftreten, wenn die Oligonukleotide intravenös und intraperitoneal verabreicht werden. Vor kurzer Zeit durchgeführte Studien belegten, dass zwei Hybrid Oligonukleotide, die zwei End-geschützte [^{35}S]-radioaktiv markierte Analoge eines 25mer Oligonukleotid Phosphorothioats, eines enthaltend Segmente von 2'-O-Methyloligoribonukleotid Phosphorothioaten an beiden 3'- und 5'-Termini (MBO 1) und eines anderen enthaltend Methyl Phosphonat Verbindungen an beiden 3'- und 5'-Termini (MBO 2) eine enterohepatische Zirkulation in Ratten nach i.v. Bolus Verabreichung aufwiesen, mit einer signifikant besseren in vivo Stabilität als das Oligonukleotid Phosphorothioat (Zhang et al. (1995) Biochem. Pharmacol. 49: 929-939; Zhang et al. (1995) Biochem. Pharmacol. 50: 571-576; und Zhang et al. (1996) J. Pharm. Exp. Ther. 278: 971-979). Hybrid Oligonukleotide wurden auch oral an Ratten verabreicht bei geringerem Abbau (Zhang et al. (1995) Biochem. Pharm. 50: 545-556).

[0010] WO 94/17093 offenbart ein Oligonukleotid Analog umfassend wenigstens ein Ribonukleotid Alkylphosphonat oder Alkylphosphonothioate. Dieses Analog ist vorzugsweise 2 bis 60 Nukleotide lang und besitzt wenigstens ein Ribonukleotid substituiert an der 2' Position seiner Ribose Gruppe. Offenbart sind auch therapeutische Formulierung umfassend dieses Oligonukleotid Analog, Verfahren zum Hemmen der Expression eines Gens aus einem Virus, pathogenen Organismus, oder einer Zelle, wobei deren Expression mit einem Krankheitszustand einhergeht, und Verfahren zum Behandeln eines Säugers, der mit einem Virus oder pathogenen Organismus infiziert ist, oder unter einer krankhaften Störung leidet, die aus der Expression eines zellulären Gens resultiert.

[0011] WO 96/12497 offenbart ein Verfahren zum Herunterregulieren der Expression eines Gens in einem Tier, wobei eine pharmalogische Formulierung umfassend ein Oligonukleotid, das komplementär ist zu dem Gen, oral an ein Tier verabreicht wird. Das verabreichte Oligonukleotid besitzt nicht Phosphodiester Internukleotid Verbindungen und schließt ein wenigstens ein 2'-substituiertes Ribonukleotid, wobei das Oligonukleotid die Expression eines Produktes des Gens hemmt, wodurch die Expression des Gens herunterreguliert wird.

[0012] WO 97/05267 offenbart eine Zusammensetzung zum Verabreichen eines Polynukleotids an mukosale, neurale oder andere Zellen umfassend ein GN1 bindendes Protein und ein Polynukleotid in Assoziation mit dem bindenden Protein; und ein Verfahren zum Modellierung der Immunität umfassend die Verabreichung der Zusammensetzung an ein Tier und Exprimieren des Polynukleotids, wobei das Tier eine Immunantwort gegen das Produkt des Polynukleotids erzeugt. WO 97/05267 offenbart auch ein Verfahren für die Gentherapie umfassend die Verabreichung eines GM1 bindenden Proteins und eines funktionalen Polynukleotids an ein Tier und Exprimieren des Polynukleotids in dem Tier, wobei die Funktion des Polynukleotids dem Tier einen therapeutischen Effekt vermittelt.

[0013] Jedoch verbleicht immer noch ein Bedarf für wirksamere therapeutische Verfahren zum Herunterregulieren der Expression von Genen zu entwickeln, die leicht manipuliert werden können, dass sie für das zu behandelnde Tier und die zu behandelnde Kondition, und für das anzuzielende Gen passen.

[0014] Vorzugsweise sollten diese Verfahren einfach, schmerzlos und genau bei der Einwirkung auf das Zielgen sein.

Zusammenfassung der Erfindung

[0015] Die vorliegende Erfindung stellt eine pharmazeutische Formulierung zur Verfügung umfassend ein Oligonukleotid von ungefähr 12 bis ungefähr 50 Nukleotiden, das Nicht-Phosphodiester Internukleotid Verbindungen besitzt und komplementär zu einem angezielten Gen ist, für die kolorektale Verabreichung an einen Säuger, wobei das Oligonukleotid 3' und 5' Termini besitzt, und ferner wenigstens ein 2'-substituiertes Ribonukleotid an dem 5' Terminus, an dem 3' Terminus oder an dem 5' Terminus und dem 3' Terminus umfasst.

[0016] In einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung die Verwendung eines Oligonukleotids bereit von ungefähr 15 bis 25 Nukleotiden und umfassend Nicht-Phosphodiester Internukleotid Verbindungen für die Herstellung einer pharmazeutischen Formulierung für kolorektale Verabreichung für die Behandlung von Virusinfektionen, Infektionen durch pathogene Organismen, oder Krankheiten oder Funktionsstörungen, die aus abnormaler Genexpression oder aus der Expression eines abnormalen Genproduktes resultieren, wobei das Oligonukleotid 3' und 5' Termini besitzt, und ferner wenigstens ein 2'-substituiertes Ribonukleotid an dem 5' Terminus, an dem 3' Terminus oder an dem 5' Terminus und dem 3' Terminus umfasst.

[0017] Es wurde entdeckt, dass bestimmte endmodifizierte Oligonukleotide in vivo relativ stabil sind nach kolorektaler Verabreichung an ein Tier, und dass diese Moleküle erfolgreich von dem intestinalen Trakt absorbiert werden, und an zahlreiche Körpergewebe unter geringem Abbau verteilt werden. Somit umgeht diese Form der Verabreichung die Schwierigkeiten, die während oraler, intravenöser und anderer Arten der in vivo Verabreichung auftreten können. Diese Entdeckung wurde benützt, um die vorliegende Erfindung zu entwickeln, die ein Verfahren ist, die Expression eines Gens in einem Tier herunterzuregulieren.

[0018] Dieses Verfahren ist auch ein Mittel, die Funktion zahlreicher Gene in einem Tier zu untersuchen, einschließlich derer, die für die Entwicklung eines Tieres essentiell sind. Gegenwärtig kann Genfunktion nur untersucht werden durch die arbeitsintensive Aufgabe, ein „knock out“ Tier, wie eine Maus, herzustellen. Diese Aufgabe ist schwierig, benötigt viel Zeit und kann nicht für Gene durchgeführt werden, die für die Entwicklung eines Tieres essentiell sind, da der „knock out“ einen lethalen Phänotyp produzieren würde. Die vorliegende Erfindung überwindet die Nachteile dieses Modells.

[0019] Bei der Verwendung der Erfindung wird eine pharmazeutische Formulierung enthaltend ein Oligonukleotid, das komplementär zu dem angezielten Gen ist, kolorektal verabreicht in einem pharmazeutisch verträglichen Träger an das Tier, das das Gen enthält. Das Oligonukleotid hemmt die Expression des Gens, wodurch seine Expression herunterreguliert wird.

[0020] Für Zwecke dieser Erfindung, soll der Begriff „Tier“ verstanden werden, Menschen wie auch andere Säuger, wie auch Reptilien, Amphibien, und Insekten zu umfassen. Der Begriff „kolorektale Verabreichung“ oder „rektale Verabreichung“ oder „kolorektal verabreicht“ bezieht sich auf die Bereitstellung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Formulierung für jeden Teil des Dickdarms über chirurgische Implantation, anale Verabreichung, oder jede andere Weise der Platzierung darin.

[0021] Das verabreichte Oligonukleotid besitzt nicht-Phosphodiester Bindungen. Wie hier verwendet, soll der Begriff „Oligonukleotid“ verstanden werden, Polymere von zwei oder mehr Nukleotiden oder Nukleotidanalogen einzuschließen, die über 5' zu 3' Internukleotid Bindungen verbunden sind, die jede Bindung einschließen können, die in der Antisense Technik bekannt ist. Solche Moleküle haben einen 3' Terminus und einen 5' Terminus.

[0022] Der Begriff „Nicht Phosphodiester verbundenes Oligonukleotid“, wie hier verwendet, ist ein Oligonukleotid, in dem all seine Nukleotide über eine synthetische Verbindung kovalent verbunden sind, d.h. eine Bindung, die keine Phosphodiester Bindung ist, zwischen dem 5' Ende eines Nukleotids und dem 3' Ende eines anderen Nukleotids, bei dem das 5' Nukleotid Phosphat mit jeder Anzahl von chemischen Gruppen ersetzt wurde. Bevorzugte synthetische Bindungen schließen ein Alkylphosphonate, Phosphorothioate, Phosphorodithioate, Alkylphosphonothioate, Phosphoramidate, Phosphoramidite, Phosphatester, Carbamate, Carbonate, Phosphattriester, Acetamidate, und Caboxymethylester. In einer Ausführungsform der Erfindung, sind alle Nukleotide, die das Oligonukleotid umfasst, über Phosphorothioat und/oder Phosphorodithioat Bindungen verbunden, und in einer speziellen Ausführungsform sind die Nukleotide alle über Phosphorothioat verbunden.

[0023] In einigen erfindungsgemäßen Ausführungsformen werden die verabreichten Oligonukleotide weiter modifiziert. Wie hier verwendet, umfasst der Begriff „modifiziertes Oligonukleotid“ Oligonukleotide mit modifizierter(n) Nukleinsäure(n), Base(n), und/oder Zucker(n), die anders als die sind, die in der Natur gefunden wer-

den. Zum Beispiel, ist ein 3' und 5' substituiertes Oligonukleotid ein Oligonukleotid mit einem Zucker, der an beiden sein 3' und 5' Positionen angebracht ist an ein chemischen Gruppe, die anders als ein Hydroxyl Gruppe (an seiner 3' Position) und als eine Phosphat Gruppe (an seiner 5' Position) ist.

[0024] Ein modifiziertes Oligonukleotid kann auch eines sein mit hinzugefügten Substituenten wie Diaminen, Cholesteryl, oder anderen lipophilen Gruppen, oder eine gecappte Spezies. Zusätzlich werden auch unoxidierte oder partiell oxidierte Oligonukleotide mit einer Substitution in einem nicht verbrückenden Sauerstoff pro Nukleotid in dem Molekül auch als modifizierte Oligonukleotide betrachtet. Auch als modifizierte Oligonukleotide werden betrachtet Oligonukleotide mit Nuklease Resistenz verleihenden sperrigen Substituenten an ihren 3' und/oder 5' Ende(n) und zahlreiche andere strukturelle Modifikationen, die in vivo ohne menschlichen Eingriff nicht auftreten, wer hier auch als modifiziert betrachtet.

[0025] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung schließen die verabreichten Oligonukleotide wenigstens ein 2' substituiertes Ribonukleotid an seinem 3' Terminus oder 5' Terminus ein.

[0026] Für Zwecke der Erfindung bezieht sich der Begriff „2' substituiertes Oligonukleotid“ auf ein Oligonukleotid mit einem Zucker, der an eine chemische Gruppe angefügt ist, an seiner 2' Position, die nicht eine Hydroxyl Gruppe ist. Das 2'-OH des Ribose Moleküls kann substituiert werden mit -O-niedrigem Alkyl enthaltend 1-6 Kohlenstoffatome, Aryl oder substituiertes Aryl oder Alkyl mit 2-6 Kohlenstoff, z.B., 2'-O-Alkyl, 2'-O-Aryl, 2'-O-Alkyl (wie ein 2'-O-Methyl), 2'-Halo, oder 2'-Amino, aber nicht mit 2'-H, wobei Allyl, Aryl, oder Alkyl Gruppen unsubstituiert oder substituiert sein können, z.B. mit Halo, Hydroxy, Trifluoromethyl, Cyano, Nitro, Acyl, Acyloxy, Alkoxy, Alkoxy, Carboxyl, Carbalkoxyl oder Aminogruppen.

[0027] In einigen Ausführungsformen sind alle bis auf vier oder fünf Nukleotide an dem 5' oder 3' Terminus des Oligonukleotids 2' substituierte Ribonukleotide. In anderen Ausführungsformen besitzt das Oligonukleotid wenigstens ein 2' substituiertes Ribonukleotid an beiden seinen 3' und 5' Termini, und in noch weiteren Ausführungsformen, ist das Oligonukleotid zusammengesetzt aus 2' substituierten Ribonukleotiden an allen Positionen mit der Ausnahme von wenigstens vier oder fünf zusammenhängenden Deoxyribonukleotid Nukleotiden an irgendeiner inneren Position. Ein weiterer Aspekt der Erfindung schließt ein die Verabreichung eines Oligonukleotids, das zusammengesetzt ist aus Nukleotiden, die all 2' substituierte Ribonukleotide sind. Bestimmte Ausführungsformen schließen Oligonukleotide ein mit einem 2'-O-Alkyl-Ribonukleotid wie einem 2'-O Methyl.

[0028] In anderen Ausführungsformen besitzt das Oligonukleotid, das nützlich in der Erfindung ist, wenigstens ein Methylphosphonat Deoxyribonukleotid an seinen 3' und 5' Termini. In einigen bevorzugten Ausführungsformen besitzt das Oligonukleotid wenigstens zwei Methylphosphonat Deoxynukleotide an dem 3' Terminus und an dem 5' Terminus. In bestimmten Ausführungsformen umfasst diese Oligonukleotid Phosphorothioat Internukleotid Verbindungen.

[0029] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung, besitzt das verabreichte Oligonukleotid wenigstens ein Deoxyribonukleotid, und in einer bevorzugten Ausführungsform, besitzt das Oligonukleotid wenigstens vier oder fünf zusammenhängende Deoxyribonukleotide, die in der Lage sind RNase H zu aktivieren.

[0030] Das verabreichte Oligonukleotid ist komplementär zu einem Gen eines Virus, pathogenen Organismus, oder eines zellulären Gens in einigen Ausführungsformen der Erfindung. In einigen Ausführungsformen ist das Oligonukleotid komplementär zu einem Gen eines Virus, der involviert ist bei AIDS, oraler oder genitaler Herpes, Papilloma Warzen, Influenza, Maul und Klauen Seuche, Gelbfieber, Windpocken, Gürtelrose, adulter T-Zell Leukämie, Burkitt's Lymphom, nasopharyngealen Karzinom oder Hepatitis. In einer besonderen Ausführungsform, ist das Oligonukleotid komplementär zu einem Gen, das für ein Protein kodiert, das mit der Alzheimer Krankheit assoziiert ist.

[0031] In noch anderen Ausführungsformen ist das Oligonukleotid komplementär zu einem Gen, das für ein Protein kodiert, das in einem Parasiten exprimiert wird, der ein parasitische Krankheit, wie Amebiasis, Chagaskrankheit, Toxoplasmosis, Pneumocytosis, Lambliasis, Kryptosporidiosis, Trichomoniasis, Malaria, Askariasis, Filariasis, Trichinose und Schistosomiasis Infektionen.

[0032] In einem anderen Aspekt stellt die Erfindung das Einbringen eines intakten Oligonukleotids in ein Tier bereit. In diesem Verfahren wird ein endgeschütztes Oligonukleotid kolorektal an das Tier verabreicht, wobei das Oligonukleotid in intakter Form in dem systemischen Plasma des Säugers für wenigstens vier Stunden nach Verabreichung vorliegt.

[0033] Wie hier verwendet, bezieht sich der Begriff „intakte Form“ auf ein verabreichtes Oligonukleotid, das vergleichsweise unabgebaut oder unverdaut ist. Dieses Oligonukleotid ist ungefähr 5 bis 50, vorzugsweise ungefähr 12 bis 35, und am bevorzugtesten 15 bis 25 Nukleotide lang.

