PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

295 039

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. :[7]
A 61 K 48/00

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1997-3302**
(22) Přihlášeno: **19.04.1996**
(30) Právo přednosti: **19.04.1995 US 1995/424991**
(40) Zveřejněno: **18.03.1998**
(Věstník č. 03/1998)
(47) Uděleno: **10.03.05**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **18.05.2005**
(Věstník č. 5/2005)
(86) PCT číslo: **PCT/US1996/005334**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1996/032966**

(73) Majitel patentu:
THOMAS JEFFERSON UNIVERSITY, Philadelphia, PA, US

(72) Původce:
Zalewski Andrew, Elkins Park, PA, US

(74) Zástupce:
PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1273, Praha 4, 14021

(54) Název vynálezu:
Přípravky pro terapii arteriovenózních a venózních štěpů

(57) Anotace:
Řešení poskytuje látky pro inhibici syntézy proteinů extracelulární matrice, které zahrnují oligonukleotidy, specifické pro jaderné protoonkogeny c-myc a c-myb a jsou administrovány lokálně, a jejich použití při terapii různých poruch, včetně sklerotických poruch a restenózy, spojených s nepřiměřenou syntézou proteinů extracelulární matrice, zejména kolagenu.

CZ 295039 B6

Přípravky pro terapii arteriovenózních a venózních štěpů

Oblast techniky

Vynález se obecně týku oligonukleotidů a jejich použití jako terapeutických činidel, zejména použití oligonukleotidových antisenzních antigenových látek k inhibici syntézy proteinů extracelulární matrice, zejména z fibroblastů a buněk hladkého svalstva.

Dosavadní stav techniky

Arteriovenózní shunty a píštěle poskytující místa hemodialyzačního přístupu v oběhovém systému hemadialyzovaných pacientů. Naneštěstí arteriovenózní shunty a píštěle po čase selhávají, což vede k vážným lékařským komplikacím pro více než 300 000 hemodialyzovaných pacientů ve světě (Newman, G.E., in *Vascular disease: Surgical and Interventional Therapy,* E. Strandness, Ed. (1994)). Podle studií 12 až 45 % arteriovenózních shuntů a píštělí během prvního roku selhává (Newman, G.E., (1994), zde citovaný). Hlavním důvodem pro selhání přístupového místa je progresivní venózní stenóza (Sedberg et al., *Circulation 80,* 1726–1736 (1989)). Disfunkční hemodialyzační přístupová místa nebo místa po selhání vyžadují lékařskou terapii, buď chirurgické nahrazení arteriovenózního shuntu, nebo transkatétrovou intervenci (tzn. balonkovou angioplastiku nebo stent) ke zvětšení cévy, vycházející ze shuntu nebo píštěle (Newman, G.E., 1994), zde citovaný). Chroničtí hemodialyzovaní pacienti s komplikací arteriovenózního shuntu a píštěle tráví pro držitele průchodnosti přístupových míst přibližně 30 dní v roce v nemocnici.

Hemodialyzační přístupová místa jsou známa jako „Achilova pata" hemodialyzovaných pacientů, i když je konstrukce arteriovenózního shuntu nebo píštěle pro hemodialýzu nezbytná. Arteriovenózní shunty a píštěle jsou obyčejně konstruovány jako Brescia-Ciminovy arteriovenózní píštěle nebo polytetrafluorethylenové (PTFE, Gor–Tex™) štěpy. Ve většině případů je žíla chirurgicky spojena s arterií, buď přímo, nebo nepřímo prostřednictvím PTFE štěpu, v oblasti předloktí, v oblasti ramene, nebo v oblasti stehenní.

Arteriovenózní píštěle jsou pouze jedním příkladem arteriovenózních štěpů, které během doby progresivně selhávají. Jiné typy štěpů (např. venózních štěpů), které vedou k nutnosti lékařského zákroku, jsou aortokoronární bypassové štěpy, karotické štěpy, iliofemorální štěpy a fermoropliteální štěpy. V těchto štěpech je segment žíly umístěn v arteriálním systému. Jedním z převažujících lékařských stavů, týkajících se arteriovenózních štěpů všech typů nebo venózních štěpů, umístěných v arteriálním systému, je pokles vnitřního průměru cévy s časem. To se obvykle vyskytuje v existující žíle, nebo ve štěpu tvořícím část těla žíly (zde nazývané „žílová doména" štěpu). Předpokládá se, že vystavení žíly vysokému arteriálnímu tlaku mění morfologii žíly; v průměru klesá zejména vnitřní průměr žílové domény štěpu. Štěp také trpí trombózou a dalšími poruchami, jako např. infekcí.

Dříve než se předložil tento vynález, měly terapie arteriovenózních a venózních štěpů omezenou účinnost a většinou vyžadovaly invazivní terapie. Snaha se zaměřila na mechanické zvětšování vnitřního průměru štěpu v průřezu se zesílenými stěnami cév, jako v místech selhání hemodialyzačního přístupu. Jiné způsoby se jednoduše spoléhají na chirurgickou revizi místa selhání štěpu, jako při nahrazení arteriovenózního shuntu. Tyto typy terapie podle dosavadního stavu techniky vyžadují značný lékařský dozor, často vyžadují hospitalizaci a v případě některých přístupových hemodialyzačních míst mohou vést k neschopnosti nalézt vhodné přístupové místo pro hemodialýzu, jak se zde uvádí.

Několik studií, zaměřených na morfologii žil v selhávajících štěpech, jako arteriovenózní štěpy a venózní štěpy (např. aortokoronární bypassy), poskytlo informace o patomechanismu těchto

poruch. Tenkostěnné žíly odpovídají brzy na vystavení arteriálnímu krevnímu průtoku a tlaku. Žíla začíná vyvíjet neointimu. Odpověď na vysoký arteriální tlak a průtok neodvratně vede ke značnému zúžení lumene, což způsobuje sníženou průchodnost žíly. Buňky hladkého svalstva cév se primárně nacházejí v medii a neointimě. Fibroblasty se nacházejí v adventicii a perivaskulární tkáni. Fibroblasty přispívají ke granulaci perivaskulární tkáně během opravy poranění žíly. Jako odpověď na zranění, jak buňky hladkého svalstva, tak fibroblasty zvyšují syntézu proteinů matrice ve stěně cévy a perivaskulární tkáni. Následně se žíla zužuje a stává se ztuhlejší kvůli zesílení stěny cévy při vzniku jizvy v perivaskulární tkáni, což vede k nevratnému selhání štěpů, jako v případě arteriovenózních trubic nebo venózních štěpů.

Nepřiměřená syntéza proteinů extracelulární matrice a/nebo syntéza aberantních forem těchto proteinů je spojena se širokým spektrem škodlivých stavů, včetně vzácných dědičných chorob, stejně jako obecně získaných poruch, jako ztráta průchodnosti arteriovenózních a venózních štěpů (Sedberg et al., *Circulation 80*, 1726-1736 (1989)), fibrotická kožní choroba, pulmonární fibróza, osteoartritida, vaskulární restenóza, a podobně (Weiss, Jayson, Editors, *Collagen in Health and Disease,* Churchill Livengstone, Edinburgh, 1982; Gardner, Editor, *Pathological Basis of the Connective Tissue Diseases, Lea & Febiger,* Philadephia, 1992). Extracelulární matrice se skládá primárně s kolagenů, proteoglykanů, elistinu a fibronektinu.

Mnoho z těchto stavů je spojeno s velice komplexními biologickými odpověďmi na fyzikální, chemická a/nebo biologická poranění. Takové odpovědi zahrnují proliferaci a migraci různých typů buněk a syntézu růstových faktorů, které přispívají k odpovědi nebo ji modifikují. Vaskulární poruchy, jako je příklad ateroskleróza a vaskulární restenóza, jsou spojeny s lokální proliferaci a migrací buněk, stejně jako produkcí několika tříd strukturálních proteinů a mnoha růstových faktorů, včetně růstového faktoru, odvozeného od destiček (PDGF), základního fibroblastového růstového faktoru, faktoru α tumorové nekrózy, interleukinu–1, prostaglandinů a různých protoonkogenů (Ross, *Nature*, 362, 801–809 (1993); Morishita et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 8474–8478 (1993)). Přesná role těchto faktorů v různých chorobných procesech není bohužel dobře prostudována.

Ohromný ekonomický dopad poruch, spojených s nepřiměřenou syntézou proteinů extracelulární matrice, zejména vaskulárních poruch, posloužil jako silný hybný moment pro vývoj léčiv nebo jiných způsobů terapie pro léčení nebo zlepšení jejich vysilujících efektů. V této třídě chorob, stejně jako v jiných, kde stav choroby je spojen se zřejmou nepřiměřenou expresí endogenního genu, poskytuje mnoho výhod použití tak zvaných antisenzních sloučenin (Milligan et al., *J. Med. Chem.*, 36, 1923–1937 (1993); Uhlmann, Peymen, *Chemical Reviews,* 90, 543–584 (1990); Goodchild, *Bioconjugate Chemistry,* 1, 165–187 (1990); Crooke, *Ann. Rev. Pharmacol Toxicol.*, 32, 329–376 (1992); Stein et al,. *Science,* 261, 1004-1012 (1993) a tak podobně).

Zvláštní výhoda antisenzního přístupu je ta, že není nutno provádět vyhledávací kroky pro identifikaci kandidátských sloučenin, schopných se navázat na terapeutický cíl. Pokud je známo, že nepřiměřená exprese genu způsobuje chorobu, na kterou je hledán lék, pak struktury kandidátských antisenzních léčiv jsou automaticky určeny podle nukleotidové sekvence nepřiměřeně exprimovaného genu. Je zapotřebí pouze vytvořit oligonukleotid nebo jeho analog, schopný vytvořit stabilní duplex nebo triplex s genem, nebo asociovaným cílovým polynukleotidem, založený na Watwon–Crickově, respektive Hoogsteenově párování. Je vidět, že vynález není limitován na zvláštní mechanismus působení. Specificky navázaná antisenzní sloučenina buď způsobuje, že cíle jsou náchylnější enzymové degradaci, nebo blokuje translaci nebo procesování, nebo jinak blokuje či inhibuje funkci cílového polynukleotidu.

Bylo by velmi výhodné, kdyby byly identifikovány jednotlivé geny, které se vztahují k syntéze strukturálních proteinů jako kolagenu, které přispívají k chorobným stavům. Taková identifikace by okamžitě vedla k nadějné antisenzní terapii mnoha poruch, spojených s nepřiměřenou syntézou proteinů.

Podstata vynálezu

Vynález popisuje použití oligonukleotidu, specifického pro *c–myc* nebo *c–myb*, pro přípravu farmaceutické kompozice pro prevenci selhání hemodialyzačního místa v hemodialytickém pacientovi.

Dále se jedná o způsob terapie poruch, spojených s nepřiměřenou syntézou extracelulární matrice, zejména kolagenu. Způsob zahrnuje podání jedinci, potřebnému takové terapie, efektivního množství jednoho nebo více antisenzních oligonukleotidů, specifických pro jaderné protoonkogeny. Jak je definováno níže, „antisenzní oligonukleotid, specifický pro jaderný protoonkogen" je oligonukleotid o sekvenci (i) schopné tvořit stabilní duplex s doménou mRNA transkriptu jaderného protoonkogenu nebo genu buněčného cyklu, nebo (ii) schopné tvořit stabilní triplex s doménou mRNA transkriptu jaderného protoonkogenu nebo genu buněčného cyklu. S výhodou antisenzní oligonukleotidy podle vynálezu tvoří stabilní duplexy s doménami mRNA transkriptu jaderného protoonkogenu. Ještě výhodněji jsou antisenzní oligonukleotidy podle vynálezu specifické pro mRNA transkripty *c–myc* nebo *c–myb* protoonkogenů. Nejvýhodněji jsou antisenzní oligonukleotidy podle vynálezu specifické pro mRNA transkripty *c–myc* protoonkogenu.

S výhodou jsou cmyc antisenzní oligonukleotidy administrovány lokálně na místo, kde dochází k nepřiměřené syntéze proteinů extracelulární matrice.

Vynález zahrnuje způsob prevence selhání místa hemodialyzačního přístupu a vaskulárních štěpů stykem místa hemodialyzačního přístupu nebo vaskulárního štěpu s oligonukleotidem, komplementárním k jaderné protoonkogenové mRNA, buď *ex vivo*, nebo *in vivo* v lidské bytosti. Vynález navíc zahrnuje prostředky, obsahující místa hemodialyzačního přístupu, vaskulární štěpy nebo vyřízlé, s lidskou tkání kompatibilní, žíly a oligonukleotidy podle vynálezu ve složkách nebo tkáních takových struktur.

Vynález dále zahrnuje způsob redukce vzniku jizev v lidské tkáni podáním terapeuticky efektivního množství oligonukleotidu, antisenzního k protoonkogenu, do tkáně.

Vynález také zahrnuje způsob inhibice vzniku fibrózní spojovací tkáně podáním terapeuticky efektivního množství oligonukleotidu, antisenzního k protoonkogenu.

Stručný popis obrázků

Obr. 1 ukazuje příklad arteriovenózního štěpu před a po arterializaci a ztrátu průchodnosti v žílové doméně štěpu.

Obr. 2a ukazuje fotografii průřezu normální prasečí žíly, barvené Verhoffovým barvivem (zvětšeno 10x).

Obr. 2b ukazuje průřez arterializované prasečí žíly, barvené Verhoffovým barvivem (zvětšeno 5x).

Obr. 3a ukazuje fotografii průřezu normální prasečí žíly, barvené Sirriovou červení (zvětšeno 5x).

Obr. 3b ukazuje fotografii průřezu arterializované prasečí žíly, barvené Sirriovou červení (zvětšeno 5x).

Obr. 4a ukazuje fotografii průřezu normální prasečí žíly, barvené protilátkami proti α–aktinu (zvětšeno 10x).

Obr. 4b ukazuje fotografii průřezu arterializované prasečí žíly, barvené protilátkami proti α–aktinu (zvětšeno 5x).

Obr. 4c ukazuje fotografii průřezu normální prasečí žíly, barvené protilátkami proti desminu (zvětšeno 10x).

Obr. 5a ukazuje fotografii průřezu arterializované prasečí žíly, barvené protilátkami proti jadernému antigenu proliferující buňky (PCNA) (zvěšeno 25x).

Obr. 5b ukazuje fotografii průřezu arterializované prasečí žíly, barvené Verhoffovým barvivem (zvětšeno 25x).

Obr. 5c ukazuje fotografii průřezu arterializované prasečí žíly, barvené Sirriovou červení (zvětšeno 25x).

Obr. 6a ukazuje fotografii průřezu lidské žíly z aortokoronárního štěpu, barvené Verhoffovým barvivem (zvětšeno 5x).

Obr. 6b ukazuje fotografii průřezu lidské žíly z aortokoronárního štěpu, barvené Sirriovou červení (zvětšeno 5x).

Obr. 6c ukazuje fotografii průřezu lidské žíly z aortokoronárního štěpu, barvené protilátkami proti α–aktinu (zvětšeno 5x).

Obr. 6d ukazuje fotografii průřezu lidské žíly z aortokoronárního štěpu, barvené protilátkami proti PCNA (zvětšeno 50x).

Obr. 7a ukazuje fotografii průřezu orgánové kultury prasečí žíly, podrobené působení PDGF (od destiček odvozeného růstového faktoru) a barvené protilátkami proti PCNA (jadernému antigenu proliferující buňky) a dobarvené hematoxilynem a eosinem (zvětšeno 50x).

Obr. 7b ukazuje fotografii průřezu orgánové kultury prasečí žíly bez působení PDGF, barvené protilátkami proti PCNA a dobarvené hematoxilynem a eosinem (zvětšeno 25x).

Obr. 7c ukazuje fotografii průřezu arterializované prasečí žíly, vystavené působení PDGF a oligonukleotidu (sekvence ID No:1) a barvené protilátkami proti PCNA a dobarvené barvivy hematoxilynem a eosinem (zvětšeno 50x).

Obr. 8a ukazuje fotografii průřezu orgánové kultury žíly, dvě sekundy vystavené působení fluoresceinem koncově značeného oligonukleotidu (sekvence ID No:1)(zvětšeno 25x).

Obr. 8b ukazuje fotografii průřezu orgánové kultury lidské žíly, 30 minut vystavené působení fluoresceinem koncově značeného oligonukleotidu (sekvence ID No:1) (zvětšeno 25x).

Obr. 8c ukazuje fotografii průřezu orgánové kultury lidské žíly, jednu hodinu inkubované s fluoresceinem koncově značeným oligonukleotidem (sekvence ID No:1) (zvětšeno 25x).

Obr. 8d ukazuje fotografii průřezu prasečí žíly, dvě hodiny perivaskulárně injektované fluoresceinem koncově značeným oligonukleotidem (sekvence ID No:1) (zvětšeno 25x).

Obr. 9a ukazuje fotografii průřezu prasečí žíly, dvě hodiny perivaskulárně injektované fluoresceinem koncově značeným oligonukleotidem (sekvence ID No:1) (zvětšeno 50x).

Obr. 9b ukazuje fotografii průřezu prasečí žíly, podkožně administrované fluoresceinem koncově značeným oligonukleotidem (sekvence ID No:1) dvě hodiny po injekci (zvětšeno 50x).

Obr. 10 ukazuje fotografii průřezu typické kontroly (to jest po injekci senzního oligomeru) prasečí koronární arterie jeden měsíc po poranění.

Obr. 11 ukazuje fotografii průřezu typické prasečí koronární arterie, vystavené antisenznímu působení.

Obr. 12 ilustruje maximální neiontimální oblast jako funkci stupně poranění.

Obr. 13 ukazuje efekt antisenzních oligonukleotidů, cílených na oblast iniciace translace c–*myc* mRNA na extracelulární hladiny prokolagenu I, prokolagenu III a fibronektinu v post-

konfluentních lidských buňkách hladkého svalstva. Prokolagen I a prokolagen III byly v upraveném médiu určeny Western–blotem, zatímco fironektin byl měřen imunoprecipilací.

Obr. 14 ukazuje sekvenčně specifický efekt c–*myc* antisenzních oligonukleotidů na kolagen typu I. Lidské buňky hladkého svalstva se inkubovaly 24 hodin s různými kontrolními oligonukleotidy (16 μM) včetně senzních, 4bp chybně spárovaných a scramblovaných sekvencí a antisenzních oligonukleotidů (16 μM), cílených na různé oblasti c–*myc* mRNA. Hladiny kolagenu typu I s v médiu měřily po upraveném štěpení pepsinem s použitím Western–blotu. *Horní obrázek*: Bloty ukazují α řetězce kolagenu. Linie 1: žádné oligonukleotidy; linie 2: senzní oligonukleotidy; linie 3: 4bp chybně spárované ODN (oligonukleotid); linie 4: scramblované oligonukleotidy; linie 5: antisenzní cílení na oblast iniciaci translace c–*myc* mRNA (poloha 559–573, AS1); linie 6: antisenzní cílení na exon 1 (poloha 400–419, AS2); linie 7: antisenzní cílení na exon 3 (poloha 1264–1283, AS3). *Dolní obrázek:* Histogramy, zobrazující procenta změny kontrolních hodnot (bez oligonukleotidů), získané z denzitometrických měření 3 separátních pokusů (průměr ± SEM). Mis: 4bp chybně spárované oligonukleotidy; Scr: scremblované oligonukleotidy.

Obr. 15 ukazuje inhibici c–*myc* proteinu antisenzními oligonukleotidy (AS1). Postkonfluentní buňky hladkého svalstva se inkubovaly 24 hodin s nebo bez antisenzních oligonukleotidů. P62 c–*myc* se určil imunoprecipitací jaderných extraktů, značených [^{35}S]–methioninem a je ukázán na autoradiogramu SDS–polyakrylamidového gelu.

Obr. 16 ukazuje metabolický stav buněk hladkého svalstva následně po oligonukleotidech. Buňky se inkubovaly 4 hodiny s nebo bez oligonukleotidů (16 μM) a značily [^{35}S]–methioninem 16 hodin. Radioznačené proteiny se měřily po precipitaci TCA. Antisenzní oligonukleotidy nevykázaly žádný efekt na inkorporaci methioninu do protein, což ukazuje normální metabolickou aktivitu buněk hladkého svalstva. Údaje ukazují dpm/10^5 buněk (průměr ± SEM ze dvou oddělených pokusů: S: senzní; MIS: chybně spárovaný; SCR: scramblované; AS1: antisenzní oligonukleotidy cílené na oblast iniciace translace c–*myc*, mRNA.

Obr. 17 ukazuje obnovu kolagenu typu I po odstranění c–*myc* antisenzních oligonukleotidů (AS1). Buňky hladkého svalstva se inkubovaly 24 hodin s nebo bez antisenzních oligonukleotidů (16 μM). Po 3 promytích se přidalo médium bez oligonukleotidů a po 24 hodinách se oddělilo. Kolagen typu I se určil Western–blotem po štěpení pepsinem. Po odstranění c–*myc* antisenzních oligonukleotidů se pozoruje úplná obnova kolagenu typu I.

Obr. 18 ukazuje efekt c–*myc*, antisenzních oligonukleotidů na hladiny proα_1(I) a pro α_2(I) mRNA. Veškerá RNA se izolovala z buněk hladkého svalstva, inkubovaných 24 hodin s nebo bez oligonukleotidů (16 μM) a analyzovala Northern–blotem (10 μg/linie). Antisenzní oligonukleotidy (AS1) neměly žádný vliv na hladinu proα_1(I) a pro α_2(I) mRNA. Pokusy konané 6 hodin po antisenzním působení poskytly podobné výsledky. 7S RNA nevykázala žádnou změnu.

Obr. 19 ukazuje extracelulární a intracelulární proteiny značené prolinem [^{14}C]. Lidské buňky hladkého svalstva se inkubovaly 16 hodin s nebo bez oligonukleotidů, potom se značily [^{14}C] prolinem další 4 hodiny v médiu bez séra. Proteiny značené prolinem [^{14}C] se analyzovaly na polyakrylamidových SDS gelech. Pozorovala se inhibice radioznačených proteinů v upraveném médiu, která byla provázána zvýšenou hladinou intracelulárního prokolagenu α_1(I) a α_2(I) po c–*myc* antisenzním působení.

Obr. 20 ukazuje obsah hydroxyprolinu v lidských buňkách hladkého svalstva po antisenzním působení a v buňkách kontrolních.

Obr. 21 ukazuje efekt c–*myc* antisenzního působení na hladinu extracelulárního kolagenu typu I ve fibroblastech lidské kůže.

Obr. 22 ukazuje hladinu intracelulárního a extracelulárního prokolagenu ve spojení s fibroblasty lidské kůže po c–*myc* antisenzním působení a s fibroblasty kontrolními.

Obr. 23 ukazuje termální stabilitu intracelulárního prokolagelu ve fibroblastech lidské kůže. Pepsinem čištěný prokolagen z buněk po nebo bez působení oligonukleotidů se 2 minuty inkuboval s trypsinem a chymotrypsinem za určené teploty a dělil se elektroforézou na polyakrylamidovém SDS gelu. Bez ohledu na působení oligonukleotidů se pozorovaly podobné teploty tání (to jest okolo 41 °C), což naznačuje konformaci normálního triple–helixu α řetězců prokolagenu po působení c–*myc* antisenzních oligonukleotidů.

Obr. 24 ukazuje hladinu prokolagenu α_1(I) mRNA ve fibroblastech lidské kůže po působení c–*myc* antisenzních oligonukleotidů a ve fibroblastech kontrolních.

Obr. 25 ukazuje obnovu kolagenu typu I ve fibroblastech lidské kůže pro c–*myc* antisenzní působení a ve fibroblastech kontrolních 24 hodin po působení oligonukleotidů a vystavení čerstvému médiu bez oligonukleotidů.

Obr. 26 ukazuje průřez prasečí koronární arterií a perivaskulárních tkání. Distribuce c–*myc* antisenzních oligonukleotidů (sekvence ID No:1) se stanovila ve stěně cévy a v přilehlých perivaskulárních tkáních (zvětšeno 20x).

Obr. 27a–f ukazuje vzory distribuce c–*myc* antisenzních ODN (sekvence ID No:1) v koronárních arteriích 30 minut po transkatétrové administraci. Obr. a, b. Fázový kontrast a fotomikrografie fluorescenční mikroskopie stejné sekce ukazují transmurální lokalizaci fluoresceinem značených oligonukleotidů. Antisenzní oligonukleotidy jsou přítomny v médiu, adventicii a v perivaskulárních tkáních. Obr. c, d: Fázový kontrast a fotomikrografie fluorescenční mikroskopie ukazují subintimální, netransmurální distribuci oligonukleotidů. Oligonukleotidy jsou detekovatelné pouze v médiu. Obr. e, f: Fázový kontrast a fotomikrografie fluorescenční mikroskopie ukazují středostěnovou, netransmurální přítomnost oligonukleotidů (zvětšeno 62,5x).

Obr. 28a a 28b ukazuje setrvání c–*myc* antisenzních oligonukleotidů v arteriální stěně 3 dny po transkatétrové administraci. Obr. a, b: Fázový kontrast, respektive fotomikrografie fluorescenční mikroskopie stejného řezu (zvětšeno 62,5 x).

Obr. 29 ukazuje histogram, zobrazující cévní a perivaskulární radioaktivitu po intramurální administraci ^{35}S–značených fosforothioátových c–*myc* antisenzních oligonukleotidů. Podobný celkový obsah ODN je pozorován po 30 minutách (prázdný sloupec; n = 6) a po 3 dnech (plný sloupec; n = 4) po jejich aplikaci kvůli cestování z perivaskulárního prostoru do stěny cévy. Výsledky jsou uváděny jako průměr ± SEM.

Obr. 30a–d ukazuje zachování vaskulárních struktur po transkatétrové administraci c–*myc* antisenzních oligonukleotidů. Obr. a: Fluorescenčně značené oligonukleotidy jsou jasně zřetelné v koronární vzdušnicové stěně 30 minut po injekci. Obr. b: Přilehlé sekce ukazují zachovanou vnitřní elastickou vrstvu a normální orientaci elastických tkání bez narušení (Verhoffovo barvivo). Obr. c: V místě retence ODN byl pozorován mírný pokles cytoplazmového zbarvení a jaderná pyknóza (hematoxylinové a eosinové barvivo). Obr. d: Řez přilehlý řezu, ukázanému na obr. 19, zobrazuje rozlišení výše uvedených změn 3 dny po podání oligonukleotidů (hematoxylinové a eosinové barvivo, zvětšeno 50x).

Obr. 31 ukazuje intercelulární lokalizaci fluoresceinem značených c–*myc* antisenzních oligonukleotidů, stanovených konfokální mikroskopií vaskulárních buněk hladkého svalstva *in vitro*.

Obr. 32 ukazuje intracelulární lokalizaci fluoresceinem značených c–*myc* antisenzních oligonukleotidů 30 minut po intramurálním podání oligonukleotidů *in vivo*, jaderná lokalizace je viditelná v mediálních buňkách hladkého svalstva.

Obr. 33 ukazuje intracelulární lokalizaci fluoresceinem značených c–*myc* antisenzních oligonukleotidů 30 minut po intramurálním podání oligonukleotidů *in vivo*, jaderná lokalizace je viditelná v advanticiálních buňkách.

Definice. Termín „kolagen" se zde používá pro třídu molekul, syntetizovaných z prokolagenu. Kolagen se syntetizuje z prokolagenu extracelulárně, štěpením N– a C–konců vně buňky. Protilátky proti triple–helikální oblasti kolagenu rozpoznávají také triple–helikální oblast prokolagenu. Protilátky zde používané jsou buď specifické pro kolagen I a prokolagen I, nebo kolagen III a prokolagen III. Kolagen se také může syntetizovat *in vitro* z prokolagenu pepsinovým štěpením.

Termín „štěp" se zde používá pro označení vaskulárního štěpu, jako arteriovenózního nebo venózního štěpu.

Termín „nukleosid" se zde používá pro přirozené nukleosidy, včetně 2′–deoxy a 2′–hydroxylovaných forem (např. jako popisuje Kornberg, Baker, *DNA Replication,* 2nd Ed., Freeman, San Francisco, 1992). „Analogy" nukleosidů zahrnují syntetické nukleosidy s modifikovanými bázemi a/nebo modifikovanými cukernými zbytky (obecně popisuje Sheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York, 1980). Takové analogy zahrnují syntetické nukleosidy, navržené k zesílení vazebných vlastností, např. stability duplexu nebo triplexu, specifity a tak podobně.

Termín „oligonukleotid" se zde používá pro lineární oligomery přirozených a modifikovaných monomerů nebo vazeb, včetně deoxyribonukleosidů, ribonukleosidů, jejich α–anomerních forem, polyamidových nukleových kyselin a tak podobně, schopných specifického vázání se k cílovému polynukleotidu prostřednictvím regulérních monomer–monomer interakcí jako Watson–Crickovo párování bází, Hoogsteenovo nebo reverzní Hoogsteenovo párování a tak podobně. Monomery jsou obvykle spojeny fosfodiesterovými vazbami nebo jejich analogy za vzniku oligonukleotidů a velikosti od několika monomerních jednotek, např. 3–4, do stovek monomerních jednotek. Kdykoli je oligonukleotid zapsán jako sekvence písmen, jako „ATGCCTG", znamená to řazení nukleotidů od 5′– do 3′–konce zleva doprava a „A" značí deoxyadenosin, „C" značí deoxycytidin, „G" značí deoxyguanosin a „T" značí thymidin, pokud není uvedeno jinak. Analogy fosfodiesterové vazby zahrnují fosforothionáty, fosforodithioáty, fosforoselenoáty, fosforodiselenoáty, fosforamilothioáty, fosforanilidáty, fosforamidáty, 3′–5′ fosforamidáty a tak podobně, jak je plně popsáno níže.

„Stabilita" ve spojení se vznikem duplexu nebo triplexu obecně znamená, jak pevně se antisenzní oligonukleotid váže na svou cílovou sekvenci; přesně to značí volnou energii vzniku duplexu nebo triplexu za fyziologických podmínek. Teplota tání za standardních podmínek, popsaných níže, je vhodným měřítkem stability duplexu a/nebo triplexu. S výhodou jsou podle vynálezu vybírány antisenzní oligonukleotidy, které mají teploty tání nejméně 50 °C za standardních podmínek, uvedených níže; při fyziologických podmínkách a preferovaných koncentracích je vznik duplexu nebo triplexu podstatně zvýhodněn oproti disociaci antisenzního oligonukleotidu a jeho cíle. Rozumí se, že stabilní duplex nebo triplex může při určitém provedení obsahovat chybné spárování bází mezi dvojicemi a/nebo, v případě triplexu, trojicemi bází. Jako v případě sekvence ID No:1, což je lidská sekvence s jedním chybným spárováním bází v posledním nukleotidu vzhledem ke srovnatelné prasečí sekvenci. S výhodou tvoří antisenzní oligonukleotidy podle vynálezu s cílovými polynukleotidy bezchybně spárované duplexy a/nebo triplexy.