[0034] Ein „endgeschütztes Oligonukleotid“ wird hier verwendet, um ein Oligonukleotid zu beschreiben, das an seinem 5' und/oder 3' Terminus modifiziert ist, so dass es weniger anfällig für enzymatischen Abbau durch Exonukleasen ist, als Oligonukleotide, die nicht endgeschützt sind. Jede Modifikation an dem Terminus oder den Termini eines verabreichten Oligonukleotids, die in dem Schutz vor Exonuklease resultiert, die aber nicht die Eignung eines Oligonukleotids an eine komplementäre Nukleotidsequenz zu hybridisieren hemmt, wird verstanden, als durch diesen Begriff umfasst zu sein. In einer Ausführungsform, umfasst ein endgeschütztes Oligonukleotid wenigstens ein 2'-O-Methyl-Ribonukleotid oder Methylphosphonat Deoxynukleotid an jedem Terminus. In einer anderen Ausführungsform umfasst das endgeschützte Oligonukleotid wenigstens zwei 2'-O-Methyl-Ribonukleotide oder Methylphosphonat Deoxyribonukleotide an jedem Terminus. In noch einer anderen Ausführungsform umfasst das endgeschützte Oligonukleotid wenigstens zwei 2'-O-Methyl-Ribonukleotide an jedem Terminus und umfasst ferner Phosphorothioate Internukleosid Bindungen. In noch einer anderen Ausführungsform umfasst das endgeschützte Oligonukleotid wenigstens zwei Methylphosphonat Deoxyribonukleotide an jedem Terminus und umfasst ferner Phosphorothioate Internukleotid Bindungen. In einigen Ausführungsformen umfasst das endgeschützte Oligonukleotid vier Methylphosphonat Deoxyribonukleotide an jedem Terminus.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0035] Die vorstehenden und andere Ziele der vorliegenden Erfindung, ihre zahlreichen Eigenschaften, wie auch die Erfindung selbst kann vollständiger durch die folgende Beschreibung verstanden werden, wenn sie zusammen mit den beigefügten Zeichnungen gelesen wird, bei denen:

[0036] [Fig. 1](#) eine schematische Darstellung der enterohepatischen Zirkulation der Oligonukleotide und der Verabreichung solcher Oligonukleotide durch den gastrointestinalen Trakt ist;

[0037] [Fig. 2](#) eine schematische Darstellung der chemischen Struktur des PS-Oligonukleotids und endmodifizierten MBO 1 (SEQ ID NO: 11) und MBO 2 (SEQ ID NO: 16) ist;

[0038] [Fig. 3A](#) ein HPLC Profil des radioaktiv markierten MBO 1 Standards ist;

[0039] [Fig. 3B](#) ein HPLC Profil der Radioaktivität in den Inhalten des Dickdarms einer Ratte 4 Stunden nach Verabreichung des radioaktiv markierten MBO 1 in den Dickdarm der Ratte ist;

[0040] [Fig. 3C](#) ein HPCL Profil der Radioaktivität in dem Dickdarm einer Ratte 4 Stunden nach Verabreichung des radioaktiv markierten MBO 1 in den Dickdarm der Ratte ist;

[0041] [Fig. 4](#) eine graphische Darstellung der Konzentration der MBO 1 Äquivalente im Plasma zu zahlreichen Zeitpunkten nach Verabreichung zahlreicher Dosierungen von MBO 1 in den großen Dickdarm einer Ratte ist;

[0042] [Fig. 5](#) eine graphische Darstellung der Konzentration der MBO 1 Äquivalente in ausgewählten Geweben 4 Stunden nach Verabreichung von zahlreichen Dosierungen von MBO 1 in den Dickdarm einer Ratte ist;

[0043] [Fig. 6A](#) ein HPLC Profil der Radioaktivität in dem Plasma einer Ratte 4 Stunden nach Verabreichung des radioaktiv markierten MBO 1 in den Dickdarm der Ratte ist;

[0044] [Fig. 6B](#) ein HPLC Profil der Radioaktivität in der Leber einer Ratte 4 Stunden nach Verabreichung des radioaktiv markierten MBO 1 in den Dickdarm der Ratte ist; und

[0045] [Fig. 6C](#) ein HPLC Profil der Radioaktivität in der Niere einer Ratte 4 Stunden nach Verabreichung des radioaktiv markierten MBO 1 in den Dickdarm der Ratte ist.

Eingehende Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

[0046] Die Patent und wissenschaftliche Literatur, auf die hier Bezug genommen wird, stellt das Wissen zur Verfügung, das den Fachleuten zugänglich ist.

[0047] Die vorliegende Erfindung stellt eine pharmazeutische Formulierung zur Verfügung umfassend ein Oligonukleotid von ungefähr 12 bis ungefähr 50 Nukleotiden, das Nicht-Phosphodiester Internukleotid Verbindungen besitzt und komplementär zu einem angezielten Gen ist, für die kolorektale Verabreichung an einen Säuger, wobei das Oligonukleotid 3' und 5' Termini besitzt, und ferner wenigstens ein 2'-substituiertes Ribonukleotid an dem 5' Terminus, an dem 3' Terminus oder an dem 5' Terminus und dem 3' Terminus umfasst.

[0048] In einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung die Verwendung eines Oligonukleotids bereit von ungefähr 15 bis 25 Nukleotiden und umfassend Nicht-Phosphodiester Internukleotid Verbindungen für die Herstellung einer pharmazeutischen Formulierung für kolorektale Verabreichung für die Behandlung von Virusinfektionen, Infektionen durch pathogene Organismen, oder Krankheiten oder Funktionsstörungen, die aus abnormaler Genexpression oder aus der Expression eines abnormalen Genproduktes resultieren, wobei das Oligonukleotid 3' und 5' Termini besitzt, und ferner wenigstens ein 2'-substituiertes Ribonukleotid an dem 5' Terminus, an dem 3' Terminus oder an dem 5' Terminus und dem 3' Terminus umfasst.

[0049] Es ist bekannt, dass ein synthetisches Oligonukleotid, genannt ein „Antisense Oligonukleotid“ an ein einzelsträngiges Ziel Nukleinsäuremolekül binden kann gemäß der Watson-Crick oder Hoogsteen Regel für Basenpaarung, und mittels dieses Vorgangs die Funktion des Ziels durch einen von zahlreichen Mechanismen unterbindet: durch Verhinderung der Bindung von Faktoren, die für normale Transkription, Spleißen, oder Translation benötigt werden; durch Einleiten der enzymatischen Zerstörung von mRNA durch RNase H, wenn eine zusammenhängender Bereich von Deoxyribonukleotiden in dem Oligonukleotid existiert; und/oder durch Zerstörung des Ziels über reaktive Gruppen, die unmittelbar an das Antisense Oligonukleotid angebracht sind.

[0050] Somit sind, wegen der oben beschriebenen Eigenschaften, solche Oligonukleotide therapeutisch nützlich durch ihre Fähigkeit, die Expression eines bestimmten Gens in einem Tier herunterzuregulieren, gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung.

[0051] Die Pharmakokinetiken und Faktoren, die die gastrointestinale Absorption, einschließlich der kolorektalen Absorption, der Oligonukleotide beeinflussen, sind in dem Schema, das in [Fig. 1](#) wiedergegeben ist, zusammengefasst. Kurz gesagt, wenn die Oligonukleotide oral verabreicht werden, können sie im Mageninhalt stabil sein, und ob sie über die Magenwand absorbiert werden, ist nicht klar. Wenn die verabreichten Oligonukleotide sich in den Dünndarm bewegen, kann ausgiebiger Abbau der PS-Oligonukleotide und einiger Abbau der MBOs vorkommen. Intakte Oligonukleotide (und vielleicht abgebaute Formen) werden über Pfortaderblut absorbiert und treten in die Leber ein. Die absorbierten Oligonukleotide können Metabolismus in der Leber durchlaufen (der Erstdurchtrittseffekt) und in die systemische Zirkulation eintreten. Oligonukleotide und ihrer Metabolite werden in die Gallenflüssigkeit ausgeschieden und treten in das intestinale Lumen ein und treten wieder in die enterohepatische Zirkulation ein. Oligonukleotide in der systemischen Zirkulation werden in zahlreiche Gewebe verteilt und in den Urin ausgeschieden, wie aus i.v. Verabreichung heraus ersehen wird. Wenn oral verabreichte Oligonukleotide sich in den Dickdarm bewegen, können die meisten PS-Oligonukleotide und einige MBOs als Abbauprodukte vorliegen. Im Allgemeinen treten Oligonukleotide, die über den oberen Teil des Dickdarms absorbiert werden, in die Leber ein, und Oligonukleotide, die über den unteren Teil des Dickdarms absorbiert werden, treten unmittelbar in die systemische Zirkulation ein. Die Letztgenannten werden nicht in der Leber metabolisiert und der Erstdurchtrittseffekt der Leber wird vermieden. Kolorektale Verabreichung von Oligonukleotide zieht einen Vorteil aus dieser Gelegenheit. Wenn Oligonukleotide in das Rektum verabreicht werden, treten die meisten absorbierten Oligonukleotide in die systemische Zirkulation ein. Kolorektale Verabreichung wendet die Pharmakokinetiken von Phosphorothioaten wie auch MBOs an, wodurch PS zu einer brauchbare Wahl für gastrointestinale Verabreichung gemacht wird.

[0052] Im Allgemeinen sind die folgenden Faktoren für die Entwicklung rektaler Oligonukleotid Therapeutika wichtig: 1) Stabilität der Oligonukleotide in dem gastrointestinalen Trakt; 2) Dauer der Retention der Oligonukleotide in dem gastrointestinalen Trakt; 3) die Struktur und die physikalischen und biochemischen Eigenschaften von Oligonukleotiden, z.B. Ladungen; 4) der Erstdurchtrittseffekt der Leber; 5) Ernährungs- und Wirtsstatus der gastrointestinalen und hepatischen Funktionen; und 6) Formulierungen. Die Vorteile der Verabreichung der Oligonukleotide durch rektale Verabreichung sind offensichtlich. Die langsame aber kontinuierliche Freisetzung der Oligonukleotide in die systemische Zirkulation kann die Aufnahme der Zielgewebe erhöhen. Zusätzlich vermeidet sie die hohen Plasmakonzentrationen, die mit i.v. Injektion einhergehen und reduziert das Risiko von Nebenwirkungen, die aus diesen hohen Konzentrationen resultieren. Die Oligonukleotide, die kolorektal gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren verabreicht werden, sind wenigstens 6 Nukleotide lang, sind aber vorzugsweise 6 bis 50 Nukleotide lang, wobei 15 bis 30mere am verbreitetsten sind. Sie sind zusammengesetzt aus Deoxyribonukleotiden, Ribonukleotiden, oder einer Kombination beider, wobei das 5' Ende eines Nukleotids und das 3' Ende eines anderen Nukleotids kovalent durch Phosphodiester Bindungen verbunden sind.

[0053] Die Oligonukleotide, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, können auch auf eine Vielzahl von Wegen modifiziert werden, ohne deren Fähigkeit zu beeinträchtigen, an die Zielnukleinsäure zu hybridisieren. Solche Modifikationen schließen ein, zum Beispiel, Nicht-Phosphatdiester Internukleotid Bindungen, einschließlich Alkylphosphonate, Phosphorothioate, Phosphorodithioate, Alkylphosphonothioate, Alkylphosphonate, Phosphoramidate, Phosphoramidite, Phosphatester, Carbamate, Acetamidate, Caboxymethylester, Carbonate und Phosphattriester. Besonders nützliche Oligonukleotide sind verbunden mit Phosphorothioat und/oder Phosphorodithioat Internukleosid Bindungen verbunden. Vorzugsweise werden erfindungsgemäße Oligonukleotide, die im Bereich von ungefähr 6 bis ungefähr 50 Nukleotiden Länge, und am bevorzugtesten von ungefähr 12 bis ungefähr 30 Nukleotiden Länge sind, 11 bis 29 Nicht-Phosphodiester Internukleotid Bindung besitzen.

[0054] Andere nützliche Modifikationen schließen diejenigen ein, die intern oder an dem(den) Ende(n) des Oligonukleotid Moleküls sind; und schließen ein Additionen zu dem Molekül der Internukleosid Phosphat Bindungen, wie Cholesteryl oder Diamin Verbindungen mit variierender Anzahl an Kohlenstoffresten zwischen den Aminogruppen und der terminalen Ribose, Deoxyribose und den Phosphonat Modifikationen, die spalten oder mit den gegenüberliegenden Ketten oder assoziierten Enzymen oder anderen Proteinen, die an das virale Genom binden, quervernetzen.

[0055] Beispiele für solche modifizierten Oligonukleotide schließen Oligonukleotide mit einer modifizierten Base und/Zucker ein, wie Arabinose anstatt von Ribose, oder ein 3', 5'-substituiertes Oligonukleotide mit einem Zucker, der an beiden seinen 3' und 5' Positionen an eine chemische Gruppe angebracht ist, die nicht eine Hydroxyl Gruppe (an seiner 3' Position) und nicht eine Phosphat Gruppe (an seiner 5' Position) ist. Andere modifizierte Oligonukleotide sind mit einem Nuklease Resistenz verleihenden sperrigen Substituenten an ihrem 3' und/oder 5' Ende(n) gecappt, oder besitzen eine Substitution in nicht verbrückenden Sauerstoff pro Nukleotid. Solche Modifikationen können an einigen oder allen Internukleosid Bindungen sein, wie auch an jedem oder beiden Enden des Oligonukleotids und/oder in dem Innerem des Moleküls. Oligonukleotide, die sich selbst stabilisieren, werden auch als modifizierte Oligonukleotide betrachtet, die nützlich für die erfindungsgemäßen Verfahren (Tang et al. (1993) *Nucleic Acids Res.* 20: 2729-2735) sind. Diese Oligonukleotide umfassen zwei Regionen: ein Ziel-Hybridisierungsregion; und ein selbst komplementäre Region, mit einer Oligonukleotidsequenz, die komplementär zu einer Nukleinsäuresequenz ist, die die innerhalb des sich selbst stabilisierenden Oligonukleotids ist.

[0056] Modifizierte und unmodifizierte Oligonukleotide können gemäß bekannten Verfahren hergestellt werden, die manuell oder durch einen automatisierten Synthetisierer, wie von Brown beschrieben (*A Brief History of Oligonucleotide Synthesis. Protocols for Oligonucleotides and Analogs. Methods in Molecular Biology* (1994) 20: 1-8), ausgeführt werden. Siehe auch Sonveaux „Protecting Groups in Oligonucleotide Synthesis“ in Agrawal (1994) *Methods in Molecular Biology* 26: 1-72, Agrawal et al. (1992) *Trends Biotechnol.* 10: 152-158; Uhlmann et al. (1990) *Chem. Rev.* 90: 543-583; und (1987) *Tetrahedron Lett.* 28: (31): 3539-3542.

[0057] Ein bevorzugtes Oligonukleotid, das nützlich bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ist, sind Hybridoligonukleotide enthaltend sowohl Deoxyribonukleotide als auch wenigstens ein 2' substituiertes Ribonukleotid. Für Zwecke dieser Erfindung bezeichnet der Begriff „2'-substituiert“ die Substitution des 2'-OH des Ribosemoleküls mit, z.B., 2'-O-Allyl, 2'-O-Alkyl, 2'-Halo, oder 2'-Amino, aber nicht mit 2'-H, wobei Allyl, Aryl, oder Alkyl Gruppen nicht substituiert oder substituiert sein können, z.B. mit Halo, Hydroxy, Trifluormethyl, Cyano, Nitro, Acyl, Acyloxy, Alkoxy, Carboxyl, Carbalkoxy oder Amino Gruppen. Andere bevorzugte Oligonukleotide, die nützlich bei dem erfindungsgemäßen Verfahren sind, besitzen wenigstens eine oder nur Phosphorothioat Internukleotid Bindungen.