Termín „syntéza", zde používaný v biologickém kontextu, značí proces vzniku biologických molekul, zejména molekul extracelulární matrice a proteinů extracelulární matrice. Termín „syntéza" zahrnuje procesy jak uvnitř, tak vně buňky, které vedou ke vzniku biologických molekul, na příklad, ale bez omezení na, transkripci mRNA, translaci mRNA, post–translační modifikaci proteinů, glykosylaci, peptidázové štěpení, extracelulární peptidové štěpení, intracelulární peptidázové štěpení, transport proteinů, sekreci proteinů a fosforylaci proteinů. S výhodou vynález inhibuje translaci proteinů molekul extracelulární matrice, post–translační procesování proteinů, sekreci proteinů a intracelulární peptidázové štěpení.

Detailní popis vynálezu. Vynález se týká použití antisenzních látek pro inhibici nepřiměřené syntézy proteinů extracelulární matrice v tkáni, zejména kolagenu, přesně kolagenu typu I a III. Nepřiměřená a/nebo nadměrná syntéza proteinů extracelulární matrice může vyústit do patologických stavů, které představují na příklad vznik nežádoucí fibrózní pojivové tkáně. Patologické stavy, obecně se vyskytují u lidí, zahrnují sklerotické poruchy, vaskulární restenózu, aterosklerózu, aterogenezi, keloidní chorobu, cirhózu jater, revmatické poruchy kloubů, ztrátu průchodnosti arteriovenózních a venózních štěpů, postchirurgické zjizvení, rekonstruktivní chirurgii a tak podobně. Různé typy tkání mohou být místem nepřiměřené syntézy, včetně vaskulárních buněk hladkého svalstva, endotelových buněk, kožních a orgánových fibroblast, na příklad při keloidní chorobě nebo při vzniku posttraumatických nebo postchirurgických jizev, synoviálních buněk a jiných kloubních složek. Jedno provedení vynálezu je zejména užitečné při prevenci selhání nebo ztráty průchodnosti arteriovenózních a venózních štěpů. Jiné provedení vynálezu je zejména užitečné při terapii restenózy, akutního vaskulárního zranění, typicky následujícího u lidí po angioplastice. Restenóza je spojena s migrací buněk hladkého svalstva do vaskulární intimy, proliferací a syntézou složek extracelulární matrice (např. Holmes et al., *PCTCA*, Chapter 12, Vliestra et al., Editors, Davis Company, Philadeplhia, 1987).

Administrací terapeuticky efektivního množství antisenzní látky do tkáně, obsahující cílový polynukleotid, je inhibována nepřiměřená (to jest nadbytečná) syntéza extracelulárního proteinu. Cílové polynukleotidy mohou být jednovláknové nebo dvouvláknové DNA nebo RNA; nicméně jsou preferovány jednovláknové DNA nebo RNA cíle. Genomové nukleotidové sekvence a mRNA transkripty jaderných onkogenů podle vynálezu jsou podle stavu techniky známy a zahrnující c–*myc*, c–*myb*, c–fos, N–*myc*, p53, c-rel, c–ski, c–ets–1, c–ets–2 a tak podobně (např. Glover, Editor, *Oncogenes,* IRL Press, Oxford, 1989). C–*myc* a c–*myb* sekvence jsou popsány v následujících odkazech: c–*myc* protoonkogenové sekvence jsou popsány v Marcu et al., *Ann. Rev. Biochem.,* 61, 809–860 (1992); Watt et al., *Nature,* 303, 725–728 (1983); Battey et al., *Cell*, 34, 779–787 (1983); Epstein et al., *NTIS publication* PB93–100576; c–*myb* protoonkogen je popsán v Gewirtz et al., patent US 5 098 890; Majello et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 79, 9636–9640 (1986). Navíc může být cílen jaderný antigen proliferující buňky, cyclin (D_1 a B_1), cdc2 kináza, cdk kináza a E2F (zde nazývány jako „geny buněčného cyklu"). S výhodou jsou jadernými protoonkogeny, cílenými antisenzními oligonukleotidy podle vynálezu, c–*myc* a/nebo c–*myb*.

Rozumí se, že cíl, na který jsou namířeny c–*myc* antisenzní oligonukleotidy podle vynálezu, zahrnuje allelické formy protoonkogenů. Výběr jednotlivých sekvencí antisenzních oligonukleotidů při znalosti sekvence cílového polynukleotidu se řídí podle literatury (např. Ulmann et al., citovaný výše; Crooke, citovaný výše; Zamecnik, Stephenson, *Proc. Natl. Acad. Sci.,* 75, 280–284 (1974)). S výhodou jsou c–*myc* antisenzní látky vybírány tak, že G–C obsah je nejméně 60 %.Výhodně jsou sekvence oligonukleotidů vybírány z 12 až 15 kontingentních bází sekvence ID No: 1, 5–7, nebo 8–11. Preferované mRNA cíle zahrnují místo 5'–čepičky, místo vázání tRNA primeru, místo iniciačních kodonu, místo splétání mRna donoru, místo splétání mRna akceptoru a tak podobně (např. Coodchild et al., patent US 4 806 463).

Při výběru antisenzních oligonukleotidů pro cílení ATG iniciačního místa lidského c–*myc* ve druhém exonu, antisenzní oligonukleotidy s následnými sekvencemi mohou být administrovány s použitím oligonukleotidů s délkou 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 nebo 35 bází a vybírány z oblasti 25 bází na obou stranách ATG místa (lidská sekvence viz Gazin et al., *E.M.B.O. Journal,* 3, 2, 383–387 (1984), sekvence je zde zahrnuta v odkazu):

5'cccgc tccagcagcc tcccgcgacg ATG cccctcaacg ttagcttcac caaca 3'

S výhodou budou antisenzní oligonukleotidy zahrnovat ATG místo. Oblasti 25 bází na obou stranách sekvence ID No: 6 a 7 se také mohou použít pro výběr oligonukleotidů o velikosti, uváděné v tomto odstavci.

Antisenzní oligonukleotidy podle vynálezu mohou zahrnovat jakoukoliv polymerní látku, schopnou specifického vázání na cílový polynukleotid prostřednictvím regulérních interakcí monomer–nukleosid, jako Watson–Crickovo párování bází, Hoogsteenovo nebo reverzní Hoogsteenovo párování bází a tak podobně. Antisenzní oligonukleotidy podle vynálezu mohou také obsahovat zavěšené skupiny nebo části, buď jako součást, nebo odděleně od základní opakující se jednotky polymeru, vedoucí ke zvýšení specifity, rezistence vůči nukleázám, dopravy nebo jiných vlastností, spojených s účinností, např. cholesterové zbytky, interkalátory duplexů jako akridin, poly–L–lysin, „kepování konce“ jednu nebo více vůči nukleázám rezistentními vazbami, jako fosforothioát a tak podobně. Sekvence určitých reprezentativních oligonukleotidů, použitelných podle vynálezu, jsou uvedeny v Seznamu sekvencí zde obsaženém.

Antisenzní oligonukleotidy podle vynálezu zahrnují jejich farmaceuticky přijatelné soli, včetně alkalických zemin, např. sodíku nebo hořčíku, amonné soli nebo NX_4^+, kde X je C_1–C_4 alkyl. Další farmaceuticky přijatelné soli zahrnují organické karboxylové kyseliny, jako kyselinu octovou, mléčnou, vinnou, jablečnou, 2–hydroxyethansulfonovou, laktobionovou a jantarovou; organické sulfonové kyseliny, jako methansulfonovou, ethansulfonovou a benzensulfonovou; a anorganické kyseliny, jako chlorovodíkovou, sírovou, fosforečnou a sulfamovou. Farmaceuticky přijatelné soli látky s hydroxylovou skupinou zahrnují anion takové látky v kombinaci s vhodným kationtem, jako Na^+, NH_4^+ a tak podobně.

S výhodou je rezistence vůči nukleázám antisenzním látkám udělena zavedením internukleosidové vazby, rezistentní vůči nukleázám. Podle stavu techniky je známo mnoho takových vazeb, např. fosforothioáty (Zon, Geiser, *Anti–Cancer Drug Design,* 6, 539–568 (1991); Stec et al., patent US 5 151 510; Hirschbein, patentu US 5 166 387; Bergot, patent US 5 183 885); fosforodithioáty (Marshall et al., *Science*, 259, 1564–1570 (1993); Caruthers, Nielsen, International application PCT/US89/02293); fosforamidáty, např. –OP(=O)(NR^1R^2)–O–, kde R^1 a R^2 je buď vodík, nebo C_1–C_3 alkyl (Jager et al., *Biochemistry*, 27, 7237–7246 (1988); Froehler et al., International application PCT/US90/03138); 3′–5′ fosforamidáty (popsána v PCT přihlášce Gryaznov et al. PCT/US95/03585, látky a způsoby jsou zde zahrnuty do odkazu); peptidové nukleové kyseliny (Nielsen et al., *Anti–Cancer Drug Design,* 8, 53–63 (1993), International application PCT/EP92/01220); methylfosfonáty (Miller et al., patent US 4 507 443; Ts′o et al., patent US 4 469 863; Miller et al., patent US 4 757 055); a P–chirální vazby různých typů, zvláště fosforothioáty (Stec et al., European patent application 92301950.9; Lesnikowski, *Bioorganic Chemistry,* 21, 127–155 (1993)). Další vazby, rezistentní vůči nukleázám, zahrnují fosforoselenoát, fosforodiselenoát, fosforanilothioát, fosforanilidát, alkylfosfotriester, jako methyl– a ethylfosfotriester, karbonát, jako karboxymethylester, karbamát, morfolino–karbamát, 3′–thioformacetát, silyl, jako dialkyl (C_1–C_6)– nebo difenylsilyl, sulfomátester a tak podobně. Takové vazby a způsoby jejich zavedení do oligonukleotidů jsou popsány v mnoha odkazech (např. přehledně uvedeny v Peyman a Ulmann, citovaný výše; Milligan et al., citovaný výše; Matteucci et al., International application PCT/US91/06855). S výhodou se v látkách podle vynálezu používají fosforové analogy fosfodiesterové vazby, jako fosforothioáty, fosforodithioáty, fosforamidáty nebo methylfosfonáty. Ještě výhodněji se jako vazba, rezistentní vůči nukleázám, používá fosforothioátová vazba. Rozumí se, že navíc k preferovaným vazebným skupinám, látky podle vynálezu mohou obsahovat další modifikace, např. báze s borem (Spielvogel et al., patent US 5 130 302); cholesterové zbytky (Shea et al., *Nucleic Acids Research,* 18, 3777–3783 (1990); Letsinger et al., *Proc Natl. Acad. Sci.,* 86, 6553–6556 (1989)); 5–propenylovou modifikaci pyrimidinů (Foehler et al, *Tetrahedron Lett.,* 33, 5307–5310 (1992)) a tak podobně.

S výhodou se antisenzní látky podle vynálezu syntetizují konvenčními postupy na komerčně dostupných automatizovaných DNA syntezátorech, např. Applied Biosystems (Foster City, CA)

model 380B, 392 nebo 394 DNA/RNA syntetizátor. S výhodou se používá fosforamiditová chemie (např. Beaucage, Iyet, *Tetrahedron,* 48, 2223–2311 (1992); Molko et al., patent US 4 980 460; Koste et al., patent US 4 725 677; Caruthers et al., patenty US 4 415 732, US 4 458 066 a US 4 973 679 a tak podobně).

V provedení, kde je žádoucí vznik triplexu, je zúžen výběr cílových sekvencí. Obecně asociace třetího vlákna prostřednictvím Hoogsteenova párování bází je stabilnější podél homopyrimidin–homopurinových úseků v dvojvláknovém cíli. Obvykle se triplety tvoří u T–A*T nebo C–G*C motivů („–„ značí Watson–Crickovou párování bází a „*“ značí Hoogsteenovo párování bází); nicméně jsou možné i jiné motivy. Hoogsteenovo párování bází na příklad umožňuje paralelní a antiparalelní orientaci mezi třetím vláknem (Hoogsteenovým vláknem) a na purin bohatým vláknem duplexu, na který se třetí vlákno váže, v závislosti na stavbách a na složení vláken. Literatura poskytuje rozsáhlé vedení při výběru vhodných sekvencí, orientace, podmínek, typu nukleosidu (např. zda použít ribonukleosidy nebo dioxyribonukleosidy), modifikací báze (např. methylovaný cytosin a tak podobně) pro maximalizaci nebo jinou regulaci stability triplexu v závislosti na jednotlivém provedení (např. Roberts et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.,* 88, 9397–9401 (1991); Robeerts et al., *Science,* 258, 1463–1466 (1992); Distefano et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.,* 90, 1179–1183 (1993); Mergny et al., *Biochemistry,* 30, 9791–9798 (1991); Cheng et al., *J. Am. Chem. Soc.,* 114, 4465–4474 (1992); Beal, Dervan, *Nucleic Acids Research,* 20, 2773–2776 (1992); Beal, Dervan, *J. Am. Chem. Soc.,* 114, 4976–4982 (1992); Giovannangeli et al., *Proc. Natl. Acad Sci.* 89, 8631–8635 (1992); Moser, Dervan, *Science,* 238, 645–650 (1987); McShan et al., *J. Biol. Chem.,* 267, 5712–5721 (1992); Yoon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 3840–3844 (1992); Blume et al., *Nucleic Acid Research,* 20, 1777–1784 (1992) a tak podobně.

Délka oligonukleotidových zbytků je dostatečná pro zajištění specifického vázání pouze k žádanému cílovému polynukleotidu, ne na nahodilých místech, jak je uvedeno v mnoha odkazech (např. Rosenberg et al., International application PCT/US92/05305; Szostak et al.., *Meth. Enzymol.* 68, 419–429 (1979)). Shora je délka omezena několika faktory, včetně nevýhody a nákladnosti syntézy a čištění oligomerů delších než 30–40 nukleosidů, větší tolerance delších oligonukleotidů vůči chybnému párování bází než u kratších oligonukleotidů, zda jsou přítomny modifikace ke zlepšení vázání a specifity, zda je žádaná tvorba duplexu nebo triplexu a tak podobně. Obvykle antisenzní látky podle vynálezu mají délku v rozmezí 12 až 60 nukleotidů. Výhodněji mají antisenzní látky podle vynálezu délku v rozmezí 15 až 40 nukleotidů a nejvýhodněji mají délku v rozmezí 18 až 30 nukleotidů.

S výhodou se tepelná stabilita antisenzních oligonukleotidů podle vynálezu určuje jako křivka tání nebo křivka disociace vláken. Teplota při disociaci 50 % vláken určuje teplotou tání T_m, která zpětně poskytuje výhodné měřítko stability. Měření T_m se typicky provádějí ve fyziologickém roztoku při neutrálním pH s koncentrací cílového a antisenzního oligonukleotidu mezi 1,0–2,0 μM. Typické podmínky jsou následující: 150 mM NaCl a 10 mM $MgCl_2$ v 10 mM sodnofosfátovém pufru (pH 7,0) nebo v 10mM Tris–HCl pufru (pH 7,0), nebo podobné podmínky. Údaje pro křivky tání se shromažďují při zahřívání vzorku komplexu antisenzní oligonukleotid/cílový polynukleotid od pokojové teploty do 85–90 °C. Se vzrůstající teplotou vzorku se odečítá absorbance při 260 nm v intervalech 1 °C, např. s použitím Cary (Austrálie) modelu 1E nebo Hewlett–Packard (Palo Alto, CA) modelu HP 8459 UV/VIS spektrofotometru a modelu HP 89100A regulátoru teploty, nebo podobných zařízení. Takové techniky poskytují vhodné podmínky pro měření a srovnání vazebných sil antisenzních oligonukleotidů různých délek a různého složení.