[0058] Die Hybrid DNA/RNA Oligonukleotide, die nützlich bei dem erfindungsgemäßen Verfahren sind, widerstehen nukleolytischem Abbau, bilden stabile Duplexe mit RNA oder DNA, und aktivieren vorzugsweise RNase H, wenn sie mit RNA hybridisiert sind. Sie können zusätzlich wenigstens ein unsubstituiertes Ribonukleotid einschließen. Zum Beispiel kann ein Oligonukleotid, das nützlich bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ist, nur Deoxyribonukleotide enthalten, mit der Ausnahme eines 2' substituierten Ribonukleotids an dem 3' Terminus des Oligonukleotids. Alternativ kann das Oligonukleotid wenigstens ein substituiertes Ribonukleotid an sowohl seinen 3' als auch 5' Termini besitzen.

[0059] Eine bevorzugte Klasse von Oligonukleotiden, die nützlich bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ist, enthält mindestens vier oder mehr Deoxyribonukleotide in einem zusammenhängendem Block, um so ein aktivierendes Segment für RNase H bereitzustellen. In bestimmten Fällen, wird mehr als ein solches aktivierendes Segment an jedem Ort innerhalb des Oligonukleotids vorhanden sein. Es kann eine überwiegende Anzahl

von Deoxyribonukleotiden in Oligonukleotiden vorhanden sein, die nützlich bei dem erfindungsgemäßen Verfahren sind. Tatsächlich können solche Oligonukleotide bis auf ein, zwei, drei oder vier, Nukleotid(e) besitzen, die Deoxyribonukleotide sind. Somit reicht in einem bevorzugten Oligonukleotid mit ungefähr 6 bis ungefähr 50 Nukleotiden oder am bevorzugtesten ungefähr 12 bis ungefähr 30 Nukleotide die Anzahl der vorliegenden Deoxyribonukleotide von 1 bis ungefähr 29.

[0060] Andere nützliche Oligonukleotide können insbesondere aus wenigstens einem, zweien, vierten, oder mehr 2'-substituierten Ribonukleotid(en) an einem oder beiden Termini des Oligonukleotids bestehen. Einige Oligonukleotide, die nützlich bei dem erfindungsgemäßen Verfahren sind, besitzen nur 2'-substituierte Ribonukleotide. Das 2' substituierte Ribonukleotid(e) in dem Oligonukleotid kann an der 2' Position der Ribose enthalten einen -O- niedrigen Alkyl enthaltend 1-6 Kohlenstoffatome, Aryl oder substituiertes Aryl oder Allyl mit 2-6 Kohlenstoffatomen, z.B., 2'-O-Allyl, 2'-O-Aryl, 2'-O-Alkyl, 2'-Halo, oder 2'-Amino, aber nicht mit 2'-H, wobei Allyl, Aryl, oder Alkyl Gruppen nicht substituiert oder substituiert sein können, z.B. mit Halo, Hydroxy, Trifluormethyl, Cyano, Nitro, Acyl, Acyloxy, Alkoxy, Carboxyl, Carbalkoxyl oder Amino Gruppen. Nützliche substituierte Ribonukleotide sind 2'-Alkyle, wie 2'-O-Methyl.

[0061] Tabelle 1 führt einige repräsentative Spezies von Oligonukleotiden auf, die nützlich bei dem erfindungsgemäßen Verfahren sind. 2'-substituierte Nukleotide sind unterstrichen, und Nukleotid Methylphosphonate sind in Fettdruck.

Tabelle 1

Nr.	OLIGONUKLEOTID	SEQ	ID NO:
1	CTCTCGCACCCATCTCTCTCCTTCU		1
2	CTCTCGCACCCATCTCTCTCCTUCU		2
3	CTCTCGCACCCATCTCTCTCCUUCU		3
4	CTCTCGCACCCATCTCUCUCCUUCU		4
5	CTCTCGCACCCAUUCUCUCUCCUUCU		5
6	CTCTCGCACCCAUUCUCUCUCCUUCU		5
7	CTCTCGCACCCAUUCUCUCUCCUUCU		5
8	CUCUCGCACCCAUUCUCUCUCCUUCU		6
9	CTCTCGCACCCATCTCTCTCCTTCU		7
10	CUCTCGCACCCATCTCTCTCCTTCU		7
11	CUCUCGCACCCATCTCTCTCCUUCU		8
12	CUCUCGCACCCATCTCUCUCCUUCU		9
13	CUCUCGCACCCAUUCUCUCUCCUUCU		10
14	CUCUCGCACCCATCTCTCUCUCCUUCU		11
15	CTCTCGCACCCAUUCUCUCUCCUUCU		5
16	CUCUCGCACCCAUCTCTCTCCUUCU		12
17	CUCUCGCACCCATCTCTCTCCUUCU		13

18	<u>CUCTCGCACCCAUUCUCUCCUUCU</u>	14
19	<u>CUCTCGCACCCATCTCTCUCCUUCU</u>	15
MBO 1	<u>CUCUCGCACCCATCTCTCTCCUUCU</u>	11
MBO 2	CTCTCGCACCCATCTCTCTCCTTCT	16
20	<u>CTCTCGCACCCATCTCTCTCCTTCT</u>	17
21	<u>CUCTCGCACCCATCTCTCTCCTTCT</u>	18
22	<u>CUCUCGCACCCATCTCTCTCCTTCT</u>	19
23	<u>CUCUCGCACCCATCTCTCTCCTTCT</u>	19
24	<u>CUCUCGCACCCAUUCUCTCTCCTTCT</u>	20
25	<u>CUCUCGCACCCAUUCUCUCCTTCT</u>	21
26	CTCTCGCACCCATCTCTCTCCTTCT	17

[0062] Die Oligonukleotide, die in der Erfindung benutzt werden, sind wirksam bei der Hemmung der Expression zahlreicher Gene in Viren, pathogenen Organismen, oder bei der Hemmung der Expression zellulärer Gene. Die Fähigkeit solche Agenzien zu hemmen ist klarerweise wichtig, um eine Vielzahl von Krankheitszuständen zu behandeln. Somit besitzen Oligonukleotide gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren ein Nukleotidsequenz, die komplementär ist zu einer Nukleinsäuresequenz, die von einem Virus, einem pathogenen Organismus oder einem zellulären Gen ist.

[0063] Für Zwecke der Erfindung soll der Begriff „Oligonukleotidsequenz, die komplementär ist zu einer Nukleinsäuresequenz“ bedeuten, dass eine Oligonukleotidsequenz, die an die Ziel-Nukleinsäuresequenz unter physiologischen Bedingungen bindet, z.B., durch Watson-Crick Basenpaarung (Wechselwirkung zwischen Oligonukleotid und einzelsträngiger Nukleinsäure, wie RNA oder cDNA) oder durch Hoogsteen Basenpaarung (Wechselwirkung zwischen Oligonukleotid und doppelsträngiger Nukleinsäure) oder auf jede andere Weise einschließlich des Falls eines Oligonukleotid, das an RNA bindet, Pseudoknoten Bildung. Solche Bindung (durch Watson Crick Basenpaarung) unter physiologischen Bedingungen wird in der Praxis durch Beobachten des Interferierens mit der Funktion der Nukleinsäuresequenz gemessen. Die Nukleinsäure, zu der das Oligonukleotid komplementär ist kann genomische DNA, RNA, mRNA oder cDNA.

[0064] Die Sequenz der Nukleinsäure, zu der ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid komplementär ist, wird variieren, abhängig von dem herunterzuregulierenden Gen. In einigen Fällen wird das Zielgen oder die Nukleinsäuresequenz eine Virus Nukleinsäuresequenz seien. Die Verwendung von Antisense Oligonukleotiden, um zahlreiche Viren zu hemmen, ist wohl bekannt (ein Übersicht findet sich in Agrawal (1992) Trends in Biotech. 10: 152-158). Virale Nukleinsequenzen, die zu wirksamen Antisense Oligonukleotiden komplementär sind, wurden für viele Viren beschrieben, einschließlich des humanen Immundefizienz Virus Typ 1 (HIV-1) (U.S. Patent Nr. 4,806,463), Herpes simplex Virus (U.S. Patent Nr. 4,689,320), Influenza Virus (U.S. Patent Nr. 5,194,428), und humanes Papilloma Virus (Storey et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 4109-4114). Sequenzen, die komplementär zu irgendeiner dieser Nukleinsäuren Sequenzen sind, können verwendet werden für erfindungsgemäße Oligonukleotide, wie auch Oligonukleotid Sequenzen, die komplementär sind zu Nukleinsäuresequenzen jedes anderen Virus. Zusätzliche Viren, die bekannte Nukleinsäuresequenzen besitzen, gegen welche Antisense Oligonukleotide hergestellt werden können, schließen ein, sind aber nicht begrenzt auf, Maul und Klauen Seuche Virus (siehe Robertson et al. (1985) J. Virol. 54: 651; Harris et al. (1980) Virol. 36: 659), Gelbfiebertvirus (siehe Rice et al. (1985) Science 229: 726), Varicella-Zoster Virus (siehe Davison und Scott (1986) J. Gen. Virol. 67: 2279), Epstein-Barr Virus, Cytomegalovirus, Respiratory Syncytical Virus (RSV), und Gurken Mosaik Virus (siehe Richards et al. (1978) Virol. 89: 395).

[0065] Zum Beispiel wurde ein Oligonukleotid entworfen, das komplementär ist zu einem Teil des HIV-1 Gens, und als solches, signifikante anti-HIV Effekte besitzt (Agrawal (1992) Antisense Res. Development 2: 261-266). Das Ziel dieses Oligonukleotids erwies sich als unter zahlreichen HIV-1 Isolaten konserviert. Es ist reich an 56% G+C, wasserlöslich, und relative stabil unter physiologischen Bedingungen. Dieses Oligonukleotid bindet an ein komplementäres RNA Ziel unter physiologischen Bedingungen, wobei der T der Duplex ungefähr 56°C ist. Die antivirale Aktivität dieses Oligonukleotids wurde in zahlreichen Modellen getestet, einschließlich akut

und chronisch infizierter CEM Zellen, Langzeit Kulturen, die in vivo Bedingungen nachahmen, humane peripheren Blutlymphozyten und Macrophagen, und Isolaten aus HIV-1 infizierten Patienten (Liszewicz et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1992) 89: 11209-11213); Liszewicz et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1993) 90: 3860-3864); Liszewicz et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1994) 91: 7942-7946); Agrawal et al. (J. Ther. Biotech) im Druck).

[0066] Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide können alternativ eine Oligonukleotid Sequenz haben, die komplementär ist zur einer Nukleinsäuresequenz eines pathogenen Organismus. Die Nukleinsäuresequenz vieler pathogener Organismen wurde beschrieben, einschließlich des Malaria Organismus, *Plasmodium falciparum*, und vieler pathogener Bakterien. Oligonukleotid Sequenzen, die komplementär sind zu Nukleinsäuresequenzen irgendeines solchen pathogenen Organismus können in erfindungsgemäßen Oligonukleotiden verwendet werden. Beispiele von pathogenen Eukaryoten mit bekannten Nukleinsäuresequenzen, gegen die Antisense Oligonukleotide hergestellt werden können, schließen ein *Trypanosoma brucei gambiense* und *Leishmania* (siehe Campbell et al., *Nature* 311: 350 (1984)), *Fasciola hepatica* (siehe Zurita et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2340 (1987)).

[0067] Antifungale Oligonukleotide können hergestellt werden unter Verwendung einer Ziel Hybridisierungsregion mit einer Oligonukleotidsequenz, die komplementär ist zu einer Nukleinsäuresequenz aus, z.B., dem Chitin Synthetase Gen, und antibakterielle Oligonukleotide können verwendet werden unter Verwendung von, z.B., dem Alanin Racemase Gen. Unter den Pilzkrankheiten, die durch das erfindungsgemäße Behandlungsverfahren behandelbar sein können sind Candidase, Histoplasmose, *Cryptococcocis*, Blastomycosis, Aspergillose, Sporotrichose, Chromomycose, Dermatophytose und Coccidioidomycose. Das Verfahren könnte auch verwendet werden, um rickettsiale Erkrankungen (z.B. Typhus, Rocky Mountain Spotted Fever), wie auch sexuell übertragenen Krankheiten verursacht durch *Chlamydia trachomatis* oder Lymphogranuloma venerum zu behandeln. Eine Vielzahl von parasitischen Krankheiten können durch das erfindungsgemäße Verfahren behandelt werden, einschließlich Amebiasis, Chagaskrankheit, Toxoplasmosis, Pneumocytosis, Lambliasis, Kryptosporidiosis, Trichomoniasis und *Pneumocystis carini pneumonia*; auch Wurm (helminthische) Krankheiten, wie Askariasis, Filariasis, Trichinose und Schistosomiasis und Nematoden und Cestoden Infektionen. Malaria kann durch das erfindungsgemäße Verfahren behandelt werden unabhängig davon, ob sie durch *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, oder *P. malariae* verursacht wird.

[0068] Die oben identifizierten Infektionskrankheiten können alle durch das erfindungsgemäße Behandlungsverfahren behandelt werden, da die infektiösen Agenzien für diese Krankheiten bekannt sind und somit erfindungsgemäße Oligonukleotide hergestellt werden können mit einer Oligonukleotidsequenz, die komplementär ist zu einer Nukleinsäuresequenz, die eine essentielle Nukleinsäuresequenz ist für die Verbreitung des infektiösen Agens, wie ein essentielles Gen.

[0069] Andere Krankheitszustände und Konditionen, die durch das erfindungsgemäße Verfahren behandelbar sein können, sind diejenigen, welche aus einer abnormalen Expression oder eines abnormalen Produktes eines zellulären Gens resultieren. Diese Konditionen können behandelt werden durch Verabreichung von erfindungsgemäßen Oligonukleotiden, und wurden zuvor in dieser Offenbarung diskutiert.

[0070] Andere erfindungsgemäße Oligonukleotide können eine Nukleotidsequenz haben, die komplementär ist zu einem zellulären Gen oder Gentranskript, deren abnormale Expression oder deren abnormales Produkt in einem Krankheitszustand resultiert. Die Nukleinsäuresequenzen von zahlreichen solchen zellulären Genen ist beschrieben worden, einschließlich des Prion Proteins (Stahl et al. (1991) *FASEB J.* 5: 2799-2807), des Amyloidartigen Proteins, das mit der Alzheimer Krankheit assoziiert ist (U.S. Patent Nr. 5,015,570), und zahlreiche wohl bekannte Onkogene und Protoonkogene, wie c-myc, c-myc, c-abl und n-ras. Zusätzlich können Oligonukleotide, die die Synthese von strukturellen Proteinen oder Enzymen, die weitestgehend oder ausschließlich bei der Spermatogenese, Spermiumbeweglichkeit, der Bindung des Spermiums an das Ei oder jedem anderen Schritt, die die Lebensfähigkeit des Spermiums beeinflusst, involviert sind, als Verhütungsmittel verwendet werden. In ähnlicher Weise können Verhütungsmittel für Frauen Oligonukleotide sein, die Proteine oder Enzyme hemmen, die involviert sind bei der Ovulation, Befruchtung, Einnistung oder bei der Biosynthese von Hormonen, die in diesen Vorgängen involviert sind.

[0071] Bluthochdruck kann durch Oligonukleotide kontrolliert werden, die die Synthese von Enzym, das Angiotensin umwandelt oder verwandten Enzymen, herunterreguliert. Plättchen Aggregation kann durch Unterdrückung der Synthese von Enzymen kontrolliert werden, die für die Synthese von Thromboxan A2 notwendig sind, für die Verwendung bei myokardialen und zerebralen Blutkreislaufstörungen, Infarkten, Arteriosklerose, Embolien und Thrombose. Ablagerung von Cholesterin in der arteriellen Wand kann gehemmt werden durch

Unterdrückung der Synthese von Fettsäure Coenzym A: Cholesterin Acyl Transferase bei Arteriosklerose. Hemmung der Synthese von Cholinephosphotransferase kann nützlich bei der Hypolipidämie sein.

[0072] Es gibt zahlreiche neurale Störungen, bei denen Hybridisierungsarrest verwendet werden kann, um nachteilige Effekte der Störung zu reduzieren oder eliminieren. Zum Beispiel kann die Unterdrückung der Synthese von Monoaminoxidase bei der Parkinsonschen Krankheit verwendet werden. Unterdrückung der Catechol O-Methyl Transferase kann verwendet werden, um Depressionen zu behandeln; und Unterdrückung der Indol N-Methyl Transferase kann verwendet werden bei der Behandlung von Schizophrenie.

[0073] Unterdrückung ausgewählter Enzyme in der Arachidonsäure Kaskade, die zu Prostaglandinen und Leukotrienen führt, kann nützlich bei der Kontrolle der Plättchen Aggregation, Allergie, Entzündung, Schmerz und Asthma sein.

[0074] Unterdrückung des Proteins, das durch das Mutidrug Resistance (mdr-1) Gen exprimiert wird, das für die Entwicklung der Resistenz von Tumoren gegen eine Vielzahl von Antikrebs Medikamenten verantwortlich sein kann und ein wesentlich Hindernis bei der Chemotherapie ist, kann sich als vorteilhaft bei der Behandlung von Krebs erweisen. Oligonukleotidsequenzen, die komplementär zu den Nukleinsäuresequenzen irgendeines dieser Gene sind, können verwendet werden für erfindungsgemäße Oligonukleotide, wie auch Oligonukleotidsequenzen, die komplementär zur irgendeinem anderem zellulären Gentranskript sind, deren abnormale Expression oder deren abnormales Produkt zu einem Krankheitszustand führt.

[0075] Die hier beschriebenen Oligonukleotide werden kolorektal verabreicht an das tierische Subjekt in der Form von therapeutischen pharmazeutischen Formulierungen, die wirksam für die Behandlung von Virusinfektionen, Infektionen durch pathogenen Organismen, oder Krankheiten oder Störungen sind, die aus abnormaler Genexpression oder aus der Expression eines abnormalen Genprodukts resultieren und geeignet sind für die kolorektale Verabreichung. In einigen Aspekten des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die Oligonukleotide in Verbindung mit anderen therapeutischen Agenzien verabreicht, z.B. AZT im Fall von AIDS.

[0076] Die erfindungsgemäße therapeutische pharmazeutische Formulierung schließt Oligonukleotide, wie oben beschrieben ein, und einen physiologisch verträglichen Träger, wie ein inertes Verdünnungsmittel oder einen vergleichbaren Träger mit dem das Oligonukleotid verabreicht wird. Geeignete Formulierungen, die pharmazeutische verträgliche sonstige Bestandteile für das Einführen von Verbindungen in den Blutstrom durch nicht Injektionsrouten können in Remington's Pharmaceutical Sciences (18te Ausgabe) (Genarro, Hrg. (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA) gefunden werden. Die pharmazeutische Formulierung, die eingeführt werden kann, ist in fester, halbfester, Suspensions-, oder Emulsionsform, und kann zusätzlich enthalten jede Anzahl an wohl bekannten pharmazeutisch verträglichen Zusätzen. Das Oligonukleotid und andere Inhaltsstoffe können in einer Hart- oder Weichschalen Gelatine Kapsel eingeschlossen sein, können in Gelen oder Cremes enthalten sein, oder können in Zäpfchen, und ähnliche, gepresst sein.

[0077] Verabreichungssysteme für anhaltende Freisetzung und/oder Beschichtungen für kolorektal verabreichte Dosierungsformen werden auch in Erwägung gezogen, wie diejenigen die in U.S. Patent Nr. 4,704,295, 4,556,552, 4,309,404, und 4,309,406 für orale Verabreichung beschrieben werden.

[0078] Wie hier verwendet bedeutet der Begriff „therapeutisch wirksame Menge“ die Gesamtmenge jeder aktiven Komponente der pharmazeutischen Formulierung oder des Verfahrens, die ausreicht, um eine bedeutende Verbesserung beim Subjekt oder beim Patienten zu zeigen, d.h. die Heilung der Krankheitszustände, die die behandelte Krankheit kennzeichnen, und/oder ein Anstieg der Heilungsgeschwindigkeit von solchen Zuständen, eine Reduktion der Expression der Proteine oder der Zellen, die die behandelte Krankheit oder Störung verursachen (z.B. in dem Fall eines Virus, einen Abfall der Virusladung oberhalb des Basisniveaus unter Krankheitsbedingungen). Wenn der Begriff auf einen einzelnen aktiven Inhaltsstoff angewendet wird, der allein verabreicht wird, bezieht sich er sich allein auf diesen Inhaltsstoff. Wenn er auf eine Kombination angewendet wird, bezieht sich der Begriff auf eine kombinierte Menge von aktiven Inhaltsstoffen, die zu einer therapeutischen Wirkung führen, ob in Kombination, seriell oder gleichzeitig, verabreicht.

[0079] Die therapeutisch wirksame Menge eines synthetischen kolorektal verabreichten Oligonukleotids bei dem erfindungsgemäßen Verfahren, wird von der Eigenheit und der Schwere des behandelten Zustands abhängen, und der von dem Wesen der früheren Behandlungen, denen sich der Patient unterzogen hat. Letztendlich wird der zuständige Arzt über die Menge des synthetischen Oligonukleotids entscheiden, mit der jeder einzelne Patient behandelt wird. Anfänglich kann der zuständige Arzt niedrigen Dosen des synthetischen Oligonukleotids verabreichen und die Reaktion des Patienten beobachten. Größere Dosen des synthetischen Oli-

gonukleotids können verabreicht werden bis die optimale therapeutische Wirkung für den Patienten erreicht wird, und an diesem Punkt wird die Dosis nicht weiter erhöht. Es wird erwogen, dass die Dosierungen der pharmazeutischen Zusammensetzungen, die bei der Verfahren der vorliegenden Erfindung verabreicht werden, ungefähr enthalten sollten 0.1 bis 100.0 mg/kg Körpergewicht pro Tag, vorzugsweise 0.1 bis 75.0 mg/kg Körpergewicht pro Tag, bevorzugter 1.0 bis 50.0 mg/kg Körpergewicht pro Tag, noch bevorzugter 1 bis 25 mg/kg Körpergewicht pro Tag, und noch bevorzugter 1 bis 10 oder 1 bis 5.0 mg/kg Körpergewicht pro Tag. Das Oligonukleotid wird vorzugsweise bei einer ausreichende Dosierung verabreicht, um ein Blutlevel des Oligonukleotids von ungefähr 0.01 μM bis ungefähr 100 μM zu erreichen. Vorzugsweise sollte die Konzentration des Oligonukleotids an der Stelle der gestörten Genexpression ungefähr 0.01 μM bis ungefähr 50 μM sein, bevorzugter ungefähr 0.01 μM bis ungefähr 10 μM sein, und am bevorzugtesten ungefähr 0.05 μM bis ungefähr 5 μM sein. Jedoch können bei lokalisierter Verabreichungen, wesentlich geringere Konzentrationen als diese wirksam sein, und wesentlich höhere Konzentrationen toleriert werden. Es kann gewünscht sein, eine therapeutisch wirksame Menge der einen oder mehreren therapeutischen Zusammensetzungen der Erfindung simultan oder sequentiell zu verabreichen, wenn sie einzeln als eine einzelne Behandlungsphase vorliegen.

[0080] Es wird gewürdigt werden, dass der Einheitsinhalt von einem aktiven Inhaltsstoff und Inhaltsstoffen, die in einzelnen Dosis jeder Dosierungsform enthalten ist, nicht für sich selbst einen wirksame Menge darzustellen braucht, da die notwendige wirksame Menge durch Verabreichung einer Vielzahl von Dosierungseinheiten (wie Zäpfchen, Gelen, Cremes oder Kombinationen davon) erreicht werden kann. Tatsächlich wurde gezeigt, dass Multi-Dosierung (einmal am Tag) die Plasma- und Gewebekonzentrationen der MBOs signifikant erhöht (Daten nicht gezeigt).

[0081] Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide werden an das Tier in einer therapeutisch wirksamen Weise verabreicht. Eine „therapeutisch wirksame Weise“ bezieht sich auf eine Route, Dauer und Häufigkeit der Verabreichung der pharmazeutischen Formulierung, die letztendlich zu einer bedeutungsvollen Verbesserung für den Patienten führt, wie oben beschrieben. In einigen Ausführungsformen der Erfindung wird die pharmazeutische Formulierung in Bolus, kontinuierlichen, unterbrochen oder kontinuierlichen Mengen, die von unterbrochenen Behandlungsschemata gefolgt werden, verabreicht.

[0082] Die pharmazeutische Formulierung kann in Bolus, kontinuierlichen, oder unterbrochenen Dosierungen, oder in einer Kombination von kontinuierlichen und unterbrochenen Dosierungen verabreicht werden, wie durch den Arzt und dem Grad und/oder Phase der Krankheit des Patienten bestimmt wird. Die Länge der Therapie unter Verwendung der pharmazeutischen Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung wird variieren, in Abhängigkeit von den einzigartigen Charakteristiken des Oligonukleotids und des genauen therapeutischen Effekts, der erreicht werden soll, den Beschränkungen der Technik, die in der Herstellung solch einer therapeutischen Formulierung zur Behandlung von Menschen inhärent sind, der Schwere der zu behandelnden Krankheit und dem Zustand und der potentiellen individuelle Reaktion jedes einzelnen Patienten. Letztendlich wird der zuständige Arzt über die angebrachte Länge der intravenösen Therapie entscheiden unter Verwendung der pharmazeutischen Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung.

[0083] Um die Stabilität der erfindungsgemäßen Antisense Oligonukleotide in dem intestinalen Trakt zu bestimmen, und um deren Fähigkeit zu bestimmen, durch die intestinale Wand absorbiert zu werden, wurden zwei radioaktiv markierte, endmodifizierte Oligonukleotide, MBO 1 (SEQ ID Nr: 11) und MBO 2 (SEQ ID NO: 16) und ein Phosphorothioat Oligonukleotid (SEQ ID NO: 16) in den Dickdarm von Ratten verabreicht. Die chemische Struktur dieser Oligonukleotide wird in [Fig. 2](#) gezeigt. Die Gewebeverteilung dieser Oligonukleotide und ihre Stabilität wurden dann gemessen.

[0084] MBO 1 war in dem Dickdarm stabil, wie durch HPLC und PAGE analysiert, für bis zu 4 Stunden nach Verabreichung, bei minimalem beobachteten Abbau ([Fig. 3B](#) und [Fig. 4](#)). Gel Elektrophorese enthüllte, dass die Mehrzahl der extrahierten Radioaktivität im Dickdarm und seinen Inhalten intaktes Oligonukleotid war (Daten nicht gezeigt). Die Absorption von MBO 1 wurde bei Dosierungen von 3.3, 10, 30 und 90 mg/kg untersucht. Oligonukleotid abgeleitete Radioaktivität war in zahlreichen Geweben nachweisbar nach Verabreichung in den Dickdarm des radioaktiv markierten MBO 1. [Fig. 4](#) veranschaulicht die Konzentration der MBO 1 Äquivalente im Plasma, was anzeigte, dass das Oligonukleotid in einer Zeit- und Konzentrationsabhängigen Weise absorbiert wurde. Signifikante Anhäufung von Oligonukleotid abgeleiteter Radioaktivität wurde in zahlreichen Geweben beobachtet. [Fig. 5](#) veranschaulicht die Konzentration von MBO 1 Äquivalenten in ausgewählten Geweben, einschließlich Niere, Leber, Milz, Knochenmark, Lymphknoten und Hirn 4 Stunden nach Verabreichung. Wie in [Fig. 6B](#) und [Fig. 6C](#) gesehen werden kann, enthüllte HPLC Analyse sowohl intakte als auch abgebaute Formen von MBO 1 in der Niere, aber die Mehrzahl der Radioaktivität in der Leber und den Nieren war mit der intakten Form von MBO 1 assoziiert. Gel Elektrophorese enthüllte auch, dass die Mehrzahl der Radioaktivität

in diesen Proben mit der intakten Form von MBO 1 assoziiert war (Daten nicht gezeigt). Keine signifikanten abgebauten Produkte wurden im Dickdarm für bis zu 4 Stunden nach Verabreichung nachgewiesen. Ungefähr 4 bis 14% der verabreichten MBO 1 wurde innerhalb von 4 Stunden in den anästhetisierten Tieren absorbiert, in Abhängigkeit von den Dosierungslevels.

[0085] In getrennten Untersuchungen wurden ähnliche Ergebnisse erhalten nach rektaler Verabreichung von PS-Oligonukleotid und MBO 2. Bei 10 mg/kg hatte PS-Oligonukleotid ein 4 Stunden Absorptionsverhältnis von 8.74% der verabreichten Dosierung, und MBO 2 hatte ein Verhältnis von 6.6% der verabreichten Dosis (Daten nicht gezeigt).

[0086] Frühere Untersuchungen, beschrieben in Zhang et al. (Clin. Chem. (1995) 41: 863-873), demonstrieren, dass nach oraler Verabreichung PS-Oligonukleotide gut durch die gastrointestinale Wand absorbiert werden konnten, aber in der Leber weitgehend abgebaut wurden; wenig intakte PS-Oligonukleotide waren daher in den systemischen Geweben verfügbar. Rektale Verabreichung vermeidet den Erstdurchtrittseffekt in der Leber. Nach Dickdarm Verabreichung wurde PS-Oligonukleotid gut größtenteils in der intakten Form absorbiert und wurde weniger weitgehend in anderen Geweben abgebaut. Weiterhin kann, da die Absorptionsraten in anästhetisierten Ratten abgeschätzt wurden, die tatsächliche Bioverfügbarkeit von kolorektalen Oligonukleotiden unterschätzt werden.

[0087] Diese Untersuchungen stellen die ersten Berichte über die Bioverfügbarkeit von Antisense Oligonukleotide nach kolorektaler Verabreichung in Tierexperimenten dar. Sie zeigen, dass nach Dickdarm Verabreichung: 1) PS-Oligonukleotide und endmodifizierte Oligonukleotide in dem Dickdarm Lumen stabil sind; 2) sie durch die Dickdarmwand absorbiert wurden; 3) die absorbierte Oligonukleotid abgeleitete Radioaktivität an zahlreiche Gewebe verteilt wurde mit einem Muster ähnlich zu dem, das nach i.v. Verabreichung gesehen wird; und 4) Radioaktivität in Geweben wie Leber und Nieren mit intakten Oligonukleotiden wie auch mit Metaboliten assoziiert war.

[0088] Somit wurde unter Verwendung des Verfahrens der Erfindung die erfolgreiche Absorption von Oligonukleotiden über den intestinalen Trakt erreicht und im ganzen Körper verteilt. Intakte Oligonukleotide wurden im Plasma und zahlreichen Geweben nachgewiesen. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass kolorektale Verabreichung ein mögliches Mittel ist für die Verabreichung von Oligonukleotiden als therapeutische Agenzien.