Jiným spektrem tohoto vynálezu je farmaceutický přípravek, použitelný pro inhibici syntézy proteinů extracelulární matrice, zahrnující farmaceuticky přijatelný excipient a antisenzní oligonukleotid, specifický pro jaderný protoonkogen, který je přítomný v množství, postačujícím pro inhibici syntézy proteinů extracelulární matrice, když je administrován potřebnému subjektu. Antisenzní oligonukleotidy podle vynálezu se používají jako jedna nebo více složek takového farmaceutického přípravku. Složky farmaceutického přípravku podle vynálezu závisí na několika

faktorech, včetně povahy choroby nebo léčeného stavu, lokalizace chorobných lézí, způsobu podávání léčiva a/nebo zamýšlené administrace, která může zahrnovat *in vivo* administraci prostřednictvím katétru do cílové léze nebo orgánu, místní aplikaci, intranasální administraci, administraci implantovanými nebo transdermálními pomocnými uvolňovacími systémy, a tak podobně.

Farmaceutické přípravy podle vynálezu zahrnují farmaceutický nosič, který může obsahovat množství složek, umožňujících různé funkce, včetně regulace koncentrace léčiva, regulace rozpustnosti, chemické stabilizace, regulace viskozity, zlepšení absorpce, regulace pH, a tak podobně. Na příklad ve vodou rozpustných přípravcích farmaceutický přípravek s výhodou obsahuje pufr jako fosfátový pufr, nebo sůl jiné organické kyseliny, výhodně s pH mezi 7–8. Pro přípravky, obsahující špatně rozpustné antisenzní látky, se pro zlepšení rozpustnosti mohou použít mikroemulze, například neiontový surfaktant, jako Tween 80 v množství 0,04–0,05 % (w/v). Jiné složky obsahují antioxidanty jako kyselinu askorbovou, hydrofilní polymery jako monosacharidy, disacharidy a další karbohydráty včetně celulózy nebo jejích derivátů, dextrinů, chelatujících činidel jako EDTA a podobných složek známých farmaceutickým odborníkům (*Remington's Pharmaceutical Science,* poslední podání, Mack Publishing Company, Easton, PA).

Pomocné uvolňovací systémy, vhodné pro použití s farmaceutickými přípravky podle vynálezu, zahrnují semipermeabilní polymerní matrice ve formě filmu, mikrokapsulí nebo podobně, včetně polylaktidů, kopolymerů L–glutamové kyseliny a gama–ethyl–L–glutamázu, poly(2–hydroxy–ethylmethakrylátu) a podobných materiálů (např. Rosenberg et al., International application PCT US92/05305). Pomocné uvolňovací systémy také obsahují lipozomálně zachycené antisenzní látky, jak se popisuje např. v Liposome Technology, Vol. II (*Incorporation of Drugs, Proteins and Genetic material,* CRC Press).

Efektivní množství c–*myc* antisenzního oligonukleotidu pro jednotlivé aplikace závisí na několika faktorech, včetně chemické povahy antisenzního oligonukleotidu, léčené poruchy, způsobu administrace a tak podobně. S výhodou efektivní množství poskytne koncentraci c–*myc* antisenzního oligonukleotidu mezi 1–100 μM na cílový polynukleotid, výhodněji efektivní množství poskytne koncentraci antisenzního oligonukleotidu mezi 1–10 μM na cílový polynukleotid.

Při vaskulárních poruchách, jako restenóze, jsou antisenzní oligonukleotidy, specifické pro jaderné protoonkogeny, s výhodou administrovány lokálně k traumatizované arterii prostřednictvím katétru. S výhodou jsou antisenzní oligonukleotidy dopravované k lézím restenózy c–*myc* a/nebo c–*myb* specifické, výhodněji se používá kombinace antisenzních oligonukleotidů, specifických jak pro c–*myc*, tak pro c–*myb* k redukci syntézy proteinů extracelulární matrice, spojené s restenózou. Typicky se restenóza objevuje po procedurách, jako je podkožní transluminální koronární angioplastice (PTCA), která způsobuje lokální porušení nebo poranění arteriální stěny. Jako odpověď na takové poranění často vzniká okluzivní léze kvůli následujícím jevům: zápal arterie v místě poranění, trombóza, nahromadění buněk hladkého svalstva migrací a proliferací a syntéza extracelulární matrice buňkami hladkého svalstva a fibroblasty.

Při poruchách vaskulárního štěpu jsou oligonukleotidy s výhodou dopravovány do pojivové tkáně, obklopující štěp k prevenci selhání štěpu. Obecně k selhání štěpu dochází, když ztráta průchodnosti dosáhne 50 % a více. Ukazuje se, že dodávání oligonukleotidu technikami zde popsanými může být cíleno na arteriovenózní štěpy jako, ale bez omezení na, protetické píštěle (včetně PTFE, Goretxu nebo Impry, poly–(ether–urethanu), dakronu, lidské pupeční šňůry, geneticky manipulované žíly a hovězí a prasečí cévy s potlačenou imunitou), arteriovenózní shunty, přirozené žílové píštěle (včetně radiální artero–cefalické žíly (Brescia–Cimino), ulnární nebo radiální artero–basické žíly, brachiální arteco–cefalické nebo brachiální žíly a femorálních artero–safenózních štěpů) a venózní štěpy jako, ale bez omezení na, žílové štěpy, používající safenózní žílové alloštěpy s potlačenou imunitou, pupeční žílové alloštěpy s potlačenou imunitou, geneticky modifikované žíly, xenoštěpy s potlačenou imunitou a žílové autoštěpy a jakékoli další

žíly kompatibilní s lidmi, to jest transplantační tkáně a materiály schopné transplantace do lidské tkáně.

Po perivaskulární administraci oligonukleotidů při prevenci selhání vaskulárního štěpu, zejména selhání arteriovenózního štěpu, jsou oligonukleotidy podle vynálezu obecně injektovány do perivaskulární tkáně, obklopující místo zamýšlené aplikace. V případech indikace kontinuální infuze oligonukleotidu, jako u pacientů s podstatnou a rychlou ztrátou průchodnosti arteriovenózního štěpu, se používají jiné typy dopravovacích systémů, jako podkožní infuzní pumpy, gelové a biodegradabilní matrice nanesené na štěp a s výhodou smíchané s lidským sérumalbuminem v poměru oligonukleotidu k proteinu 1:10 až 1:100, gely (jako pluronické Hydron nebo ethylen–vinylacetátové gely), gely (jak popisuje Edelmen et al., *Circulation Research,* 76, 176–182 (1995); Edelman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 3773–3777 (1990); metody jsou zahrnuty do odkazu), obývací katétrové systémy (jako Broviacovy katétry nebo kompletně obývací katétrové rezervoárové systémy, jako popisuje Poletti et al., *J. Neurosurg,* 55, 581–584, metody jsou zahrnuty do odkazu), impregnované PTFE hadice, další impregnované biokompatibilní materiály nebo jiné prostředky a systémy dopravování léčiva zde popsané. Ukazuje se, že v blízkosti místa může vytvořit rezervoár pro uvolňování oligonukleotidu, aby se zvýšila doba trvání administrace oligonukleotidu. Rezervoár se může jednoduše vytvořit injekcí oligonukleotidu do perivaskulární tkáně během a po chirurgickém zákroku, ale před uzavřením rány, nebo podkožní injekcí po nahmatávání arteriovenózního štěpu, jako v případě arteriovenózní píštěle, nebo řízením injekce způsoby podle stavu techniky známými, např. sonogramy. Injekce se při rozsáhlejší terapii může opakovat, např. v místech hemodialyzačního přístupu. Není nutné nebo žádoucí odstranit adventicii z cévy, neboť perivaskulární tkáň může sloužit jako depot nebo rezervoár oligonukleotidu, který má relativně nízkou rychlost difuze. Oligonukleotid v rezervoáru je také mnohem pomaleji unášen oběhovým systémem, než při administraci intraluminálním katétrem. Při podkožní nebo perivaskulární administraci je administrovaná dávka v rozmezí 0,1 až 100 mg na cévu, výhodně 0,25 až 50 mg a výhodněji 0,5 až 10 mg na jednu administraci.

Vedle administrace oligonukleotidu perivaskulární tkání po prevenci selhání štěpu se jako rezervoár používají další anatomické struktury, jako endotelová vrstva, média a adventicia, zejména když oligonukleotid není aplikován z lumene cévy. Přirozeně se vyskytující rezervoárová místa, včetně perivaskulární tkáně, jsou užitečná zejména při terapii arteriovenózních štěpů, zvláště arteriovenózních shunt, kde médiová nebo elastická vrstva je, přes chirurgický zásah, neporušena a nerozřazená. Zejména je výhodné použití míst blízko žílové domény arteriovenózního štěpu, zvláště žílové domény arteriovenózního shuntu nebo píštěle. Žílová doména arteriovenózního píštěle vytváří žílovou část píštěle, jak ukazuje šipka na obr. 1. Ukazuje se, že nepřirozeně se vyskytující rezervoáry také mohou selhávajícímu štěpu dodávat oligonukleotid, jak ukazuje šedá oblast na obr. 1, příklady jsou zde diskutovány. Při použití nepřirozeně se vyskytujících rezervoárů je výhodou buď jejich biodegradabilita, nebo možnost opětovného naplnění. Opětovně naplnitelné rezervoáry jsou s výhodou dvou typů 1) opětovně naplnitelný rezervoár, upevněný po směru žílové domény arteriovenózního štěpu a v nebo podél PTFE hadice nebo jiného biokompatibilního materiálu použitého pro arteriovenózní štěp, 2) rezervoár upevněný v perivaskulární tkáni, obklopující arteriovenózní štěp, výhodně v 5 cm od žílové domény arteriovenózního štěpu a ještě výhodněji ve 2 cm, opětovně naplnitelný jehlou při podkožní injekci. Takové nepřirozeně se vyskytující perivaskulární rezervoáry se implantují během chirurgického zákroku při vytváření arteriovenózního štěpu. Opětovně naplnitelné perivaskulární rezervoáry se vytvářejí z materiálů, používaných v hrudních implantátech, a jsou s výhodou používány ve spojení se semipermeabilní membránou, která umožňuje difuzi oligonukleotidu do perivaskulární tkáně.

Při *ex vivo* aplikaci oligonukleotidů pro prevenci selhání vaskulárních štěpů, tvořených žílami, zejména při procedurách bypassu, jsou žíly kontaktovány *ex vivo* s oligonukleotidem, komplementárním k jadernému protoonkogenu mRNA. Obecně jsou žíly inkubovány alespoň 10 minut při teplotě 20 až 37 °C ve sterilním fyziologicky přijatelném pufru. Kratší doby jsou přípustné při obzvlášť vysokých koncentracích. Delší inkubační doby mezi 30 až 90 minutami jsou také

vhodné a kompatibilní s dobou zpoždění mezi vyjmutím žíly a transplantací v takových procedurách. Nižší inkubační teploty, jako 4 °C, jsou také použitelné, zejména když žíla musí být transportována ze vzdáleného donorního místa, ve spojení s obecně vyššími koncentracemi oligonukleotidu. Obecně se koncentrace pohybují od 5 do 500 μM v závislosti na délce inkubace, typu oligonukleotidu a na teplotě. S výhodou jsou inkubační doby 30 až 60 minut při teplotách v rozmezí 22 až 37 °C. Výhodně se koncentrace oligonukleotidu pohybuje v rozmezí 10 až 100 μM a výhodněji 25 až 100 μM. Ukazuje se, že je použitelných mnoho typů fyziologicky přijatelných pufrů, jako 0,9 % sodný (NaCl) nebo fosfátový fyziologický pufr a další pufry a soli zde popsané. Ukazuje se, že podle vynálezu je použitelných mnoho typů žil, včetně žil nelidských, žil z geneticky manipulovaných savců, zejména vepřů, a mnoho lidských žil pro vytvoření alloštěpů a autoštěpů (jako safenózní žíla, cefalická žíla, basilická žíla, brachiální žíla a femorální žíla).

Při intravaskulární aplikaci (např. pro prevenci restenózy po angioplastice), jsou antisenzní oligonukleotidy s výhodou administrovány do blízkosti léze prostřednictvím katétru zevnitř lumene, nebo skrz advanticiu (to jest nejvnější vrstvu stěny cévy) s materiály, napomáhajícími pomalému uvolňování antisenzní látky (např. pluronický gelový systém, jako popisuje Simons et al., *Nature*, 359, 67–70 (1992), nebo porézní balonek nebo iontoforetický balonek, jak popisuje Fernandez–Ortiz et al., *Circulation,* 89, 1518-1522 (1994); metody jsou zde zahrnuty v odkaze). Další techniky pomalého uvolňování pro lokální podávání zahrnují stenty, obalené antisenzní látkou, např. s použitím ovinutí nebo gelu (Wilensky et al., *Trends in Cardiovascular Med.*,3, 163–170 (1993). Dávka dopravovaná k cílové lézi je v rozmezí 1 μg až 10 mg pro každou nebo obě antisenzní látky, použité ve farmaceutickém přípravku. S výhodou je dávka v rozmezí 1 μg až 1 mg; ještě výhodněji je dávka v rozmezí 1 μg až 10 μg. S výhodou je doba dopravování v rozmezí 30 sekund až 60 minut; ještě výhodněji je v rozmezí 30 sekund až 1–2 minut (např. Zalewski et al., str. 79–87, *Coronary Angioplasty,* Goldberg, Editor, Davis, Philadelphia, 1988).

Při katétrové administraci je administrovaná dávka v rozmezí 0,1 až 10 mg na arterii, výhodně 0,25 až 4 mg na arterii a ještě výhodněji 0,5 až 3 mg na arterii. Administrovaná dávka je množství léčiva aplikované do tkáně, kde jako „dávka dopravovaná k cílové lézi" je v množství léčiva v tkáni po podání do tkáně.

Techniky koronární angioplastiky jsou odborníkům podle stavu techniky dobře známy a detailně jsou popsány v zevrubných pojednáních (Clark, *Coronary Angioplasty,* Liss, New York, 1987; Vliestra et al., citovaný výše a tak podobně).

Při nadbytečné formaci jizev v kůži, např. postchirurgických jizev, keloidní chorobě, a tak podobně, je pro inhibici syntézy proteinů extracelulární matrice, zejména syntézy kolagenu, kožními fibroblasty, preferovaná povrchová aplikace nebo aplikace do kůže.

Při povrchové aplikaci je administrovaná dávka (množství léčiva aplikované do tkáně) obecně v rozmezí 0,01 μg až 10 mg léčiva na cm^2, výhodně 0,2 μg až 7 mg léčiva na cm^2 a ještě výhodněji 0,5 mg až 4 mg léčiva na cm^2. Administrovaná dávka pro použití s postchirurgickým obvazem je výhodně 0,2 až 4mg léčiva na cm^2. Administrovaná dávka pro použití s povrchovými krémy při kožních abrazích, kožních lézích, akné a postchirurgické terapii je výhodně 0,5 až 3 mg léčiva na cm^2.

Při urologických poruchách, vedoucích k uretrálnímu, uretrálnímu zjizvení nebo zúžení nebo k zjizvení nebo zúžení měchýře, je preferovaná lokální administrace prostřednictvím katétru nebo implantáty, obalenými antisenzním oligonukleotidem.

Při nadbytečné zjizvení vnitřních orgánů, obsahujících buňky hladkého svalstva a fibroblasty, jako gastrointestinální orgány, žlučovody, plíce a játra, je administrace antisenzních látek systemická nebo lokální. Lokální administrace zahrnuje přímou injekci antisenzních oligonukleotidů

do cílového orgánu, dopravování implantovanými gely nebo polymery nebo pomalé uvolňování z obalených stentů nebo jiných prostetických materiálů.