[0089] Diese Ergebnisse demonstrieren auch, dass synthetische Oligonukleotide in intakter Form in einen Säuger eingeführt werden können, und dass solch ein Oligonukleotid in intakter Form wenigstens vier Stunden nach kolorektaler Verabreichung in intakter Form im systemischen Plasma und in anderen Organen und Geweben gefunden werden kann.

[0090] Die folgenden Beispiele veranschaulichen die bevorzugten Arten des Herstellens und Praktizierens der vorliegenden Erfindung, sollen aber nicht verstanden werden, den Umfang der Erfindung zu beschränken, da alternative Verfahren verwendet werden können, um ähnliche Ergebnisse zu erzielen.

Beispiele

1. Synthese und Analyse des Oligonukleotids

[0091] Hybrid 25mer Phosphorothioat verbundene Oligonukleotide mit SEQ ID NO: 1 und 11 und enthaltend 2'-O-Methyl Ribonukleotid 3' und 5' Sequenzen und ein Deoxyribonukleotid Inneres wurden synthetisiert, aufgereinigt und wie folgt analysiert.

[0092] Unmodifizierte Phosphorothioat Deoxyribonukleoside wurden auf CPG in einem 5-6 µmol Format auf einem automatischen Synthetisierer (model 8700, Millipore, Bedford, MA) unter Verwendung des H-Phosphonat Ansatzes synthetisiert, der beschrieben wurde in U.S. Patent Nr. 5,149,798. Deoxynukleosid H-Phosphonate wurden erhalten von Millipore (Bedford, MA). 2'-O-Methyl Ribonukleotid H-Phosphonate oder Phosphorothioate wurden durch Standardverfahren synthetisiert (siehe, z.B., „Protocols for Oligonucleotides and Analogs“ in Meth. Mol. Biol. (1993) Band 20) oder kommerziell bezogen (z.B. von Glenn Research, Sterling, VA und Clontech, Palo Alto, CA). Segmente von Oligonukleotiden enthaltend 2'-O-Methyl Nukleosid(e) wurden zusammengebaut durch Verwendung von 2'-O-Methyl Ribonukleosid H-Phosphonate oder Phosphorothioate für die gewünschten Zyklen. In ähnlicher Weise wurden Segmente von Oligonukleotiden enthaltend Deoxyribonukleoside zusammengebaut unter Verwendung von Deoxynukleosid H-Phosphonaten für die gewünschten Zyklen. Nach Zusammenbau wurde CPG gebundenes Oligonukleotid H-Phosphonat oxidiert mit Schwefel, um

die Phosphorothioat Bindung zu erzeugen. Oligonukleotide wurden dann deprotektiert in konzentrierter NH_4OH bei 40°C für 48 Stunden.

[0093] Rohes Oligonukleotid (ungefähr 500 A_{260} Einheiten) wurden mittels reverser Niedrigdruckchromatographie auf einem C_{18} reverse Phase Medium analysiert. Die DMT Gruppe wurde entfernt durch Behandlung mit 80% wässriger Essigsäure, dann wurden die Oligonukleotide gegen destilliertes Wasser dialysiert und lyophilisiert.

[0094] Ein 2'-O-Methyl endgeschütztes Oligonukleotid, gezeigt in [Fig. 2](#) und mit SEQ ID NO: 16 wurde hergestellt, wie beschrieben in Agrawal und Tang (Antisense Res. Dev. (1992) 2: 261-66), Padmapriya et al. (Antisense Res. Dev. (1994) 4: 185-199), Zhang et al. (Biochem. Pharmacol. (1995) 50: 545-556; und Zhang et al. (J. Pharm. Exp. Ther. (1996) 278:971-979).

2. Radioaktive Markierung des Oligonukleotids

[0095] Um ^{35}S markiertes Oligonukleotid zu erhalten, wurde die Synthese in zwei Schritten ausgeführt. Die ersten 19 Nukleotide der Sequenz SEQ ID NO: 1 wurden von ihrem 3' Ende aus unter Verwendung des β -Cyanoethyl-Phosphoramidit Ansatzes zusammengebaut (siehe Beaucage in Protocols for Oligonucleotides and Analogs (Agrawal, Hrg.), Humana Press, (1993), S. 33-61). Die letzten sechs Nukleotide wurden zusammengebaut unter Verwendung des H-Phosphonat Ansatzes (siehe Froehler in Protocols for Oligonucleotides and Analogs (Agrawal, Hrg.) Humana Press, 1993, S. 63-80). Kontrolliertes Porenglas (CPG) Träger gebundenes Oligonukleotid (30 mg CPG; ungefähr 1 μM) enthaltend eine fünf H-Phosphonat Bindung wurde mit $^{35}\text{S}_8$ oxidiert (4 mCi, 1 Ci/mg, Amersham; 1 Ci = 37 GBq) in 60 ml Kohlenstoff disulfid/pyridin/triethylamin (10:10:1). Die Oxidationsreaktion wurde bei Raumtemperatur für 1 Stunde unter gelegentlichem Schütteln durchgeführt. Dann wurden 2 μl , 5 μl und 200 μl 5% kalten Schwefels ($^{32}\text{S}_8$) in der gleichen Lösungsmittelmixtur alle 30 Min hinzugefügt, um die Oxidation zu vervollständigen. Die Lösung wurde entfernt und der CPG Träger wurde mit Kohlenstoff disulfid/pyridin/triethylamin (10:10:1) ($3 \times 500 \mu\text{l}$) und mit Acetonitril ($3 \times 700 \mu\text{l}$) gewaschen. Das Produkt wurde in konzentriertem Ammonium hydroxid deprotektiert (55°C , 14 Stunden) und eingedampft. Das resultierende Produkt wurde durch Polyacrylamid Gel Elektrophorese aufgereinigt (20% Polyacrylamid enthaltend 7 M Harnstoff). Die gewünschte Bande wurde unter UV Beschattung ausgeschnitten und das PS-Oligonukleotid wurde aus dem Gel extrahiert und mit einer Sep-Pak C18 Kartusche (Waters) und Sephadex G-15 Säule entsalzen. Die Ausbeute waren 20 A_{260} Einheiten (600 μg ; spezifische Aktivität, 1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$).

3. Tiere und Wirkstoffbehandlung

[0096] Männliche Sprague-Dawley Ratten (150-200 g, Harlan Laboratories, Indianapolis, IN) wurden bei der Studie verwendet. Die Tiere wurden mit kommerziellem Futter und Wasser nach Bedarf für 1 Woche vor der Studie gefüttert. Nachdem jedes Tier unter Verwendung von Pentobarbital anästhetisiert wurde, wurde ein Einschnitt an dem unteren Teil des Abdomens gemacht, um den Dickdarm zu exponieren. Das Kolon wurde an der Position 0.5 cm zum Caecum aufgeschnitten. Die Darminhalte wurden ausgewaschen unter Verwendung von 30 ml physiologischer Kochsalzlösung (0.9% NaCl) bei 37°C . Nachdem der Anus ligiert war, wurden unmarkierte und [^{35}S]-markierte Oligonukleotide, die in physiologischer Kochsalzlösung (0.9% NaCl) bei den vorgesehenen Konzentrationen aufgelöst waren, in den Dickdarm durch den Schnitt injiziert, der nach Wirkstoffverabreichung ligiert wurde. Das Abdomen wurde dann geschlossen und die Körpertemperatur wurde bei $38 \pm 0.5^\circ\text{C}$ mittels einer Wärmelampe gehalten.

[0097] Oligonukleotide wurden an Ratten in vier Dosierungshöhen verabreicht, d.h. 3.3, 10, 30 und 90 mg/kg (3 Ratten pro Dosierungshöhe). Blutproben wurden in Heparin-Röhrchen von den Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten gesammelt, d.h. nach 1, 2, 3 und 4 Stunden. Plasma wurde durch Zentrifugation abgetrennt. 4 Stunden nach Wirkstoffverabreichung wurden Tiere durch Ausbluten während der Natrium pentobarbital Anästhesie eingeschläfert. Nach dem Einschlafen wurden alle Gewebe/Organe gesammelt, unmittelbar auf Whatman Nr. 1 Filterpapier aufgebracht, äußeres Fett oder Bindegewebe entfernt, von allen Inhalten geleert und gereinigt, und einzeln gewogen vor der Quantifizierung der Oligonukleotid abgeleiteten Radioaktivität. Biologische Proben wurden durch Bestimmung der Gesamt-Radioaktivität, HPLC und PAGE Analyse unter Verwendung der oben beschriebenen Verfahren analysiert.

4. Gesamt-Radioaktivitäts-Messungen

[0098] Die Gesamt-Radioaktivitäten in Geweben und Körperflüssigkeiten wurden durch Flüssigkeitsszintillations-Spektrometrie bestimmt (LS 6000TA, Beckman, Irvine, CA). Kurz gesagt, wurden biologische Flüssigkei-

ten (Plasma, 50-100 µl; Urin, 50-100µl) mit 6 ml Szintillationsflüssigkeit (Budget-Solve, RPI, Mt. Prospect, IL) gemischt, um die Gesamt-Radioaktivität zu bestimmen. Fäzes wurden gemahlen und gewogen, bevor sie in einem 9-fachen Volumen 0.9% NaCl Kochsalzlösung homogenisiert wurden. Ein Aliquot des Homogenats (100 µl) wurde mit Solubilisierer (TS-2, RPI, Mt. Prospect, IL) und dann mit Szintillationsflüssigkeit (6 ml) gemischt, um die Quantifizierung der Gesamt-Radioaktivität zu ermöglichen.

[0099] Nach ihrer Entfernung wurden Gewebe sofort auf Whatman Nr. 1 Filterpapier aufgebracht und gewogen, bevor sie in 0.9% NaCl Kochsalzlösung homogenisiert wurden (3-5 ml pro Gram Nassgewicht). Das resultierende Homogenat (100 µl) wurde mit Solubilisierer (TS-2, RPI, Mt. Prospect, IL) und dann mit Szintillationsflüssigkeit (6 ml) gemischt, um die Gesamt-Radioaktivität zu bestimmen. Das Volumen der jeder Probe hinzugefügten 0.9% NaCl Kochsalzlösung wurde aufgezeichnet. Die homogenisierten Gewebe/Organe wurde bei $\leq 70^{\circ}\text{C}$ gefroren aufbewahrt, bis sie für weitere Analysen verwendet wurden.

5. HPLC Analyse

[0100] Die Radioaktivität im Urin wurde analysiert durch Ionen gepaarte HPLC unter Verwendung einer Modifikation des Verfahrens, das in seinen Grundzügen durch Sands et al. beschrieben wurde (Mol. Pharm. (1994) 45: 932-943). Urin Proben wurden zentrifugiert und durch einen 0.2 µm Acro Filter passiert (Gelman, Ann Arbor, MI) vor der Analyse. Hybrid Oligonukleotide und Metabolite in Plasmaproben wurden extrahiert unter Verwendung der obigen Verfahren für die Probenaufbereitung für PAGE. Eine Microsorb MV-C4 Säule (Rainin Instruments, Woburn, MA) wurde in der HPLC eingesetzt unter Verwendung einer Hewlett Packard 1050 HPLC mit einer quaternären Pumpe für das Erstellen von Gradienten. Die mobile Phase schloss zwei Puffer ein; Puffer A war 5 mM A Reagenz (Waters Co., Bedford, MA) in Wasser und Puffer B war 4:1 (v/v) Acetonitril (Fisher)/Wasser. Die Säule wurde mit einer Fließrate von 1.5 ml/min eluiert, unter Verwendung des folgenden Gradienten: (1) 0-4 min, 0% Puffer B; (2) 4-15 min 0-35% Puffer B; und (3) 15-70 min 35%-80% Puffer B. Die Säule wurde mit Puffer A für wenigstens 30 min vor dem nächsten Lauf äquilibriert. Durch Verwendung eines RediFrac Fraktionskollektors (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, NJ), wurden 1 min Fraktionen (1.5 ml) gesammelt und mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit gemischt, um die Radioaktivität in jeder Fraktion zu bestimmen.

6. Gel Elektrophorese

[0101] Polyacrylamid Gel Elektrophorese (PAGE) der extrahierten Oligonukleotide wurde ausgeführt unter Verwendung der zuvor beschriebenen Verfahren (Agrawal et al. (1995) Biochem. Pharmacol. 50: 571-576; Zhang et al. (1995) Biochem. Pharmacol. 49: 929-939; Zhang et al. (1995) Biochem. Pharmacol. 50: 571-576; und Zhang et al. (1996) J. Pharm. Exp. Ther. 278: 971-979). Plasma und Gewebe Homogenate wurden mit Proteinase K (2 mg/ml) in Extraktionspuffer (0.5% SDS/10mM NaCl/20 mM Tris-HCl, pH 7.6/10 mM EDTA) für 1 Stunde bei 60°C inkubiert. Die Proben wurden dann zweimal mit Phenol/Chloroform (1:1, v/v) und einmal mit Chloroform extrahiert. Nach Ethanol Fällung wurden die Extrakte durch Elektrophorese in 20% Polyacrylamid Gelen analysiert, die 7 M Harnstoff enthielten. Urin Proben wurden filtriert, entsalzt, und dann durch PAGE analysiert. Die Gele wurden in 10% Essigsäure/10% Methanol Lösung fixiert und dann vor der Autoradiographie getrocknet.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

- (i) ANMELDER: IDERA PHARMACEUTICALS; INC.
- (ii) TITEL DER ERFINDUNG: VERMINDERUNGS-REGULATION DER GENEXPRESSION DURCH KOLOREKTALE VERABREICHUNG VON SYNTHETISCHEN OLIGONUKLEOTIDEN
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 21
- (iv) COMPUTER LESBARE FORM:
 - (A) MEDIUM TYP: Floppy disk
 - (B) COMPUTER: IBM PC Kompatibel
 - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: Patentln AUSGABE #1.0, Version #1.30
- (v) DERZEITIGE ANMELDEDATEN:
 - (A) ANMELDENR.: EP 98 911 615.7
 - (B) ANMELDEDATUM: 12-MAR-1998
 - (C) KLASSIFIKATION:
- (vi) FRÜHERE ANMELDEDATEN:
 - (A) ANMELDENR.: US 08/846,417
 - (B) ANMELDEDATUM: 30-APR-1997
- (vii) FRÜHERE ANMELDEDATEN:
 - (A) ANMELDENR.: US 60/040,738
 - (B) ANMELDEDATUM: 12-MAR-1997

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:1:

- (i) SEQUENZ EIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzel
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLEKÜL TYP: andere Nukleinsäure
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTI-SENSE: NEIN
- (xi) SEQUENZ BESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1: CTCTCGCACC CATCTCTCTC CTTCU 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:2:

- (i) SEQUENZ EIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzel

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLEKÜL TYP: andere Nukleinsäure

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZ BESCHREIBUNG: SEQ ID NO:2:CTCTCGCACC CATCTCTCTC CTUCU 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENZ EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 2 5 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzel

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLEKÜL TYP: andere Nukleinsäure

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZ BESCHREIBUNG: SEQ ID NO:3:CTCTCGCACC CATCTCTCTC CUUCU 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENZ EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 25 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzel

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLEKÜL TYP: andere Nukleinsäure

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZ BESCHREIBUNG: SEQ ID NO:4: CTCTCGCACC CATCTCUCUC CUUCU 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENZ EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 25 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzel

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLEKÜL TYP: andere Nukleinsäure