Pro každou z výše popsaných poruch jsou kritéria pro výběr pacientů pro terapii a prostředky dosažení terapeutických cílů podle stavu techniky specifických poruch dobře známa. Na příklad při vaskulární restenóze faktory, spojené s náchylností k stavům, zahrnují mužské pohlaví, rozšířené při stenóze bypassového štěpu, základní linii Canadia Hearty třídy 3 nebo 4 a infarkty myokardu (Holmes et al., Chapter 12 in Vliestra et al., editors *PTCA*, Davis Company, Philadelphia, 1987). Účinnost terapie se stanovuje stejným způsobem jako při jiné PTCA technice. Obvykle se výsledky určují vizuálně, ale jsou k dispozici další techniky. Stanovení selhání místa hemodialyzačního přístupu zahrnuje barevný Dopplerův ultrazvuk, kontrastní angiografii a ultrazvuk (např. Dousset et al., *Radiology*, 181, 89 (1991); Nonnast–Daniel et al., *Lancet*, 339 (8786), 143 (1992); Davidson et al., *Kidney International*, 40, 91–95 (1991); metody jsou zde zahrnuty do odkazu) a fyzické nálezy (jako silně zvýšený bruit přes místo přístupu nebo pulz „vodního kladiva"). Stanovení vážnosti stenózy nebo restenózy (pro určení kandidáta pro PTCA nebo výsledků PTCA) se provádí v rozmezí od vizuálního pozorování lézí po komplexní počítačovou analýzu rozměrů v úvahu přicházející arterie, např. z tomografických údajů, průtoku v distálním vaskulárním řečišti, denzitometrické charakteristiky stenózy, regionální změny pohybu stěny v zóně léze (např. Bove, Chapter 9 in Vliestra et al., citováno výše).

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Remodelování arterializované prasečí žíly – *in vivo* model pro ztrátu průchodnosti arteriovenózních štěpů.

Pro demonstraci účinnosti oligonukleotidu podle vynálezu při redukci produkce proteinu extracelulární matrice v žílové doméně arteriovenózního štěpu, se nejprve vyvinul *in vivo* prasečí model. Tento model umožňuje monitorování průchodnosti arteriovenózního štěpu včetně žílové domény štěpu.

V prasečím arterializovaném žílovém modelu jsou safenózní žíly vyříznuty a potom anastomovány, konec–ke–konci, ke karotickým arteriím. Po ukončení chirurgického zákroku se nechal průtok arteriální krve znovu nabýt normálních arteriálních tlaků (Violaris et al., *Ann. Thorac. Surg.*, 53, 667–71 (1995); Agnelini et al., *J. Thorac. Cardivas. Surg.*, 99, 433–9 (1990); metody jsou zde zahrnuty do odkazu). Vysoký arteriální tlak v konec–ke–konci safenózním žílovém štěpu simuluje vystavení žíly vysokému arteriálnímu tlaku v arteriovenózním nebo venózním štěpu. Žílové domény venózních štěpů (n = 7) se odstranily osm dní po konstrukci štěpu a podrobily histologické analýze, pokud není uvedeno jinak. Pro srovnání se použily normální koronární žíly, nevystavené arteriálnímu tlaku.

Normální netransplantované žíly a žíly nevystavené arteriálnímu tlaku neukázaly žádnou zesílenou perivaskulární tkáň, perivaskulární prostor s malým množstvím pojivové tkáně a nespojitou adipózní tkáň, a tenkou a neporušenou médiu, jak ukazuje obr. 2a (Verhoeffovo barvivo). Žílové domény štěpů vykazovaly nárůst perivaskulární tkáně, která obklopila médiu jako límec svelkým množstvím granulované tkáně. To bylo ukázáno Verhoeffovým barvením, jak ukazuje obr. 2b. Stejný řez také vykazuje intaktní a neporušenou médiu, postrádající disekci. V některých sekcích se v 8 až 14 dnech po chirurgickém zákroku pozorovala neointima.

Normální netransplantované žíly a žíly nevystavené arteriálnímu tlaku ukázaly malé množství nepojivové perivaskulární tkáně a médiu, barvenou Sirriovou červení, jak ukazuje orb. 3a. Naproti tomu žílové domény štěpů vykazovaly nárůst uložení kolagenu v perivaskulární tkáni již

po osmi dnech. Velká množství hustého perivaskulárního kolagenu se barvila Sirriiovou červení, specifickým barvivem pro fibrilární kolagen (včetně typu I a III), jak ukazuje obr. 3b. Média vykazovala menší zbarvení než perivaskulární tkáň. V řezu s neointimou byl kolagen zřetelně přítomen.

Normální netransplantované žíly a žíly nevystavené arteriálnímu tlaku neukázaly žádný α–aktin v perivaskulárních vrstvách a vrstvách adventicie s použitím protilátek proti α–aktinu. Pozitivně na α–aktin se barvily pouze buňky hladkého svalstva v médii, jak ukazuje obr. 4a. Naproti tomu žílové domény štěpů vykazovaly nárůst syntézy α–aktinu v médii a v adventicii. Velká množství α–aktinu v médii se barvila protilátkami, specifickými proti α–aktinu, jak ukazuje obr. 4b. Zbarvení média indikuje přítomnost buněk hladkého svalstva, syntetizujících α–aktin v médií. Také adventicia vykazovala zbarvení na α–aktin, což indikovalo myofibroblastovou syntézu α–aktinu. Také perivaskulární tkáň vykazovala zbarvení na α–aktin.

Žíly se také barvily na desmin, který je exprimován buňkami hladkého svalstva, s použitím anti–desminových protilátek. Normální netransplantovaná žíla a žíla nevystavená arteriálnímu tlaku ukázala zbarvení na desmin pouze v médii, jak ukazuje obr. 4c. Podobné žílové domény venózních štěpů vykázaly zbarvení na desmin v buňkách hladkého svalstva pouze v médii. Velká množství buněk hladkého svalstva v médii se barvila pozitivně protilátkami proti desminu, údaje nejsou uvedeny. Žádné zbarvení na desmin se nepozorovalo v perivaskulární tkáni nebo adventicii, což indikovalo dvě populace buněk, syntetizujících α–aktin: jedna populace, lokalizovaná v médii (buňky hladkého svalstva; pozitivní na desmin, pozitivní na α–aktin) a jedna populace, lokalizovaná v advaticii (fibroblasty a myofibriblasty; negativní na desmin; pozitivní na α–aktin).

Žílové domény štěpů vykazovaly nárůst proliferace buněk v médii a perivaskulární tkáni. Velké množství proliferujících buněk v médii a perivaskulární tkáni se barvila protilátkami, specifickými na jaderný antigen proliferující buňky (PCNA), marker buněčné proliferace, jak ukazuje obr. 5a. Pro srovnání se podobný řez barvil Verhoeffovým barvivem, obr. 5b a Sirriovou červení, obr. 5c. V tomto řezu se pozoruje raný vznik neointimy, na obr. 5b jako tenká tmavá vrstva několik buněk od lumene transplantované žíly. Normálně neointima v žíle není. Vyšší zbarvení na kolagen v perivaskulární tkáni ve srovnání s médiou je zřetelnější při větším zvětšení, jak ukazuje Obr. 5c. Zbarvení na PCNA se kvantifikovalo: 30 % buněk v transplantovaných žilách se barvilo pozitivně na PCNA, zatímco méně než 1 % buněk v netransplatovaných žilách se barvilo pozitivně na PCNA.

Tyto výsledky potvrzují relativně raný nárůst produkce extracelulární matrice fibroblasty, myofibroblasty a buňkami hladkého svalstva v pojivové tkáni a stěně cév v transplantovaných žilách, odpovídající vysokým arteriálním tlakům. Nárůst tloušťky tkáně a buněčné proliferace okolo žíly, včetně pojivové tkáně v perivaskulárním prostoru (vznik jizev), mohou bránit žádanému rozšíření žíly v odpověď na arteriální krevní tlak.

Inhibice produkce extracelulární matrice ve vaskulárních buňkách (např. v buňkách hladkého svalstva a fibroblastech), např. syntézy kolagenu, je také specificky ukázána v příkladech 6, 9 a 13.

Příklad 2

Lidská arterializovaná žíla – model pro ztrátu průchodnosti arteriovenózních štěpů.

Pro demonstraci nárůstu produkce extracelulární matrice jako následku arterializace žil v lidech, se studovaly lidské žíly, arterializované chirurgickými bypassy. Následky z lidí jsou překvapující,

neboť zásadně nebyla detekována buněčná proliferace, nicméně v cévní stěně bylo přítomno značné zbarvení na kolagen.

Lidské safenózní žíly, které posloužily jako aortokoronární bypassový štěp, se vyjmuly z těla pacienta dva roky po diagnóze okluze. Arteriální krevní tok vystavuje žílu normálním arteriálním tlakům. Žílové domény aortokoronárních štěpů se podrobily histologické analýze.

Lidské žílové domény aortokoronárních štěpů vykazovaly nárůst v perivaskulární tkáni a neointomální tloušťku. To bylo prokázáno Verhoeffovým barvením, jak ukazuje obr. 6a. Zesílená neointima nahradila médium a je pozorovatelná ztráta průchodnosti žíly. Tato žíla je částečně okludovaná kvůli ztrátě vnitřního průměru žíly. Naproti tomu normální lidská safenózní netransplantovaná žíla a žíla nevystavená arteriálnímu tlaku nevykázala žádnou zesílenou perivaskulární tkáň a tenkou, neporušenou a nedisektovanou médiu, údaje nejsou uvedeny.

Lidské žílové domény aortokoronárních štěpů také vykazovaly velké množství kolagenu v perivaskulární tkáni a v médii. Velké množství kolagenu se barvilo pozitivně Sirriovou červení, specifickým barvivem pro fibrilární kolagen (včetně typu I a III) v perivaskulární tkáni a v médii, jak ukazuje obr. 6b.

Lidské žílové domény štěpů vykazovaly malá množství α–aktinu v neiontimě a žádný α–aktin v perivaskulární tkáni, s výjimkou pozitivního zbarvení ve vasa vasorum, protilátkami specifickými pro α–aktin, jak ukazuje obr. 6c. Nedostatek zbarvení v médii a v perivaskulární tkáni indikuje, že pouze málo buněk produkovalo α–aktin. Namísto pozitivního zbarvení na α–aktin, se tyto řezy, jak ukazuje obr. 6b, barvily výrazněji na kolagen, což indikuje, že zjizvená tkáň vyplnila jak perivaskulární tkáň, tak stěnu cévy.

Lidské žílové domény aortokoronárních štěpů nevykazovaly žádnou buněčnou proliferaci v médii a v perivaskulární tkáni. Žádné buňky v médii a v perivaskulární tkáni se nebarvily protilátkami, specifickými pro jaderný antigen proliferující buňky (PCNA), marker buněčné proliferace, jak ukazuje obr. 6d. I při zvětšení 25x bylo nalezeno několik pozitivně zbarvených buněk. Zbarvení na PCNA se kvantifikovalo a méně než 1 % buněk v transplantovaných lidských žilách se barvilo pozitivně na PCNA.

Příklad 3

Lidské a prasečí cévové orgánové kultury – model pro účinnost neluminálního dodávání oligonukleotidu a inhibici cévní odpovědi na poranění.

Pro demonstraci účinnosti oligonukleotidu podle vynálezu při redukci produkce proteinů extracelulární matrice a vaskulárního kompromisu po procedurách zavedení arteriovenózního shuntu nebo bypassu se nejprve vytvořil model orgánové kultury. Tento model umožňuje monitorování příjmu oligonukleotidu, stimulace vaskulárních buněk B–řetězcem od destiček odvozeného růstového faktoru (zde značeného „PDGF“) a inhibice PDGF stimulace vaskulárními buňkami oligonukleotidy podle vynálezu.

Pro prasečí cévovou orgánovou kulturu byly vyňaty vnitřní karotické arterie nebo arterie z prsních žláz (n = 3) a rozřezány na kroužky o tloušťce 5–15 mm. Kroužky se inkubovaly za podmínek orgánové kultury po různé časy, jak je uvedeno níže. Pro model lidské cévové kultury se vyňaly safenózní žíly z pacientů, podstupujících bypassový chirurgický zásah. Po vyjmutí se nepoužité žílové segmenty rozřezaly na kroužky o tloušťce 5–15 mm.

Po stanovení efektu c–*myc* oligonukleotidů na buněčnou proliferaci se prasečí vaskulární kroužky čtyři dny inkubovaly při 37 °C v médiu bez séra (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Médium) s antibiotiky a 1% Neutrodoma, s nebo bez PDGF (100 ng na ml), pokud není uvedeno jinak.

PDGF normálně stimuluje vaskulární buňky, např. buňky hladkého svalstva a fibroblasty k proliferaci a je známo, že jej uvolňují destičky po poranění tkáně pro léčení rány. PDGF indukovaná proliferace buněk se měřila PCNA zbarvením, jak je zde uvedeno. I po čtyřech dnech si kroužky zachovaly svou morfologii.

Prasečí cévy v orgánové kultuře odpovídaly na PDGF stimulaci. Prasečí cévy v orgánové kultuře vykázaly buňky pozitivně zbarvené na PCNA v adventicii a v médii, jak ukazuje obr. 7a. Hnědá jaderná zbarvení prezentuje PCNA zbarvené buňky, zatímco purpurově zbarvené buňky jsou zbarvené počítadlovými barvami hematoxylinem a eosinem. Procentní zastoupení buněk pozitivně zbarvených na PCNA bylo 15 ± 5 % (n = 3). Kontrola, cévy inkubované pouze v médiu bez séra bez PDGF nevykázaly žádné signifikantní PCNA zbarvení. Buněk pozitivně zbarvených na PCNA bylo méně než 1 %, jak ukazuje obr. 7b.

Oligonukleotidy podle vynálezu inhibovaly PDGF indukovanou stimulaci prasečích cévových orgánových kultur. Přídavek oligonukleotidu (sekvence ID No: 1, 16 μM) inhiboval PDGF indukovanou buněčnou proliferaci, jak ukazuje obr. 7c. Po 4 dnech inkubace s oligonukleotidy bylo PCNA zbarvení 2 ± 0,2 % buněk (n = 3; $p < 0{,}001$versus samotný PDGF).

Pro umožnění difuze oligonukleotidu do cévové stěny lidské žíly se lidské safenózní žíly inkubovaly s oligonukleotidem. Oligonukleotidy podle vynálezu rychle difundovaly do lidských žílových orgánových kultur. Přídavek fluoresceinem koncově značeného oligonukleotidu (sekvence ID No: 1, 100 μM) do média orgánové kultury vedl k rychlé, časově závislé difuzi značeného oligonukleotidu do lidských žil při inkubačních časech 2 sekundy (pokojová teplota), 30 minut (37 °C), 1 hodina (37 °C) a 3 hodiny (37 °C), jak ukazuje obr. 8a–8d. Značené oligonukleotidy difundovaly jak přes luminální povrch žil, tak přes perivaskulární povrch žil. Oligonukleotidy se po čase lokalizoval buď v buňkách, tak buněčném jádru. Kontrolní lidské žíly, inkubované bez oligonukleotidu, vykázaly malou autofluorescenci, i při uzávěrkových expozičních časech 2–3x delší než uzávěrkové časy pro žíly inkubované s oligonukleotidy.

Tyto údaje jsou v souhlase s tím, že oligonukleotidy podle vynálezu inhibují PDGF indukovanou stimulaci vaskulárních buněk ve stěně cévy. Tyto údaje také demonstrují účinnost dodávání oligonukleotidu z perivaskulární tkáně cév, místo použití luminálního dodávání oligonukleotidu. Zejména může být dodávání oligonukleotidu z perivaskulární tkáně použito *ex vivo* pro dodávání oligonukleotidů vyňatým žilám nebo arteriím, užitým při venózních štěpech nebo jiných typech vaskulárních štěpů. Navíc se může perivaskulární tkáň vystavit působení oligonukleotidů podle vynálezu *in vivo* a umožnil tak přenos oligonukleotidu do stěny cévy, pro zabránění zesílení stěny cévy a perivaskulární tkáně.

Příklad 4

Dva prasečí modely demonstrují *in vivo* perivaskulární dopravování oligonukleotidu.

Pro demonstraci účinnosti perivaskulárního dopravování oligonukleotidu podle vynálezu se testovaly dva *in vivo* prasečí modely. U prvního modelu se chirurgicky odkryla prasečí femorální žíla a oligonukleotid se vstříkl do okolní pojivové tkáně perivaskulární tkáně. U druhého modelu se chirurgický zákrok neuskutečnil a oligonukleotid se vstříkl podkožně do pojivové tkáně v okolí prasečích žil. Tyto modely umožnily monitorování příjmu oligonukleotidu po administraci buď 1) perivaskulární injektáží před nebo po konstrukci arteriovenózního štěpu před uzavřením chirurgicky manipulovaného místa, nebo 2) podkožní injektáží do perivaskulární tkáně v případě nutnosti opakované postchirurgické administrace. Koncově fluoresceinem značené oligonukleotidy (sekvence ID No: 1) se vstříkly v koncentraci 100 μM (10 mg) do obou modelů s použitím kalibrované jehly 22.

In vivo příjem oligonukleotidu byl rychlý po přímé perivaskulární aplikaci oligonukleotidu do chirurgicky odkryté žíly. Fluorescence se pozorovala v jádru buněk lokalizovaných v cévě a perivaskulární tkáni během 30 minut (údaje nejsou ukázány) a dvou hodin (obr. 9a), což indikovalo, že oligonukleotidy difundovaly přes difuzní bariéry stěny cévy a perivaskulární tkáně.

In vivo příjem oligonukleotidu byl také rychlý po podkožní injekci. Fluorescence se pozorovala v jádru buněk lokalizovaných v cévě a perivaskulární tkáni během 30 minut (obr. 9b) a tři hodin (obr. 9c), což indikovalo, že oligonukleotidy difundovaly přes difuzní bariéry stěny cévy a perivaskulární tkáně.

Tyto výsledky ustavují perivaskulární dopravování jako způsob administrace oligonukleotidů podle vynálezu do štěpů, zejména perivaskulární dopravování oligonukleotidů do arteriovenózních a venózních štěpů. Obecně oligonukleotidy mohou být vstřikovány, jak se zde ukazuje, nebo oligonukleotid mohou být dopravovány prostřednictvím jiných prostředků, které umožňují dopravování oligonukleotidu do perivaskulární tkáně, jako implantabilních rezervoárů, časem uvolňujících gelů nebo matric a oligonukleotidem impregnovaných materiálů nebo zařízení jako PTFE hadice, jak je zde diskutováno. Tyto typy způsobů perivaskulárního dopravování se mohou použít pro dopravení oligonukleotidu podle vynálezu při prevenci zesílení perivaskulární tkáně nebo stěny cévy v arteriovenózních štěpech, zejména žílových domén přístupových míst hemodialýzy, používaných u hemodialyzovaných pacientů. Úspěch podkožní injekce také indikuje účinnost opakovaného dodávání oligonileotidů do arteriovenózního štěpu, zejména přístupových míst hemodialýzy, používaných u hemodialyzovaných pacientů. Vedle uvedeného úspěšného dopravování oligonukleotidu do perivaskulárních míst žil je luminální dopravování do arterií také ukázáno v příkladech 8, 18 a 19.

Příklad 5

Klinický protokol přístupového místa hemodialýzy.

Pacienti, vyžadující přístupová místa pro hemodialýzu poprvé nebo nahrazení selhávajících míst, budou podrobeni terapii oligonukleotidy podle vynálezu. Terapii budou podrobeny buď PTFE píštěle, nebo Brescia–Cimino píštěle.

Pacienti budou dostávat oligonukleotidy o sekvenci ID No: 1, 5 nebo 6. Oligonukleotidy budou obsahovat fosforothioátové nebo fosforamidátové vazby. Lyofilizované oligonukleotidy s fosforothioátovými vazbami jsou suspendovány v pufru, jak se zde popisuje. Oligonukleotidy s fosforothioátovými nebo fosforamidátovými vazbami se syntetizují podle procedur zde diskutovaných a uchovávají se za sterilních podmínek. Oligonukleotidy s různými sekvencemi se administrují odděleně a pacienti mají během terapie dostávat pouze jednu sekvenci.

Pacientům je administrováno 1–10 mg oligonukleotidu v čase chirurgického zákroku v místě hemodialyzačního přístupu. Oligonukleotidy jsou vstřikovány do perivaskulární tkáně v žílové oblasti arteriovenózního shuntu s použitím standardní kalibrované jehly 22 nebo menší. Po vstříknutí je chirurgický zákrok ukončen. Pacientům je opakovaně administrováno 1–10 mg oligonukleotidu s použitím podkožních injekcí v týdenních intervalech po 6 měsíců. Podkožní injekce u pacientů s obtížně nahmatatelnými žilami jsou řízeny podle sonogram. Jinak se injekce řídí nahmatáváním oblasti arteriovenózního shuntu, zejména v žílové doméně shuntu.

U pacientů je během prvního roku monitorována funkční průchodnost míst hemodialyzačního přístupu. Sonogramy nebo angiogramy místa se provádějí v 1. týdnu a ve 3, 6 a 12 měsících. Rychlosti průtoku se určují s použitím Dopplerovy a ultrazvukové techniky, jak se zde diskutuje.

Oligonukleotid použitý pro administraci se vybírá a syntetizuje způsobem zde diskutovaným a podle stavu techniky známým. Sekvence a způsoby diskutované v tomto případu a dalších

příkladech by neměly být chápány jako omezení rozsahu vynálezu, ale jako specifické provedení vynálezu. Další oligonukleotidy musí být pouze konzistentní se strukturou zde navrhnout. Není nutné, aby oligonukleotidy působily určitým mechanismem účinku zde navrženého, pokud oligonukleotidy jsou příznivě testovány v *in vitro* a *in vivo* modelech zde použitých.

Příklad 6

Inhibice syntézy kolagenu v lidských buňkách hladkého svalstva.

V tomto příkladu se explantované lidské buňky hladkého svalstva, provádějící syntézu kolagenu, podrobily terapii c–*myc* nebo c–*myb* antisenzním oligonukleotidem a porovnaly s kontrolami, nepodrobenými terapii a/nebo podrobenými „senzní" terapii.

Lidské buňky hladkého svalstva (SMCc) byly získány ze safenózních žil pacientů, podstupujících běžný bypassový chirurgický zákrok. Buňky se izolovaly explantační metodou. Explantáty se umístily do mističek tkáňové kultury, obsahujících Dulbeccovo modifikované Eagle médium (DMEM) doplněné 20% zahřátím inaktivovaným fetálním hovězím sérem (FSB), 100 IU/ml penicilinu, 100 μg/ml stereptomycinu a 2 mM/ml glutaminu (CM–20). Kultury se uchovávaly při 37 °C v humidifikovaném inkubátoru s 5% CO_2. Buňky ukazovaly typické morfologické charakteristiky vaskulárních buněk hladkého svalstva, to jest tvar vřetene a vzor pahorek–a–údolí. Identifikace vaskulárních buněk hladkého svalstva byla dále potvrzena *in situ* barvením α–aktinem hladkého svalstva. Buňky rostly do konfluence a byly subkulturovány každých 7 dní. Pro experimenty se použily pouze lidské buňky hladkého svalstva z 3. nebo 4. paže.

Pokusy se prováděly se subkonfluentními a post–konfluentními lidskými buňkami hladkého svalstva. Buňky se umístily na plotny o 10 000/cm^2 (subkonfluentní) nebo 25 000/cm^2 (post–konfluentní) obohacené CM–20. Tři dny po umístění na plotny se přidal čerstvý CM–20, obsahující kyselinu askorbovou (50 μg/ml). V různých experimentech se ke kulturám přidaly následující oligonukleotidy (16 μM):

antisenzní (5′–AACGTTGAGG GGCAT)(sekvence ID No: 1);

senzní oligomer (5′–ATGCCCCTCA ACGTT)(sekvence ID No: 2);

4 bp chybně spárovaný oligomer (5′–AACGTGGATT GGCAG)(sekvence ID No: 3);

scrambled oligomer (5′–GAACGGAGAC GGTTT)(sekvence ID No: 4);

nebo c–*myb* antisenzní (5′–TATGCTGTGC CGGGGTCTTC GGGC)(sekvence ID No: 5).

O 24 hodin později se kulturační médium oddělilo pro Western bloty a buňky se podrobily analýze RNA. Při každém pokusu se prováděl test exkluze trypanové modře.

Kolagen se měřil následujícím způsobem: Pro měření kolagenu Western blotem se použily jako vzorky, vystavené působení pepsinu (triple–helikální doména kolagenu I), tak vzorky nevystavené působení pepsinu. Vzorky se přes noc inkubovaly při 4 °C v pepsinu (1 mg/ml) a kyselině octové (0,5 mol). Alikvoty o stejných objemech vzorků se koncentrovaly rychlostní vakuovou centrifugou a poté se vzorky rozpustily v SDS gelu s pufrem (50mM TRIS-HCl pH 6,8, 100mM dithiothreitol, 2% SDS, 0,1% bromofenolová modř a 10% glycerol) a povařily 10 minut. Následovala centrifugace při 11 000 g 10 minut a vzorky se dělily elektroforeticky na 7,5% SDS–polyakrylamidovém gelu a přenesly na nitrocelulózový filtr. Po inkubaci v blokovacím roztoku se filtry obsahující vzorky inkubovaly s biotinem značenou primární protilátkou proti lidskému kolagenu I a III (Southern Biotech. SC.) 1 hodinu při pokojové teplotě. Filtry se promyly a potom inkubovaly se streptavidinem značenou křenovou peroxidázou. Po přídavku reakčního substrátu se filtry vystavily rentgenovému filtru. Pokusy se opakovaly alespoň dvakrát při separátních příležitostech.

Lidské buňky hladkého svalstva, použité ve všech pokusech, prošly 3–4 pasážemi. Fenotyp těchto buněk se považuje za ireverzibilně syntetický a spojený s různými stavy choroby. Ukázalo se, že abnormální akumulace kolagenu ve stěně cévy je způsobena hlavně těmito syntetickými buňkami. Jak subkonfluentní, tak postkonfluentní buňky hladkého svalstva produkovaly při stimulaci sérem kolageny typu I a III.

V subkonfluentních buňkách hladkého svalstva byla po terapii c–*myc* antisenzním oligonukleotidem pozorována 80% redukce syntézy kolagenu typu I, ve srovnání s kontrolním vzorkem (bez přídavku oligonukleotidu) a s buňkami podrobenými působení c–*myc* senzního oligonukleotidu. V konfluentních buňkách hladkého svalstva počty buněk, počítané na Coulterově počítadle, byla podobné u kontrolních buněk a buněk podrobených antisenznímu i senznímu působení. při použití testu exkluze trypanovou modři byla viabilita buněk 97 %, 96 % a 95 % u kontrolních buněk, buněk podrobených antisenznímu působení a buněk podrobených senznímu působení. Kolagen typu I nebyl detekovatelný v buňkách podrobených c–*myc* antisenznímu působení. Buňky podrobené působení c–*myc* senzního oligomeru nevykazovaly při srovnání s kontrolním vzorkem žádný rozdíl v hladině kolagenu typu I proteinu. Kolagen triple–helikálního typu I se měřil po štěpení a výsledky ukázaly shodné trendy jako vzorky nepodrobené působení pepsinu.

V subkonfluentních buňkách hladkého svalstva byla po terapii *c–myc* antisenzním oligonukleotidem (16 μM) pozorována 80% redukce syntézy prokolagenu typu I, při srovnání s kontrolním vzorem (bez přídavku oligonukleotidu) a se vzorkem podrobeným působení *c–myc* senzního oligonukleotidu. V postkonfluentních buňkách hladkého svalstva nebyl kolagen typu I detekovatelný v buňkách podrobených *c–myc* antisenznímu působení. Buňky podrobené působení *c–myc* senzních oligonukleotidů a oligonukleotidů 4bp chybně spárovaných nevykazovaly redukci v hladině kolagenu typu I proteinu při srovnání s kontrolním vzorkem (bez přídavku oligonukleotidu). Redukce kolagenu typu I jak v proliferujících, tak v subkonfluentních buňkách hladkého svalstva napovídá, že inhibice syntézy kolagenu je nezávislá na inhibici buněčného růstu působením antisenzních látek. Různé dávky (4, 8 a 16 μM) antisenzního oligonukleotidu prokázaly redukci syntézy prokolagenu typu I, závislou na dávkování. Podle testu exkluze trypanovou modří byla viabilita buněk po různém působení oligonukleotidů srovnatelná. Ve všech skupinách zůstalo životaschopných více než 90 % buněk.

V postkonfluentních buňkách hladkého svalstva byla syntéza kolagenu typu I zastavena *c–myc* antisenzním oligonukleotidem při koncentraci 16 μM. V kontrolním vzorku (bez přídavku oligonukleotidu) a v buňkách podrobených působení oligonukleotidů se scramblovanou sekvencí byla hladina kolagenu typu I podobná.

Tyto výsledky jsou dále potvrzeny v příkladech 9, 13 a 17.

Příklad 7

Inhibice syntézy kolagenu v lidských buňkách kožních fibroblastů.

V tomto příkladu se explantované lidské buňky kožních fibroblastů (lidské FBC_S) podrobily působení *c–myc* nebo *c–myc* antisenzního oligonukleotidu a porovnaly s kontrolními vzorky, nepodrobenými terapii a/nebo podrobenými „senzní“ terapii.

Lidské FBCs se získaly od pacientů, podstupujících kožní transplantace a izolovaly se explantační metodou. Explantované FBCs se kultivovaly postupem, popsaným pro lidské buňky hladkého svalstva a stejným způsobem se přidávaly antisenzní a kontrolní oligonukleotidy. V pokusech se použily lidské FBCs ze 3. až 10. pasáže. Syntéza kolagenu se měřila postupem, popsaným v příkladu 6.

V konfluentních lidských FBCs redukovaly *c–myc* antisenzní oligonukleotidy (8 až 16 μM) syntézu prokolagenu typu I v závislosti na dávkování. Buňky podrobené působení *c–myc* senzních oligonukleotidů, oligonukleotidů 4bp chybně spárovaných a scramblovaných oligonukleotidů vykazovaly podobné hladiny kolagenu typu I proteinu ve srovnání s kontrolními buňkami (bez přídavku oligonukleotidu).

Tyto výsledky jsou také dále potvrzeny v příkladu 13.

Příklad 8

Redukce vzniku neointimy v prasečím modelu koronární denudace.