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZ BESCHREIBUNG: SEQ ID NO:5: CTCTCGCACC CAUCUCUCUC CUUCU 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENZ EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 25 Basenpaare

- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzel
- (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLEKÜL TYP: andere Nukleinsäure
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTI-SENSE: NEIN
- (xi) SEQUENZ BESCHREIBUNG: SEQ ID NO:6: CUCUCGCACC CAUCDCUCUC CUUCU 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:7:

- (i) SEQUENZ EIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzel
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLEKÜL TYP: andere Nukleinsäure
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTI-SENSE: NEIN
- (xi) SEQUENZ BESCHREIBUNG: SEQ ID NO:7: CTCTCGCACC CATCTCTCTC CTTCU 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:8:

- (i) SEQUENZ EIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzel
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLEKÜL TYP: andere Nukleinsäure
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTI-SENSE: NEIN
- (xi) SEQUENZ BESCHREIBUNG: SEQ ID NO:8: CUCUCGCACC CATCTCTCTC CUUCU 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:9:

- (i) SEQUENZ EIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzel
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLEKÜL TYP: andere Nukleinsäure
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTI-SENSE: NEIN
- (xi) SEQUENZ BESCHREIBUNG: SEQ ID NO:9: CUCUCGCACC CATCTCUCUC CUUCU 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:10:

- (i) SEQUENZ EIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 2 5 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzel
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLEKÜL TYP: andere Nukleinsäure
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTI-SENSE: NEIN
- (xi) SEQUENZ BESCHREIBUNG: SEQ ID NO:10:CUCUCGCACC CAUCUCUCUC CUUCU 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:11:

- (i) SEQUENZ EIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzel
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLEKÜL TYP: andere Nukleinsäure
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTI-SENSE: NEIN
- (xi) SEQUENZ BESCHREIBUNG: SEQ ID NO:11:CUCUCGCACC CATCTCTCUC CUUCU 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:12:

- (i) SEQUENZ EIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzel
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLEKÜL TYP: andere Nukleinsäure
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTI-SENSE: NEIN
- (xi) SEQUENZ BESCHREIBUNG: SEQ ID NO:12:CUCUCGCACC CAUCTCTCTC CUUCU 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:13:

- (i) SEQUENZ EIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzel
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLEKÜL TYP: andere Nukleinsäure
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZ BESCHREIBUNG: SEQ ID NO:13:CUCUCGCACC CATCTCTCTC CUUCU 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:14:

(i) SEQUENZ EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 25 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzel

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLEKÜL TYP: andere Nukleinsäure

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZ BESCHREIBUNG: SEQ ID NO:14:CUCTCGCACC CAUCUCUCUC CUUCU 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:15:

(i) SEQUENZ EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 25 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzel

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLEKÜL TYP: andere Nukleinsäure

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZ BESCHREIBUNG: SEQ ID NO:15:CUCTCGCACC CATCTCTCUC CUUCU 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:16:

(i) SEQUENZ EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzel

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLEKÜL TYP: andere Nukleinsäure

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZ BESCHREIBUNG: SEQ ID NO:16:CTCTCGCACC CATCTCTCTC CTTC 24

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:17:

(i) SEQUENZ EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 25 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzel

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLEKÜL TYP: andere Nukleinsäure

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZ BESCHREIBUNG: SEQ ID NO:17:CTCTCGCACC CATCTCTCTC CTTCT 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:18:

(i) SEQUENZ EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 2 5 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzel

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLEKÜL TYP: andere Nukleinsäure

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZ BESCHREIBUNG: SEQ ID NO:18:CUCTCGCACC CATCTCTCTC CTTCT 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:19:

(i) SEQUENZ EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 25 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzel

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLEKÜL TYP: andere Nukleinsäure

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZ BESCHREIBUNG: SEQ ID NO:19:CUCUCGCACC CATCTCTCTC CTTCT 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:20:

(i) SEQUENZ EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 2 5 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzel

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLEKÜL TYP: andere Nukleinsäure

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZ BESCHREIBUNG: SEQ ID NO:20:CUCUCGCACC CAUCUCTCTC CTTCT 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:21:

(i) SEQUENZ EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 25 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzel

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLEKÜL TYP: andere Nukleinsäure

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZ BESCHREIBUNG: SEQ ID NO:21:CUCUCGCACC CAUCUCUCUC CTTCT 25

Patentansprüche

1. Eine pharmazeutische Formulierung umfassend ein Oligonukleotid von ungefähr 12 bis 50 Nukleotiden, das Nicht-Phosphodiester Internukleotid Verbindungen besitzt und komplementär zu einem angezielten Gen ist, für die kolorektale Verabreichung an einen Säuger, wobei das Oligonukleotid 3' und 5' Termini besitzt, und ferner wenigstens ein 2'-substituiertes Ribonukleotid an dem 5' Terminus, an dem 3' Terminus oder an dem 5' Terminus und dem 3' Terminus umfasst.

2. Die pharmazeutische Formulierung gemäß Anspruch 1, wobei das Oligonukleotid wenigstens ein Methylyphosphonat Deoxynukleotid umfasst.

3. Die pharmazeutische Formulierung gemäß Anspruch 2, wobei alle Nukleotide in dem Oligonukleotid 2'-substituierte Ribonukleotide sind.

4. Die pharmazeutische Formulierung gemäß Anspruch 1 oder 3, wobei das 2'-substituierte Ribonukleotid ein 2'-O-Alkyl-Ribonukleotid ist.

5. Die pharmazeutische Formulierung gemäß Anspruch 1, wobei das Oligonukleotid wenigstens ein Deoxyribonukleotid umfasst.

6. Die pharmazeutische Formulierung gemäß Anspruch 5, wobei das Oligonukleotid einen Bereich von wenigstens vier zusammenhängenden Deoxyribonukleotiden umfasst, die fähig sind RNase H Aktivität zu aktivieren.

7. Die pharmazeutische Formulierung gemäß Anspruch 1, wobei das Oligonukleotid eine Internukleotid Verbindung umfasst ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Alkylphosphonaten, Phosphorothioaten, Phosphorodithioaten, Alkylphosphonothioaten, Phosphoramidaten, Phosphoramiditen, Phosphatestern, Carbamaten, Carbonaten, Phosphattriestern, Acetamidat, und Carboxymethylestern.

8. Die pharmazeutische Formulierung gemäß Anspruch 7, wobei alle Nukleotide über Phosphorothioat- oder Phosphorodithioat-Internukleotid Verbindungen verbunden sind.

9. Die pharmazeutische Formulierung gemäß einem der Ansprüche 1-8, wobei das Oligonukleotid andere modifizierte Nukleinsäuren, Basen oder Zucker umfasst, als diejenigen, die in der Natur vorkommen.

10. Die pharmazeutische Formulierung gemäß einem der Ansprüche 1-9, wobei das Oligonukleotid ferner einen Substituenten umfasst ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Substitution mit Diamin, Cholesteryl, anderen lipophilen Gruppen, Nukleaseresistenz verleihenden sperrigen Substituenten an wenigstem einem Ende; Kappen; Substitutionen in einem nicht-überbrückenden Sauerstoff pro Nukleotid; und teilweise Oxidation.

11. Die pharmazeutische Formulierung gemäß einem der Ansprüche 1-10, wobei das Oligonukleotid komplementär ist zu einem Gen eines Virus, eines pathogenen Organismus, oder zu einem zellulären Gen.

12. Die pharmazeutische Formulierung gemäß Anspruch 11, wobei das Oligonukleotid komplementär zu einem Gen eines Virus ist, der involviert ist bei einer Krankheit ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus AIDS, orale oder genitale Herpes, Papilloma Warzen, Influenza, Maul und Klauen Seuche, Gelbfieber, Windpocken, Gürtelrose, adulte T-Zell Leukämie, Burkitt Lymphoma, Nasopharyngeales Karzinom und Hepatitis.

13. Die pharmazeutische Formulierung gemäß einem der Ansprüche 1-10, wobei das Oligonukleotid kom-

plementär ist zu einem Gen, das für ein Protein kodiert, das mit der Alzheimer Krankheit assoziiert ist.

14. Die pharmazeutische Formulierung gemäß einem der Ansprüche 1-10, wobei das Oligonukleotid komplementär ist zu einem Gen, das für Protein in einem Parasiten kodiert, der eine Parasitenkrankheit verursacht ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Amebiasis, Chagaskrankheit, Toxoplasmosis, Pneumocytosis, Lambliasis, Kryptosporidiosis, Trichomoniasis, Malaria, Askariasis, Filariasis, Trichinose und Schistosomiasis Infektionen.

15. Eine pharmazeutische Formulierung gemäß Anspruch 11, wobei das Oligonukleotid komplementär ist zu einem HIV Gen und ungefähr 15 bis 26 Nukleotide umfasst verbunden durch Phosphorothioat Verbindungen, wobei wenigstens eines der Nukleotide an dem 3' Terminus ein 2' substituiertes Ribonukleotid oder ein Methylphosphonat Deoxynukleotid ist, und wobei wenigstens vier Nukleotide zusammenhängende Deoxyribonukleotide sind.

16. Die pharmazeutische Formulierung gemäß Anspruch 2, wobei das Oligonukleotid 3' und 5' Termini besitzt und wenigstens ein Methylphosphonat Deoxynukleotid an dem 3' Terminus und dem 5' Terminus ist.

17. Die pharmazeutische Formulierung gemäß Anspruch 16, wobei das Oligonukleotid wenigstens zwei Methylphosphonat Deoxynukleotide an dem 3' Terminus und dem 5' Terminus besitzt.

18. Die pharmazeutische Formulierung gemäß Anspruch 17, wobei das Oligonukleotid ferner Phosphorothioat Internukleotid Verbindungen umfasst.

19. Die Verwendung eines Oligonukleotids von ungefähr 15 bis 25 Nukleotiden und umfassend Nicht-Phosphodiester Internukleotid Verbindungen für die Herstellung einer pharmazeutischen Formulierung für kolorektale Verabreichung für die Behandlung von Virusinfektionen, Infektionen durch pathogene Organismen, oder Krankheiten oder Funktionsstörungen, die aus abnormaler Genexpression oder aus der Expression eines abnormalen Genproduktes resultieren, wobei das Oligonukleotid 3' und 5' Termini besitzt, und ferner wenigstens ein 2'-substituiertes Ribonukleotid an dem 5' Terminus, an dem 3' Terminus oder an dem 5' Terminus und dem 3' Terminus umfasst.

20. Die Verwendung gemäß Anspruch 19, wobei das Oligonukleotid wenigstens ein Methylphosphonat Deoxynukleotid an dem 3' Terminus, dem 5' Terminus oder dem 3' Terminus und dem 5' Terminus umfasst.

21. Die Verwendung gemäß Anspruch 19, wobei das Oligonukleotid wenigstens zwei 2'-O-Methyl-Ribonukleotide oder Methylphosphonat Deoxynukleotide an jedem Terminus umfasst.

22. Die Verwendung gemäß Anspruch 19, wobei das Oligonukleotid wenigstens zwei 2'-O-Methyl-Ribonukleotide an jedem Terminus umfasst und ferner Phosphorothioat Internukleotid Verbindungen umfasst.

23. Die Verwendung gemäß Anspruch 19, wobei das Oligonukleotid wenigstens zwei Methylphosphonat Deoxynukleotide an jedem Terminus umfasst und ferner Phosphorothioat Internukleotid Verbindungen umfasst.

24. Die Verwendung gemäß Anspruch 19, wobei das Oligonukleotid wenigstens vier Methylphosphonat Deoxynukleotide an jedem Terminus umfasst.

25. Die Verwendung gemäß Anspruch 20, wobei das Oligonukleotid wenigstens zwei 2'-O-Methyl-Ribonukleotide oder Methylphosphonat Deoxynukleotide an jedem Terminus umfasst.

26. Die Verwendung gemäß Anspruch 20, wobei das Oligonukleotid wenigstens zwei 2'-O-Methyl-Ribonukleotide an jedem Terminus umfasst und ferner Phosphorothioat Internukleotid Verbindungen umfasst.

27. Die Verwendung gemäß Anspruch 20, wobei das Oligonukleotid wenigstens zwei Methylphosphonat Deoxynukleotide an jedem Terminus umfasst und ferner Phosphorothioat Internukleotid Verbindungen umfasst.

28. Die Verwendung gemäß Anspruch 20, wobei das Oligonukleotid wenigstens vier Methylphosphonat Deoxynukleotide an jedem Terminus umfasst.

29. Die Verwendung gemäß Anspruch 19, wobei das Oligonukleotid Phosphorothioat Internukleotid Verbindungen umfasst.

30. Die Verwendung eines Oligonukleotids gemäß einem der Ansprüche 1 bis 29 für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung für kolorektale Verabreichung an einen Säuger.

31. Die Verwendung gemäß Anspruch 19, wobei das Oligonukleotid wenigstens ein 2'-O-Methyl-Ribonukleotid an dem 5' Terminus, an dem 3' Terminus oder dem 3' Terminus und dem 5' Terminus umfasst.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