Účinnost *c–myc* antisenzních látek při inhibici vzniku neointimy se testovala administrací *c–myc* specifických antisenzních (sekvence ID No:1) a placebo (sekvence ID No:21) fosforothioátových oligonukleotidů do místa koronární angioplastiky ve standardním prasečím modelu s použitím konvenčních protokolů (např. Karas et al., *J. Am. Coll. Card.*, 20, 467–474 (1992); Schwartz et al., *Circulation*, 82, 2190–2200 (1990)). Domestikovaná krosbrední prasata (*Sus scrofa*) se před studií premedikovala orálně aspirinem (650 mg). Obecná anesteze spočívala v intramuskulární injekci ketaminu (12 mg/kg) a xylazinu (8 mg/kg). Další dávky anestetika se dávaly intravenózně během pokusu. Po chirurgickém odkrytí pravé externí karotické arterie se praseti intravenózně administroval heparin (10 000 U) a nifedinin (10 mg) se dal bukálně. S použitím 8 French SAL 1 zaváděcího katétru (Medtronic Interventional Vascular, Inc., Danvers, MA) se kanylovaly koronární ostie pod fluoroskopickým vedením. Po intrakoronární injekci nitroglycerinu (100 μg) a před dodáním *c–myc* antisenzního oligonukleotidu a placeba se použil zvětšený balonek angioplastiky k poškození intimálních a mediálních vrstev arteriálních stěn nafouknutím při 6 až 10 atm, podle velikosti arterie, která se pohybovala od 2,0 do 3,5 mm, a zadržením třikrát po 30 sekundách. Ihned po odstranění angioplastického balonku se prováděla intramurální injekce (1 mg/ na cévu) do koronárních arterií s použitím separátního porézního balonku. Předem bylo určeno, že intramurální dopravování léčiva je bezpečné, když tlak injekce nepřesáhne 4 atm, objem perfuzátu byl 2 ml a poměr balonek–arterie 1,4 až 1. *C–myc* antisenzní (13 replikátů) nebo placebo (12 replikátů) oligomery se vstřikovaly pod tlakem 4 atm a dopravování bylo v průměru ukončeno během 27 sekund. Dávka oligomerů byla 1 mg na poškozenou koronární arterii. S dodáváním oligomerů nebyly spojeny žádné adverzní efekty. Jeden měsíc po dopravení byla zvířata utracena a v místech poškození se morfometrií určila maximální neointimální oblast (NA max), neointimální tloušťka (NT max) a reziduální lumen. Výsledky (průměr ± SEM) jsou uvedeny v níže tabulce I:

Tabulka I

Oligomer (%)	Replikáty	NA max (mm^2)	NT max (mm)	RL
Placebo ± 6	12	0,80 ± 0,17	0,48 ± 0,09	64
Antisenzní ± 5	13	0,24 ± 0,06	0,20 ± 0,04	81
p <0,05		<0,01	<0,01	

Obr. 10 ukazuje fotografii průřezu exemplárního kontrolního vzorku (to jest po injekci senzního oligomeru) koronární arterie jeden měsíc po poškození. Pozoruje se signifikantní neointimální tloušťka (viz šipky). Obr. 11 ukazuje fotografii průřezu exemplární koronární arterie, podrobené antisenznímu působení. Pozoruje se značná redukce neointimy. Při analýze maximální neointimální oblasti jako funkce stupně poškození (obr. 12) vykazují regresní linie, prezentující vztah

mezi neointimou a poškozením (to jest vážnosti poškození), signifikantní rozdíly ve sklonech ($p<0,01$). Jak ukazuje obr. 12, antisenzní oligomery signifikantně redukovaly vznik neointimy, zejména při pokročilejším poškození.

Příklad 9

Inhibice produkce extracelulární matrice v lidských buňkách hladkého svalstva působením *c–myc* antisenzního oligonukleotidu.

Tento příklad dále ukazuje účinnost působení *c–myc* antisenzního oligonukleotidu při inhibici syntézy proteinu extracelulární matrice lidskými buňkami hladkého svalstva, zejména prokolagenu I a III. Tento příklad také dále potvrzuje pozorování z příkladu 6. Antisenzní terapie významně redukovala hladiny extracelulárního prokolagenu ve stimulovaných lidských buňkách hladkého svalstva (s působením 20% FBS).

A. Měření prokolagenu I a prokolagenu III Western–blotem.

Pro další potvrzení, že *c–myc* antisenzní oligonukleotidy inhibují syntézu proteinů extracelulární matrice, se měřil prokolagen z lidských buněk hladkého svalstva I a III.

Jak intracelulární, tak extracelulární prokolagen (typu I a III) se měřil s pomocí Western–blotů. Odpočívající lidské buňky hladkého svalstva se ponechaly v médiu DMEM (Dulbeccos' Modified Eagle's Medium) s 5% FBS (fetální hovězí sérum). Lidské buňky hladkého svalstva se stimulovaly s nebo bez oligonukleotidů v médiu, obsahujícím 20% FBS a kyselinu askorbovou (50 μg/ml). O FBS je známo, že stimuluje syntézu prokolagenu v lidských buňkách hladkého svalstva. 20 Hodin po přidání oligonukleotidů se buňky promyly třikrát s fosfátovým pufrovaným fyziologickým roztokem (PBS) a ke kultuře bylo na další 4 hodiny přidáno médium bez séra, obsahující 0,1% BSA, kyselinu askorbovou a oligonukleotidy. Kondiciované médium (médium vystavené buňkám a oligonukleotidům) se oddělilo a přidaly se proteinázové inhibitory včetně fenylmethylsulfonylfluoridu (PMSF, 0,5 mM), pepstatinu (1 μg/ml) a leupeptinu (1 μg/ml). Odpovídající buněčná vrstva se promyla třikrát vychlazeným PBS a lyzovala 30 minut při 4 °C v SDS–Page vzorkovém pufru, obsahujícím 62,5 mM TRIS–HCl, pH 6,8, 20% glycerol, 2% SDS, 5% β–merkaptoethanol. Buněčné lyzáty se pak 5 minut povařily pro inaktivaci proteináz a supernatanty se oddělily po centrifugaci při 10 000 rpm 10 minut při 4 °C. Ve vybraných experimentech se buňky kontinuálně inkubovaly s oligonukleotidy ve 20% FBS–DMEM 24 hodin a vzorky kultivačního média se pak přes noc podrobily pepsinovému štěpení (0,1 mg/ml) v 0,5M kyselině octové při 4 °C. Jednotlivé vzorky se koncentrovaly 10x centrifugací přes sloupec Micricon–30 (Amicon, Beverly, MA) a uchovávaly při –20 °C. Alikvoty se dělily elektroforeticky na 65 (w/v) polyakrylamid–SDS gelech se 4% stackujícími oblastmi. Frakcionované proteiny se poté elektrotransferovaly na PolyScreen PVDF membrány (DuPont NEN, MA) v transferovém pufru, obsahujícím 192 mM glycin, 25 mM TRIS, 0,01% SDS a 20% methanol. Bloty se blokovaly v 5% netučném mléce a inkubovaly s protilátkami proti kolagenu typu I (biotinem značená polyklonální protilátka, Southern Biotechnology Associates, Inc. AL) a proti kolagenu typu III (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) v 2,5% BSA. Membrány se promyly třikrát s PBST (PBS obsahující 0,1% Tween 20) a inkubovaly s biotinylovanými sekundárními protilátkami (proti typu III). Bloty se promyly a poté 30 minut inkubovaly s konjugátem streptavidin–peroxidáza (Boehringer Mannheim, Germany). Po promytí se bloty inkubovaly s chemiluminiscenčním činidlem Renaissance (DuPont NEN, MA) 10 sekund a exponovaly na Kodak X–Omat film od 30 sekund do 2 minut. Výsledné fluografy se analyzovaly laserovou denzitometrií (Pharmacia LKB Biotechnology, Inc., Piscataway, NJ).

Pokud není uvedeno jinak, byly ve všech příkladech použity *c–myc* antisenzní oligonukleotidy, odpovídající sekvenci ID No:1.

B. Inhibice sekrece extracelulárního prokolagenu I a prokolagenu III *c–myc* antisenzními oligonukleotidy.

Hladiny prokolagenu se kvůli minimalizaci vlivu různých rychlostí růstu mezi experimentálními podskupinami určovaly v postkonfluentních buňkách hladkého svalstva s ustálenou hustotou. Po působení *c–myc* antisenzních oligonukleotidů se v kondiciovaném médiu pozorovala značná redukce (90 %) extracelulárního prokolagenu I a extracelulárního prokolagenu III, jak ukazuje Western–blot (obr. 13). Tento efekt byl koncentračně závislý v rozmezí 4 až 16 μM a docházelo k němu již po 3 hodinách po inkubaci buněk hladkého svalstva s *c–myc* antisenzními oligonukleotidy (údaje nejsou ukázány).

Redukce extracelulárního prokolagenu I po přídavku antisenzních oligonukleotidů nebyla ovlivněna přídavkem β–aminopropionitrilu a vyloučila se možnost antisenzním působením vyvolaného zesíťování kolagenu (údaje nejsou ukázány).

C. *C–myc* antisenzní fosforothioátové oligonukleotidy k exonům 2 a 3 jsou efektivní inhibitory syntézy proteinů extracelulární matrice.

Pro další potvrzení sekvenčně specifického působení *c–myc* antisenzních fosforothioátových oligonukleotidů, se na buňky hladkého svalstva působilo několika kontrolními sekvencemi včetně senzních, 4bp chybně spárovaných a scramblovaných oligonukleotidů (pokud není uvedeno jinak, jsou zde použity fosforothioátové oligonukleotidy). Účinky kontrolních sekvencí na hladiny prokolagenu I v kondiciovaném médiu se porovnaly s účinky třech antisenzních sekvencí, směrovaných proti rozdílným oblastem *c–myc* mRNA. Jak ukazuje obr. 14, konzistentní redukce extracelulárního prokolagelu I se pozorovala po působení různých antisenzních oligonukleotidů, zatímco kontrolní sekvence takový účinek neměly.

Tabulka III

Sekvence ID No:	Oligonukleotidová sekvence (5′–3′)	Lokace lidského *c–myc* nukleotidu	Typ oligonukleotidu
1	AACGTTGAGG GGCAT	559–573	antisenzní
2	ATGCCCCTCA ACGTT	559–573	senzní
3	AACGTGGATT GGCAG	559–573	4bp chybně spárované
4	GAACGGAGAC GGTTT	scramblované	
5	TATGCTGTGC CGGGGTCTTC GGGC	*c–myb*	antisenzní
6	GGGAGAGTCG CGTCCTTGCT	400–419	antisenzní
7	TCATGGAGCA CCAGGGGCTC	1264–2383	antisenzní

D. Imunoprecipitace extracelulárního fibronektinu a jaderného *c–myc* proteinu.

Pro určení účinku oligonukleotidových sekvencí na syntézu proteinu extracelulárního fibronektinu a *c–myc* proteinu se postkonfluentní buňky hladkého svalstva 4 hodiny inkubovaly s nebo bez oligonukleotidů v médiu bez methioninu. Poté se na 16 hodin přidal [^{35}S]methionin (25 μCl/ml, DuPont NEN, MA) a počet buněk se určil na Coulterově počítači. Extracelulární

fibronektin v kondiciovaném médiu a *c–myc* protein v jaderných buněčných extraktech se měřil imunoprecipitací po metabolickém značení.

Po přídavku proteinázových inhibitorů se oddělilo kondiciované médium a alikvoty, obsahující shodné počty, se 4 hodiny inkubovaly s protilátkami proti fibronektinu (Becton Dickonson, Bedford, MA) a poté ještě 2 hodiny s akrylamidovými kuličkami proteinu A Stafylokoku. Po centrifugaci se granule třikrát promyly, povařily v SDS–PAGE vzorkovém pufru 5 minut a dělily elektroforeticky na 6% polyakrylamidovém SDS gelu. Značené vrstvy buněk se třikrát promyly vychlazeným PBS a lyzovaly v 0,1% NP–40, 10mM TRIS (pH 7,9), 10mM $MgCl_2$, 15mM NaCl, 5mM EDTA, 1mM PMSF, 1 μg/ml leupeptinu a 1 μg/ml pepstatinu.

Paralelně s testy s extracelulárním fibronektinem byla buněčná jádra oddělena centrifugací procedurami, neznámými podle stavu techniky. Změřila se koncentrace proteinu v jaderných extraktech a alikvoty obsahující 500 μg proteinu se 12 hodin inkubovaly s anti–*c–myc* protilátkou, pan–*myc* (dar od G. I. Evana) a poté dalších 90 minut s akryloamidovými kuličkami proteinu A Stafylokoku. Po promytí se kuličky oddělily a povařily v SDS–PAGE vzorkovém pufru a rozpustná frakce se dělila elektroforeticky SDS–Page. Gel se vysušil a exponoval na Kodak–Omat film při –70 °C 5 až 7 dní.

E. Hladiny extracelulárního fibronektinu se neměnily působením *c–myc* antisenzních oligonukleotidů, zatímco hladiny *c–myc* proteinu klesaly.

Na rozdíl od signifikantní redukce extracelulárních prokolagenů, hladiny extracelulárního fibronektinu v kondiciovaném médiu nebyly signifikantně ovlivněny (obr. 13), což ukazuje na selektivní účinky antisenzních oligonukleotidů. Inkubace postkonfluentních buněk hladkého svalstva s *c–myc* antisenzními oligonukleotidy vedla ke snížení proteinu v jaderných extraktech (obr. 15).

Příklad 10

C–myc antisenzní oligonukleotidy nemění celkový metabolismus lidských buněk hladkého svalstva.

Pro další zaručení, že oligonukleotidy nepůsobí jiné změny ve fungování buněk hladkého svalstva, se prováděly testy integrity buněčné membrány, buněčného metabolismu a indukce genů, angažujících se při syntéze kolagenu nebo degradace.

Integrita buněčné membrány lidských buněk hladkého svalstva se testovala s pomocí trypanové modře. Podle stanovení exkluzí trypanové modře zůstalo po působení různých oligonukleotidů (16 μM) životaschopných více než 95 % buněk.

Pro stanovení celkové proteinové syntézy se alikvoty kondiciovaného média precipitovaly ve vychlazené 10% trichloroctové kyselině (TCA) 30 minut při 4 °C a granule se promyly dvakrát v 5% TCA. Granule se poté rozpustily v Solvable™ (DuPont NEN, MA) a inkorporovaná radioaktivita se měřila na scintilačním počítači (Pharmacia LKB Biotechnology Inc. Piscataway, NJ). Celková syntéza proteinu, jak se naměřila zde popsanou inkorporací [^{35}S]methioninu, byla srovnatelná u buněk hladkého svalstva, inkubovaných s nebo bez antisenzních (sekvence ID No:1) oligonukleotidů (obr. 16). Pozornost zasluhuje, že buňky, stimulované s 20% FBS, vykazovaly zvýšenou syntézu proteinu ve srovnání s nestimulovanými buňkami při působení pouze 0,5% FBS. Působení *c–myc*–antisenzního oligonukleotidu neredukovalo syntézu proteinu ve srovnání se senzním, chybně spárovaným kontrolním vzorkem a kontrolním vzorkem bez žádného oligonukleotidu.

24 hodin po odstranění *c–myc*antisenzních oligonukleotidů se hladina prokolagenu I v kondiciovaném médiu vrátila na kontrolní hladinu (obr. 17). Tyto výsledky indikují, že antisenzní

oligonukleotidy (sekvence ID No:1) vedou k selektivní, ale reverzibilní redukci extracelulárních prokolagenů a zachovávají normální metabolickou aktivitu vaskulárních buněk hladkého svalstva.

Protože antisenzní oligonukleotidy mohou indukovat expresi necílových genů, určovala se pro vyloučení nespecifických efektů kolagenolytická aktivita a hladiny interferonu γ po působení *c–myc* antisenzních oligonukleotidů.

Postkonfluentní buňky hladkého svalstva se inkubovaly v médiu bez séra s nebo bez oligonukleotidů. Po 24 hodinách se oddělily alikvoty média. Aktivity matricových metaloproteinů se určovaly po selektivní destrukci tkáňového inhibitoru metaloproteázy dithiothritolem a jodacetamidem. Latentní kolagenázy, produkované lidskými buňkami hladkého svalstva, se aktivovaly aminomethylrtuťnatým acetátem a poté se inkubovaly s kolagenem typu I nebo želatinou a produkty štěpení se stanovily pomocí SDS–PAGE (metodami dle D. D. Dean et al., *J. Clin. Invest.*, 84, 678–685 (1989); P. E. Desrochers et al., *J. Biol. Chem.*, 267, 5005–5012 (1992), zde začleněnými do odkazů). Metaloproteázy se charakterizovaly elektroforézou na SDS–substrátovém gelu (to jest zymografií) při nedenaturujících podmínkách s použitím buď β–kaseinu, nebo želatiny jako substrátu. Srovnatelná kolagenolytická aktivita proti kolagenu typu I a želatině se prokázala v kondicionovaném médiu z buněk hladkého svalstva po působení kontrolních, senzních a antisenzních (sekvence ID No:1) oligomerů, což nasvědčuje tomu, že *c–myc* antisenzní oligonukleotidy nezvyšují endogenní kolagenolytickou aktivitu.