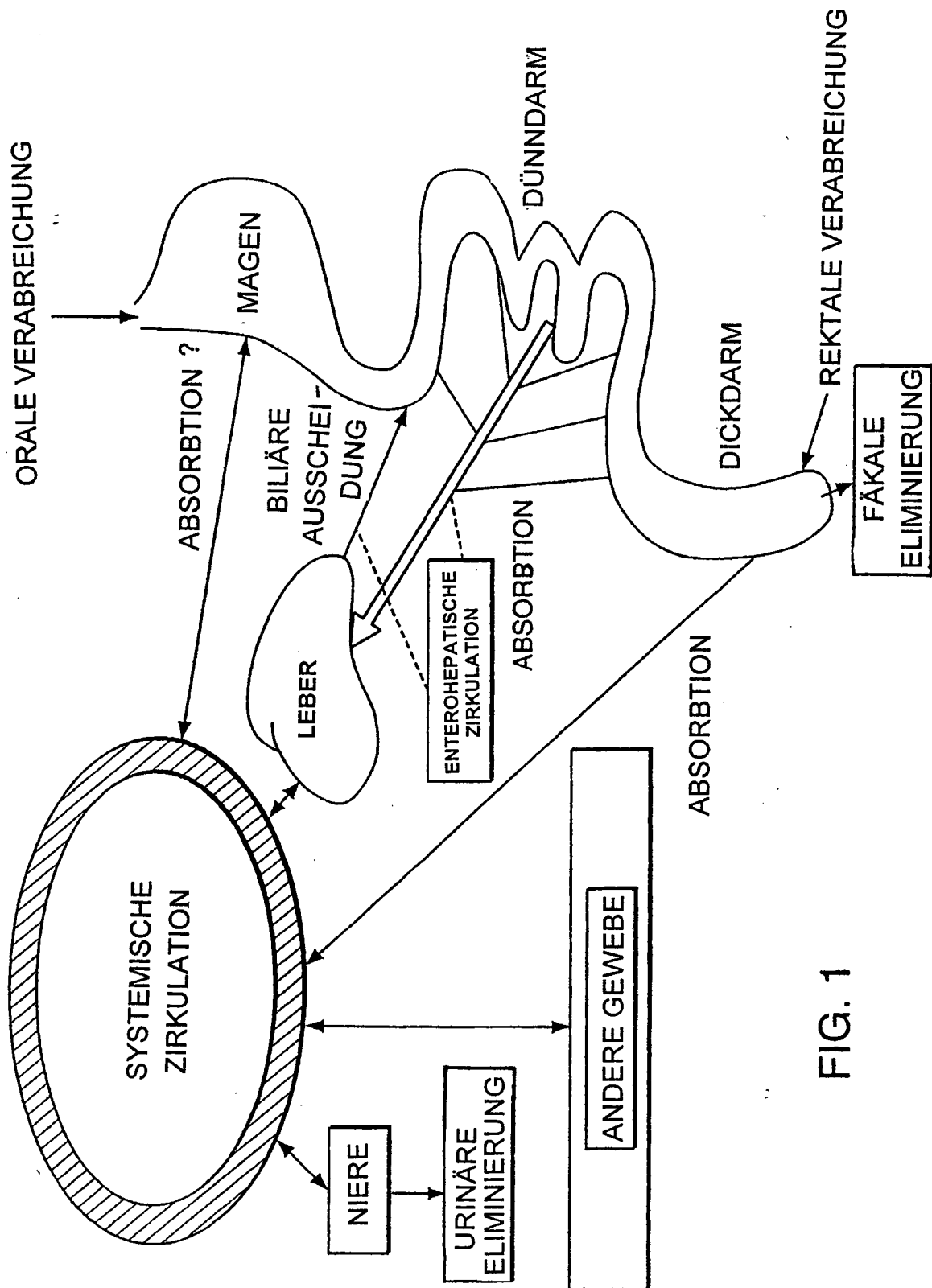


FIG. 1

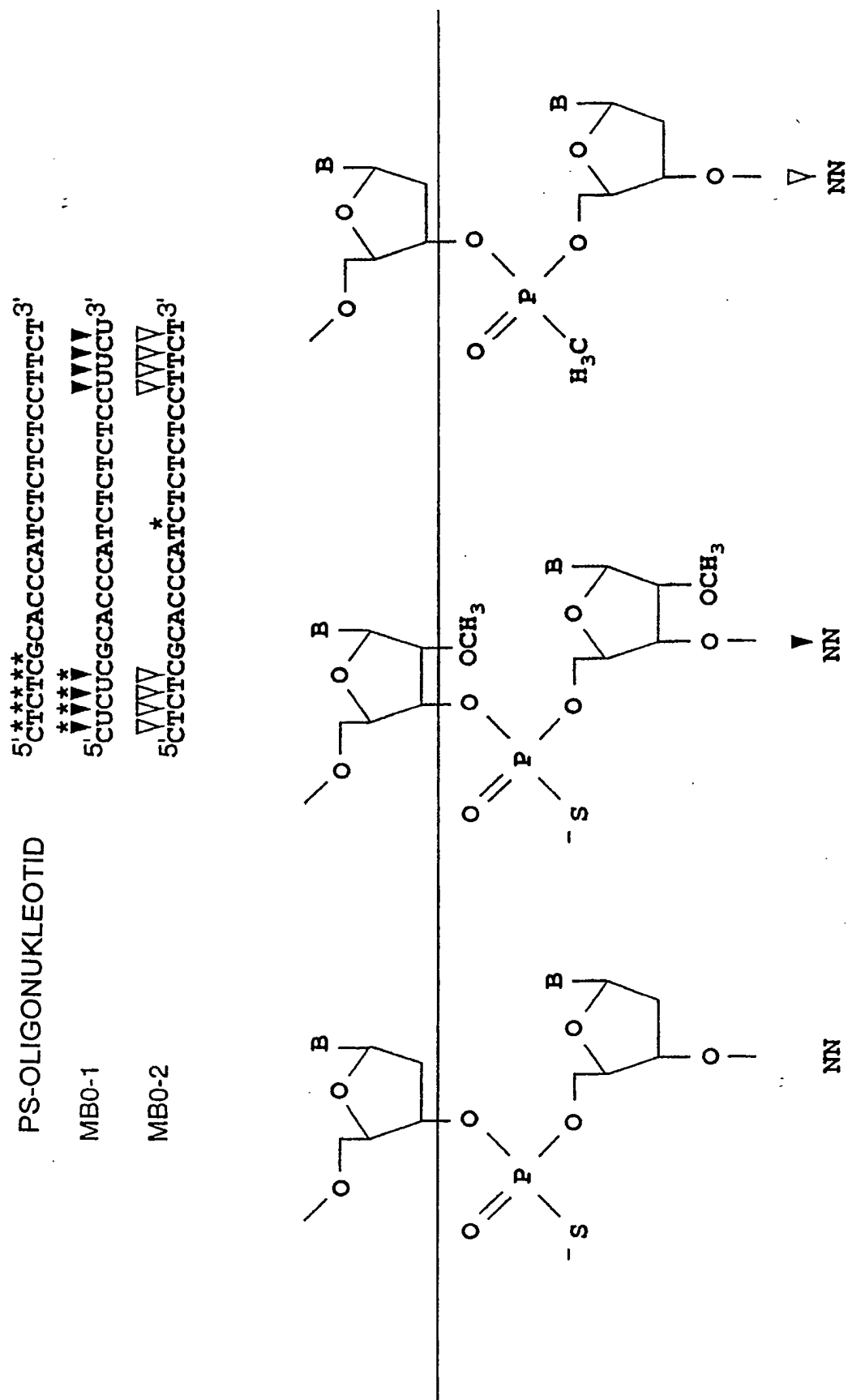


FIG. 2

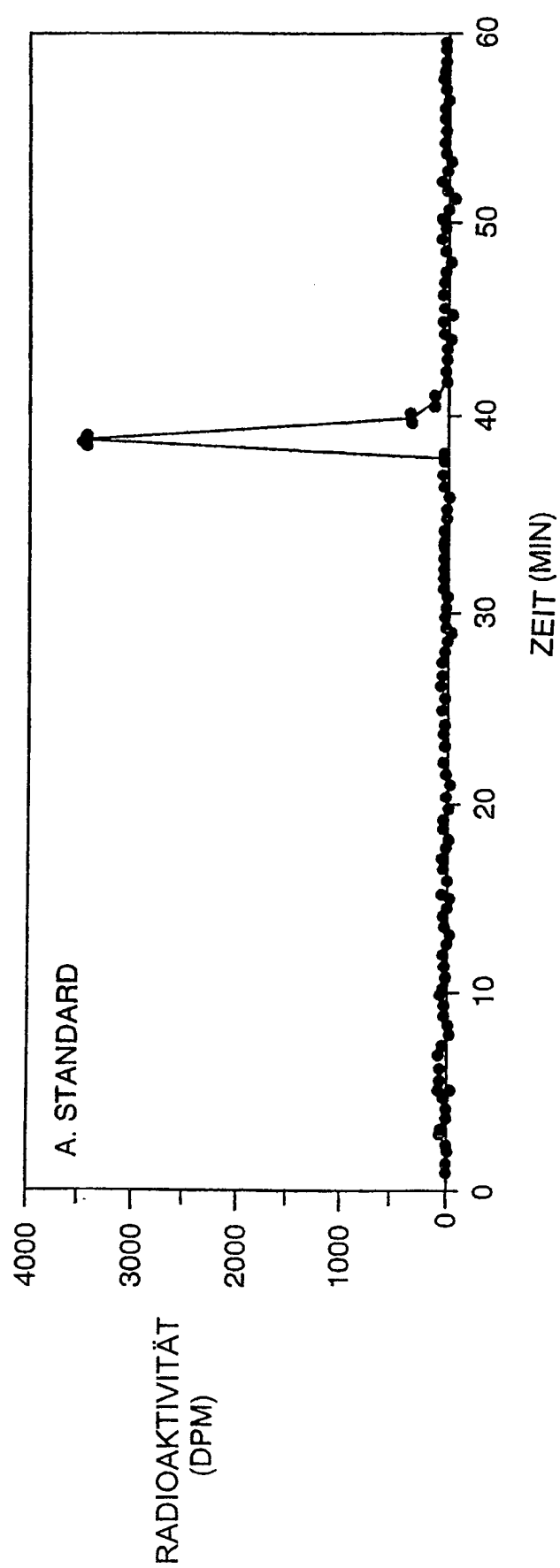


FIG. 3A

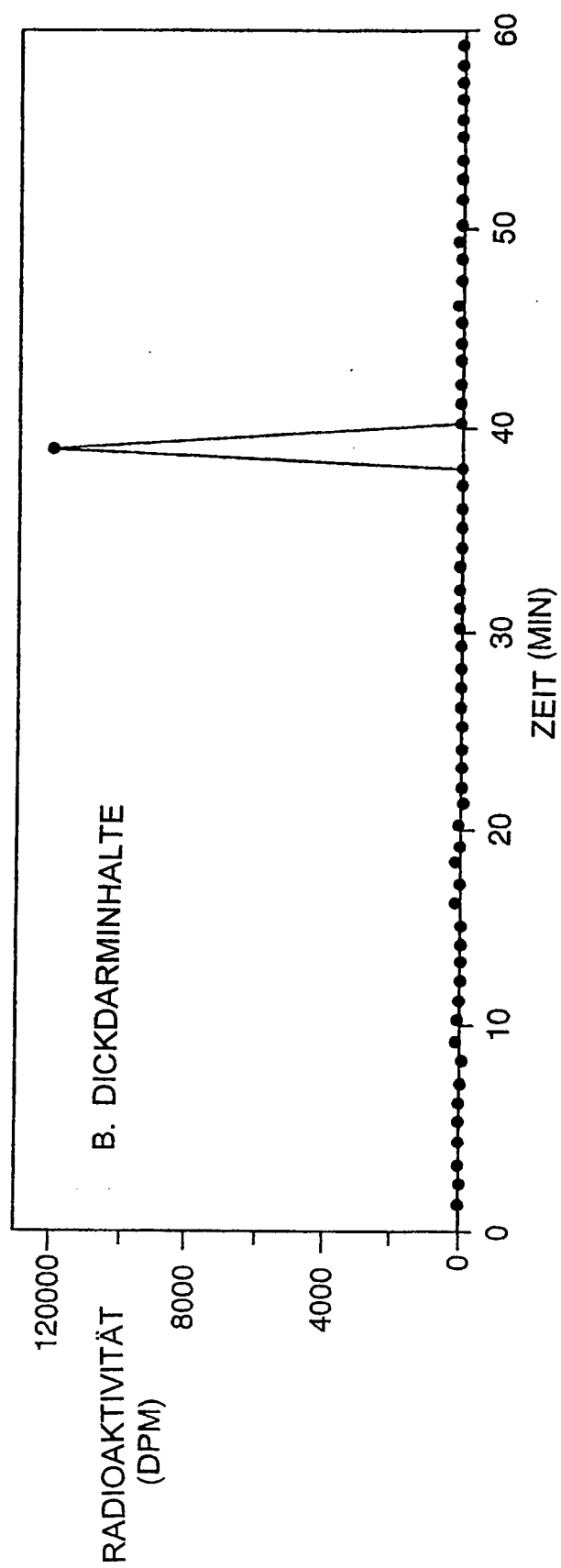


FIG. 3B

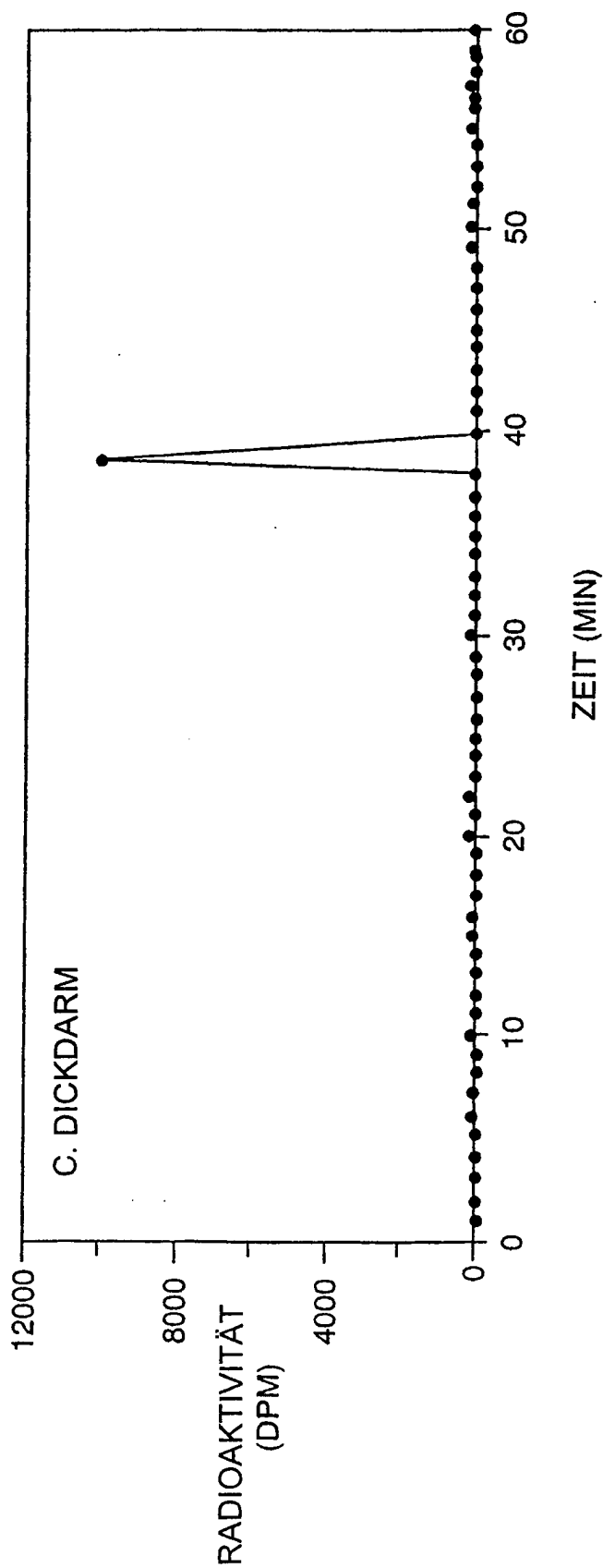


FIG. 3C

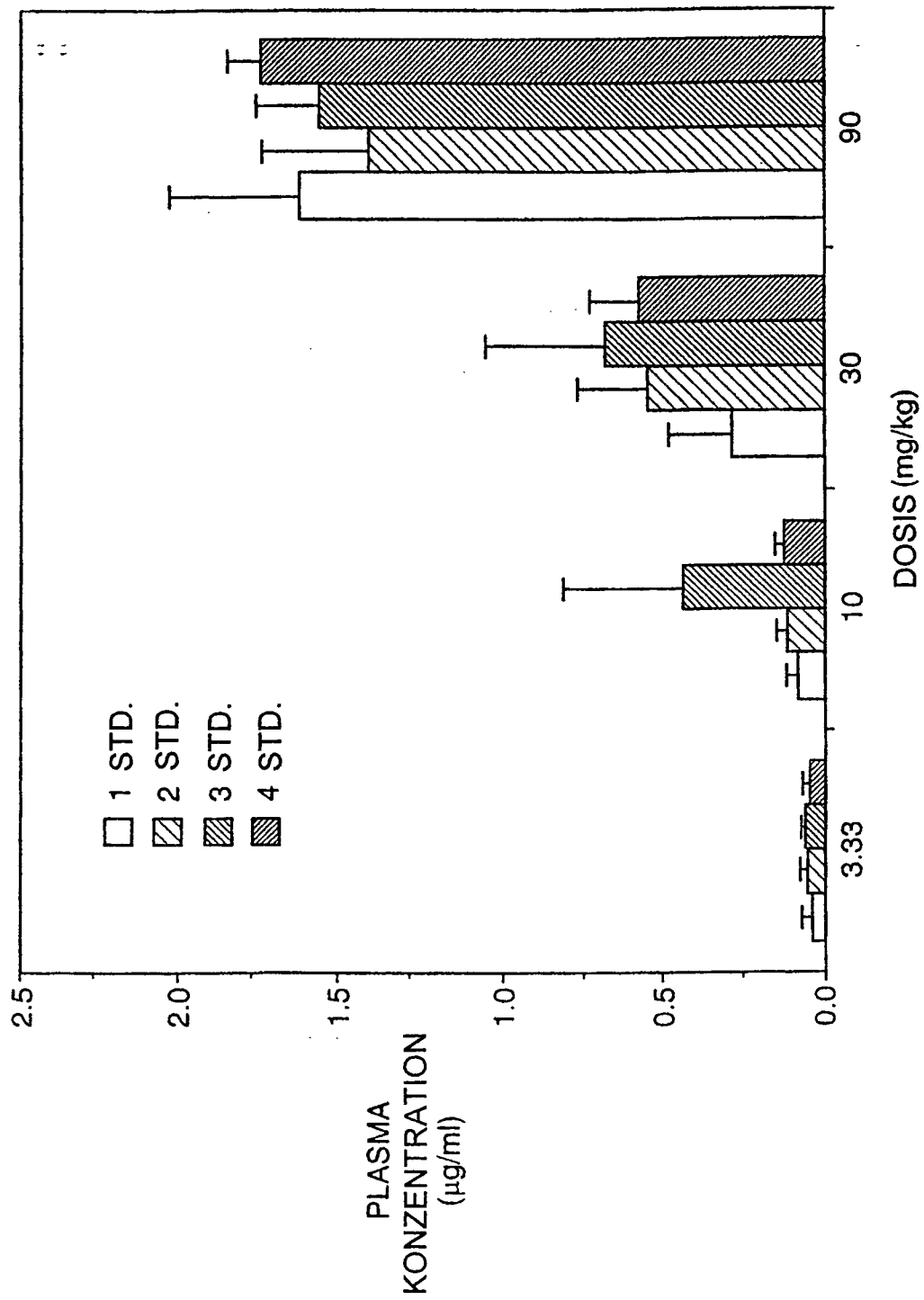


FIG. 4

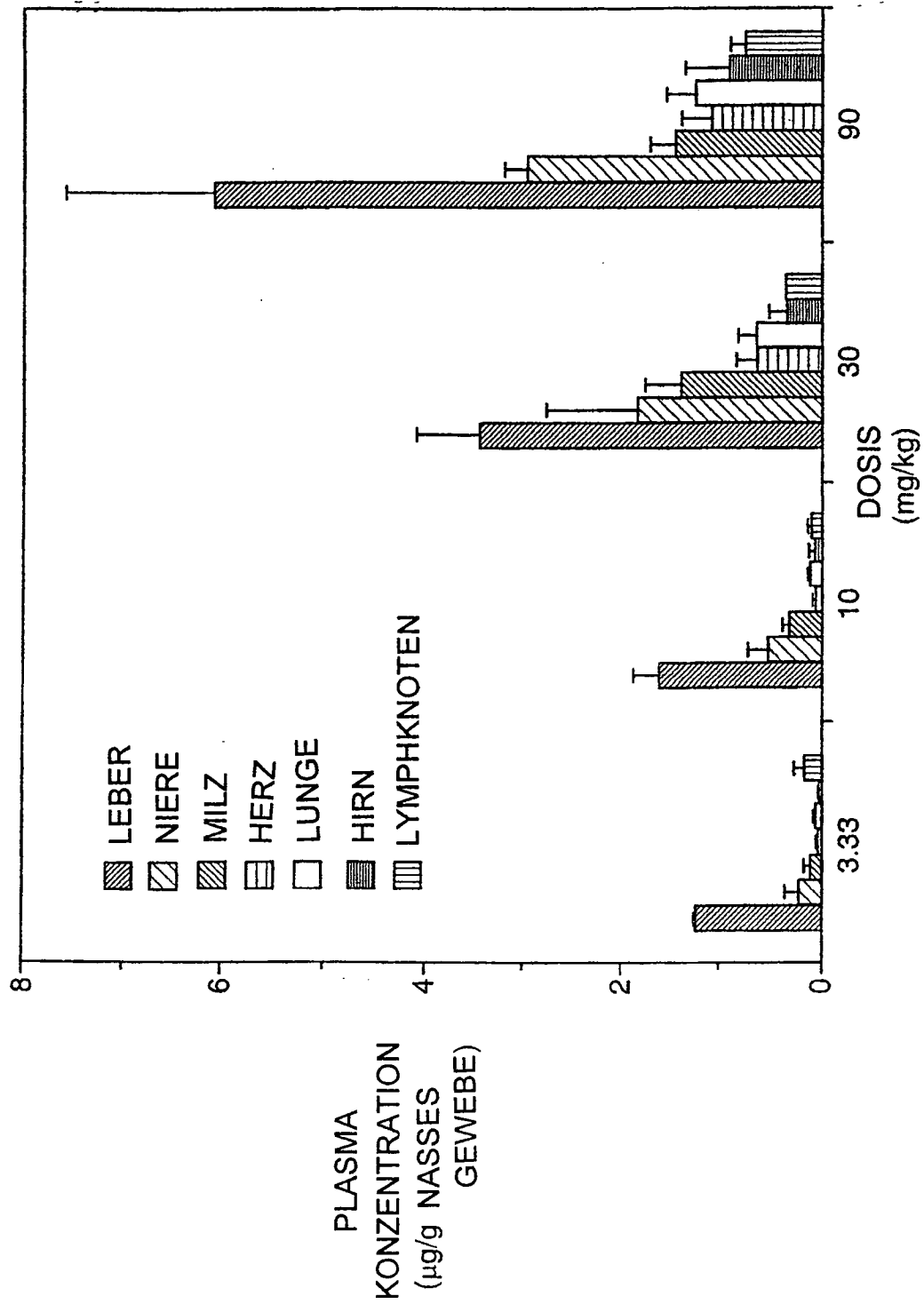


FIG. 5

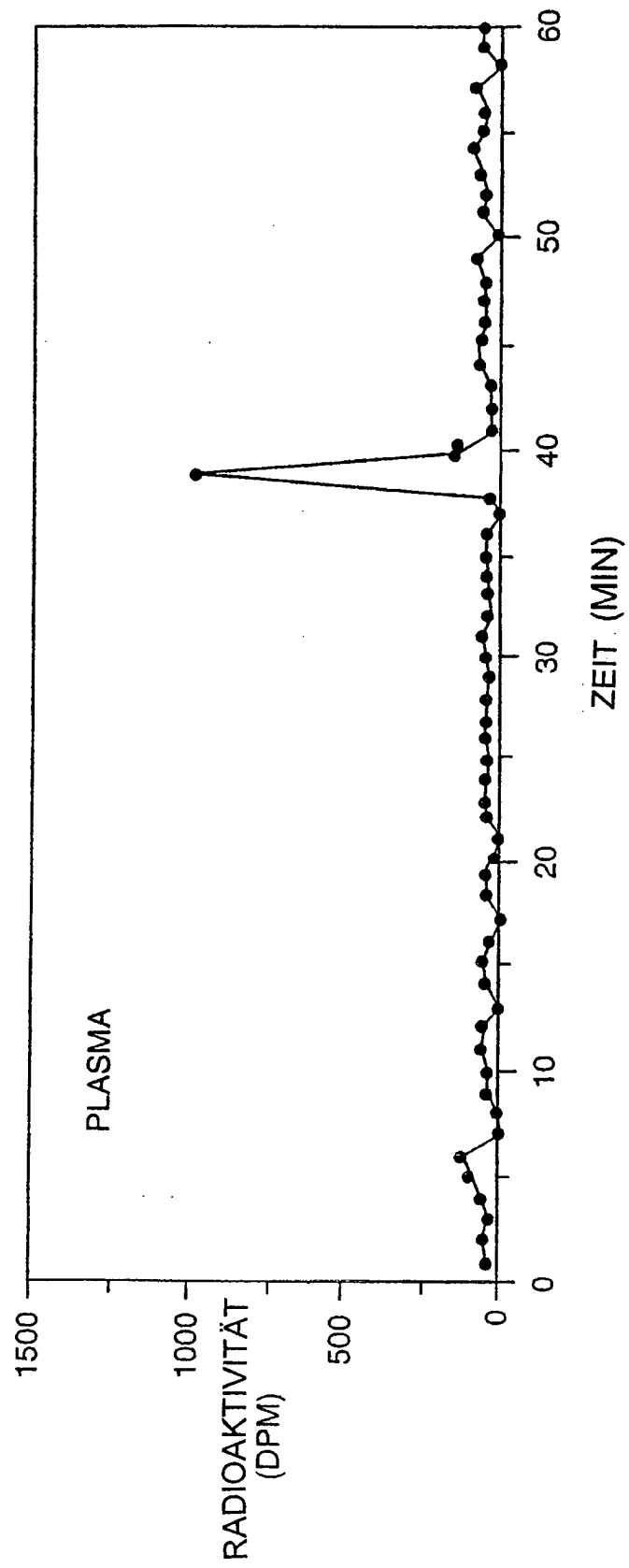


FIG. 6A

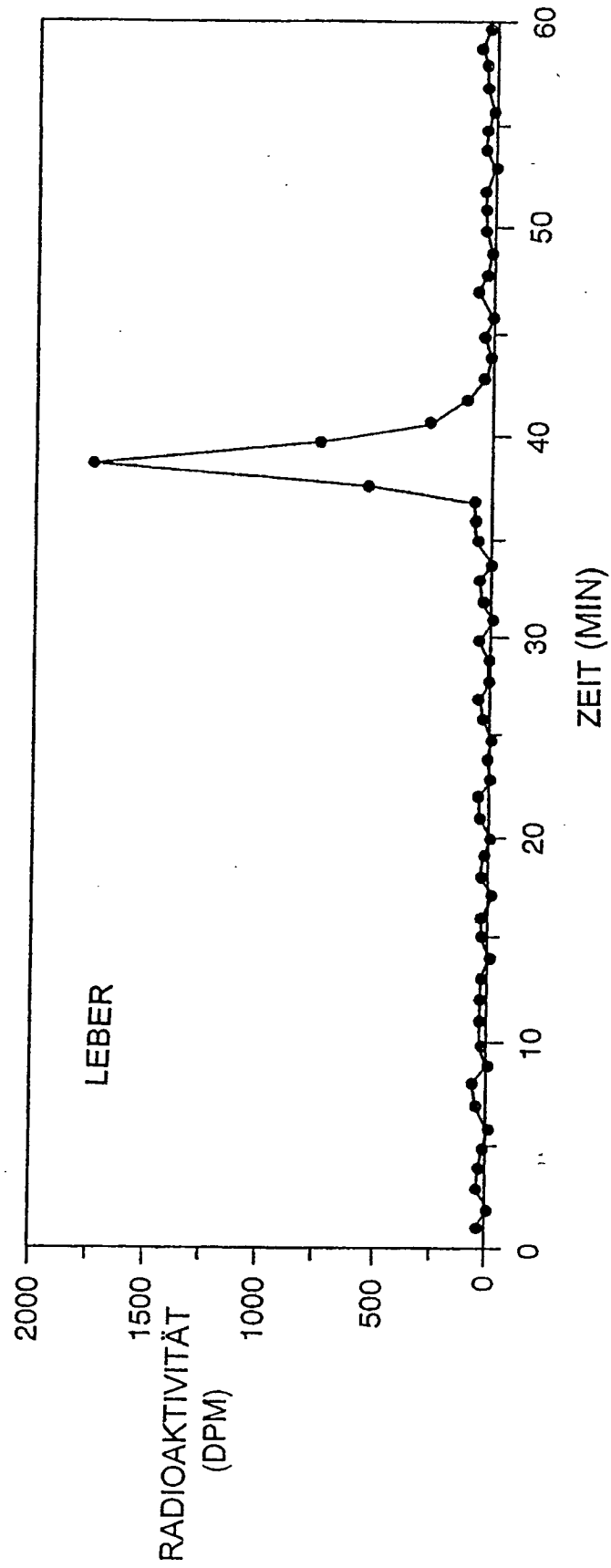


FIG. 6B

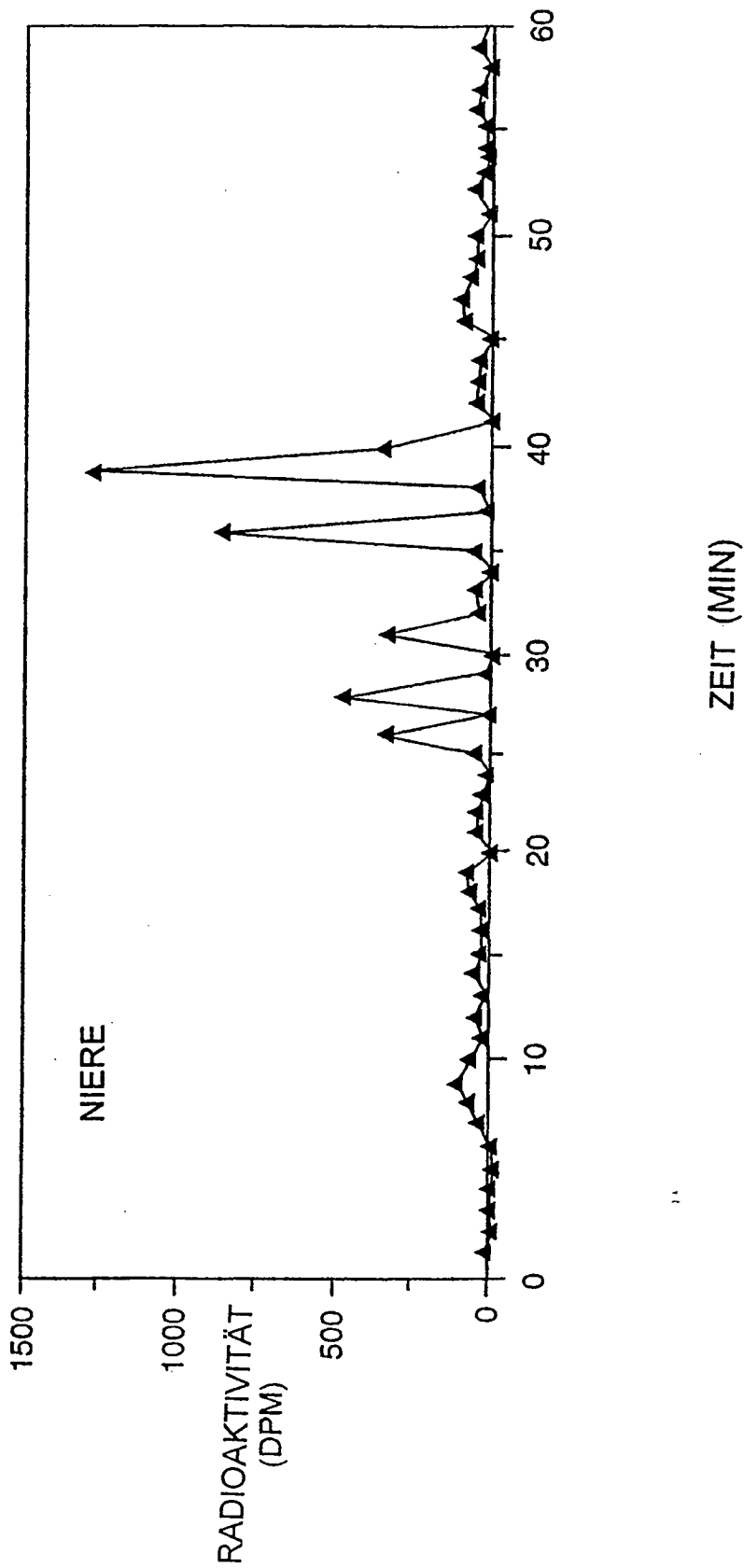


FIG. 6C