Pro určení zda byl indukován *c–myc* interferon γ, potentní inhibitor syntézy kolagenu typu I, se interferon γ testoval v kulturačním médiu a lidských buňkách hladkého svalstva. Interferon γ nebyl detekovatelný v kondiciovaném kulturačním médiu a buněčných lyzátech po inkubaci s *c–myc* antisenzními oligonukleotidy (sekvence ID No:1) ELISA metodou.

Příklad 11

C–myc antisenzní oligonukleotidy nevykazují žádný efekt na prokolagen α_1(I), α_2(I) a α_1(III) mRNA v lidských buňkách hladkého svalstva.

Tento příklad ukazuje, že působení *c–myc* antisenzních oligonukleotidů nevede ke snížení mRNA prokolagenů v lidských buňkách hladkého svalstva.

Pro měření mRNA z prokolagenu se postkonfluentní buňky hladkého svalstva 24 hodin inkubovaly s nebo bez oligonukleotidů, třikrát se promyly vychlazeným PBS a lyzovaly v 4M guanidiniumizothiokyanátu. Celková RNA se izolovala fenol–chloroformovou extrakcí, následovanou precipitací izopropanolem. Celková RNA se kvantitativně stanovila spektrofotometrickou absorbancí při 260nm. Vzorky se stejným množstvím RNA (10 μg) se denaturovaly a separovaly na 0,8% agarózových/formaldehydových gelech a blotovaly na nitrocelulózových membránách. RNA se zesíťovala na nitrocelulózové membrány s pomocí UV zesíťovače (Stratagene, CA). Bloty se hybridizovaly při 42 °C 24 hodin s cDNA probami lidského prokolagenu α_1(I) (ATCC) a lidského prokolagenu α_2(I) (dar H. Kuivaniemi). Jako kontrolní vzorek se použily proby pro 7S ribosomální RNA. Proby se značily ^{32}P–CTP nick–translací na specifickou aktivitu vyšší než 10^8 cpm/μg DNA. Bloty se následně dvakrát promyly v 2x, 1x, 0,5x a 0,1x SSC–0,1% SDS při 42 °C 15 minut. Každé promytí se dvakrát opakovalo. Bloty se exponovaly na Kodak–Omat film při –70 °C se zesíleným stínítkem od 6 hodin do 3 dnů.

Snížení *c–myc* proteinu po antisenzním působení vede k možnosti transkripční regulace exprese kolagenu. Hladiny prokolagenu α_1(I) a prokolagenu α_2(I) mRNA se analyzovaly v buňkách hladkého svalstva po inkubaci s nebo bez oligonukleotidů s použitím analýzy Northern–blotem. Jak ukazuje obr. 18, antisenzní oligonukleotidy nepůsobily na hladiny prokolagenu α_1(I) a proko-

lagenu α_2(I) mRNA. Rovněž se pozorovaly podobné hladiny prokolagenu α_1(III) v případě působení *c–myc* antisenzních oligonukleotidů a bez oligonukleotidů (údaje nejsou ukázány). 7S RNA zůstala nezměněna při všech třech experimentálních podmínkách.

Příklad 12

Intracelulární akumulace prokolagenu v lidských buňkách hladkého svalstva při působení *c–myc* antisenzních oligonukleotidů.

Tento příklad ukazuje, že působení *c–myc* antisenzních oligonukleotidů zvyšuje prokolagen uvnitř lidských buněk hladkého svalstva. Tyto výsledky jsou v souladu s poklesem syntézy prokolagenu extracelulární matrice v přítomnosti *c–myc* antisenzních oligonukleotidů.

A. Intracelulární hladiny prokolagenu jsou zvýšeny *c–myc* antisenzním působením.

Pro studium mechanizmů zapojených při redukci extracelulárního prokolagenu působení m c–*myc* antisenzních oligonukleotidů, se sekretované a intracelulární prokolageny určovaly po 4 hodinách značení [^{14}C]prolinem.

Pro měření intracelulárního prokolagenu po působení *c–myc* antisenzních oligonukleotidů se buňky 20 hodin inkubovaly s nebo bez oligonukleotidů v 20% FBS–DMEM. Na další 4 hodiny se k buňkám přidalo médium bez séra, obsahující askorbovou kyselinu (50 μg/ml), [^{14}C]prolin (2,5 μCl/ml, DuPont NEN, MA) a oligonukleotidy. Kulturační médium se oddělilo a přidaly se proteázové inhibitory. Alikvoty média se centrifugovaly přes sloupec Microcon–30 kvůli odstranění neinkorporovaného radioizotopu a koncentraci vzorků pro elektroforézu. Odpovídající vrstvy buněk se poté třikrát promyly vychlazeným PBS, lyzovaly v SDS–PAGE vzorkovém pufru a povařily 5 minut kvůli inaktivaci proteáz. Alikvoty koncentrovaného média, buněčné lyzáty (ze stejného počtu buněk) a prokolagen I, purifikovaný z kožních buněk lidských fibroblastů (dar od W. Arnolda), se dělily elektroforeticky na 6% polyakrylamid–SDS gelech s 3% stackujícími oblastmi. Gely se fixovaly 30 minut v 10% kyselině octové, 20% methanolu, vysušily a exponovaly na film při –70 °C 7 dní.

C–*myc* antisenzní působení snížilo sekretovaný prokolagen značený [^{14}C]prolinem a bylo podobné Western–blotu DNA. C–*myc* antisenzní působení zvýšilo významně intracelulární koncentraci prokolagenu I ve srovnání s buňkami, nevystavenými antisenznímu působení a buňkami vystavenými působení scramblovaných oligonukleotidů (obr. 19).

B. Zvýšení hladiny intracelulárního prokolagenu není způsobeno neschopností lidských buněk hladkého svalstva hydroxylovat prolin po působení c–*myc* antisenzních oligonukleotidů.

Intracelulární akumulace prokolagenu může odrážet inhibici post–translačních modifikací, požadovaných pro sestavení α řetězců prokolagenu do triple–helikální konformace. Kvůli vyloučení této možnosti se měřil účinek c–*myc* antisenzního působení na prolyl–4–hydrolázovou aktivitu a obsah hydroxyprolinu.

Postkonfluentní buňky hladkého svalstva se 24 hodin inkubovaly s nebo bez oligonukleotidů v 20% FBS–DMEM, jak se popisuje výše. Vrstvy buněk se třikrát promyly vychlazeným PBS a lyzovaly v 0,2M NaCl, 20mM TRIS–HCl, pH 7,4, 0,1% Triton x–100, 0,1M glycin a 10 μM DTT (metody podle Kivirikko et al., *Methods in Enzymology* 82, 245–364 (1982) jsou zde zahrnuty do odkazu). Lyzáty se poté sonikovaly 30 sekund v ledu a měřila se koncentrace proteinu. Zbývající buněčné lyzáty se centrifugovaly při 13 000 rpm 20 minut při 4 °C.

V alikvotech supernatantu se testovala prolyl–4–hydrolázová aktivita měřením vzniku radioaktivního 4–hydroxyprolinu s použitím [^{14}C]prolinem značeného prokolagenu I jako substrátu

(metody podle Kivirikko et al., *Anal. Biochem.* 19, 249–255 (1967) jsou zde zahrnuty do odkazu). Alikvoty buněčného lyzátu se hydrolyzovaly a hydroxyprolin se stanovil specifickým chemickým postupem.

Prolyl–4–hydrolázová aktivita, pivotální enzym kontrolující vznik triple–helikální konformace, byla v experimentálních podskupinách podobná. Byla 11,7 ± 0,1 (dpm/μg proteinu, průměr ± SD ze 2 oddělených pokusů) v kontrolním buňkách hladkého svalstva bez působení oligonukleotidů, 12,0 ± 2,3 v buňkách inkubovaných se scambled oligonukleotidy (16 μM) a 10,5 ± 2,0 po působení c–*myc* antisenzních oligonukleotidů (16 μM).

Obsah hydroxyprolinu byl větší v buňkách s c–*myc* antisenzními oligonukleotidy (sekvence ID No:1) než v buňkách bez oligonukleotidů nebo v buňkách se scambled oligonukleotidy (obr. 20). Zvýšení obsahu hydroxyprolinu odráží zvýšení hladin prokolagenu, který je substrátem pro prolyl–4–hydroxylázu.

Příklad 13

Inhibice produkce extracelulární matrice v lidských kožních fibroblastových buňkách lidských fibroblastů s použitím c–*myc* antisenzních oligonukleotidů.

Tento příklad demonstruje účinnost terapie c–*myc* antisenzními oligonukleotidy při inhibici syntézy proteinů extracelulární matrice, zejména prokolagenu I a III, v lidských kožních fibroblastových buňkách. Antisenzní terapie silně redukuje hladiny extracelulárního prokolagenu ve stimulovaných lidských kožních fibroblastových buňkách (po působení 20% FBS). Tento příklad také dále potvrzuje poznatky z příkladu 7.

A. Test na extracelulární a intracelulární kolagen I a III s použitím Western blotů.

Pro další určení, zda c–*myc* antisenzní oligonukleotidy inhibují syntézu extracelulárního a intracelulárního prokolagenu I a III v lidských kožních fibroblastech, se určily hladiny prokolagenů, jak se popisuje u lidských buněk hladkého svalstva v příkladech 9 a 12. Lidské kožní fibroblastové buňky, použité při experimentech s lidskými kožními fibroblasty, byly konfluentní. Buňky se získaly a byly kultivovány jako v příkladu 7 metodami podle stavu techniky známými.

B. Rychlá inhibice sekrece extracelulárního kolagenu I a III s použitím terapie c–*myc* antisenzními oligonukleotidy.

Tyto experimenty ukazují, že c–*myc* antisenzní oligonukleotidy inhibují sekreci extracelulárního kolagenu I a III v lidských kožních fibroblastech způsobem, závislým na dávkování a na antisenzní sekvenci, a že k inhibici dochází velice rychle.

Pro další určení dávkovací odpovědi a antisenzní specifity c–*myc* antisenzních oligonukleotidů při inhibici syntézy proteinů extracelulární matrice se extracelulární kolagen I měřil pomocí Western blotů buněčných proteinů lidských fibroblastů, izolovaných z lidských fibroblastů po různých terapiích. Na lidské fibroblastové buňky se po 24 hodin působilo buď scrambled oligonukleotidy (sekvence ID No: 4,16 μM), chybně spárovanými oligonukleotidy (sekvence ID No: 3, 16 μM), antisenzními oligonukleotidy (sekvence ID No: 1, 4, 8, 16 μM), nebo se nepůsobilo žádnými oligonukleotidy, jak se zde diskutuje, a proteiny těchto buněk se testovaly na kolagen I pomocí Western blotů, ukázaných na obr. 21, linie 1, respektive 5. Dvojitý pás představuje řetězce kolagenu α_1(I) a α_2(I), horní, respektive dolní pásy. Buňky po antisenzním působení vykazovaly proporční pokles množství kolagenu I se vzrůstajícími hladinami c–*myc* antisenzních oligonukleotidů, zatímco kontrolní buňky (bez oligonukleotidů, s chybně spárovanými a scramblované oligonukleotidy) vykazovaly vyšší množství kolagenu než při nejnižší použité

koncentraci c–*myc* antisenzních oligonukleotidů. Oligonukleotid (sekvence ID No: 1, 16 μM) také inhiboval buněčnou proliferaci v čerstvě plátovaných fibroblastech; při srovnání s 20% FBS a senzními kontrolními vzorky byly buněčná proliferace po 4 dnech inhibována 25, respektive 50 %. Tyto výsledky společně s dalšími zde uváděnými výsledky, zejména absence up–regulace degradačních cest kolagenu a prokolagenu c–*myc* antisenzním působením, ukazují, že produkce extracelulární matrice, zejména sekrece prokolagenu I, je inhibována c–*myc* antisenzním působením.

Časový průběh působení c–*myc* antisenzních oligonukleotidů na sekreci kolagenu I lidskými kožními fibroblastovými buňkami ukázal rychlou inhibici sekrece *de novo* syntetizovaného kolagenu I. V čase 0 se lidské kožní fibroblastové buňky vystavily čerstvému médiu („čerstvé médium" jak se zde používá, obsahuje 20% FBS a askorbovou kyselinu 50 μg/ml a další uvedené složky) buď se žádnými oligonukleotidy, se scramblovanými oligonukleotidy, nebo s antisenzními oligonukleotidy po 24 hodin (koncentrace oligonukleotidů byla 16 μM; sekvence ID No: 1 a 3). Po 3, 6 a 24 hodinách se odebraly alikvoty každého buněčného média a testovaly se na přítomnost kolagenu I Western blotem, jak se zde diskutuje. Redukce hladiny kolagenu se pozorovala v buňkách, vystavených antisenznímu působení při srovnání s kontrolními buňkami (bez oligonukleotidů a se scramblovanými oligonukleotidy) již po 3 hodinách. Po 24 hodinách buňky vystavené antisenznímu působení vykazovaly nejméně 5 až 10 krát nižší sekreci kolagenu I než kontrolní buňky. Hodnoty získané po 6 hodinách vykazují mezivýsledky.

Sekrece kolagenu III lidskými fibroblastovými buňkami byla také inhibována c–*myc* antisenzními oligonukleotidy. Lidské fibroblastové buňky se vystavily po 24 hodin čerstvému médiu, neobsahujícímu žádné oligonukleotidy, nebo obsahujícímu 16 μM scramblované oligonukleotidy, nebo 16 μM c–*myc* antisenzní oligonukleotidy, a po uplynutí 24 hodin se médium testovalo na přítomnost extracelulárního kolagenu III. V buňkách vystavených antisenznímu působení nebyl pozorován žádný extracelulární kolagen III, zatímco kontrolní buňky (bez oligonukleotidů a se scramblovanými oligonukleotidy) vykazovaly přítomnost extracelulárního kolagenu III (alespoň 10 až 100 krát vyšší hladinu kolagenu III při srovnání s buňkami vystavenými antisenznímu působení).

Tyto výsledky společně s dalšími zde uváděnými výsledky ukazují, že produkce extracelulární matrice, zejména sekrece prokolagenu I a III, je inhibována c–*myc* antisenzním působením.

C. Akumulace intracelulárního prokolagenu I a simultánní pokles extracelulárního prokolagenu I působením c–*myc* antisenzních oligonukleotidů.

Inhibice sekrece prokolagenu I c–*myc* antisenzním působením na lidské fibroblastové buňky byla spojena s akumulací intracelulárního prokolagenu I. Lidské fibroblastové buňky se po 24 hodin vystavily čerstvému médiu neobsahujícího žádné oligonukleotidy, nebo obsahujícímu 16 μM scramblované oligonukleotidy, nebo 16 μM c–*myc* antisenzní oligonukleotidy, a médium a odpovídající lidské fibroblastové buňky se poté testovaly na přítomnost extracelulárního prokolagenu I a intracelulárního prokolagenu I s použitím ^{14}Cprolinem značených produktů syntézy proteinů, separovaných jak se zde popisuje. Na obr. 22 hlavní pásy v liniích 1 až 3 ukazují řetězce prokolagenu α_1(I, III) a α_2(I). V buňkách vystavených antisenznímu působení je množství sekretovaného prokolagenu I redukováno alespoň 10 až 20 krát ve srovnání s kontrolními buňkami (bez oligonukleotidů a se scramblovanými oligonukleotidy, linie 1, respektive 2). Horní pás v liniích 1 až 3 je 116 Kd („horní pás"), což odpovídá prokolagenu α_1(I, III); dolní pás v liniích 1 až 3 (zleva doprava) je 100 Kd, což odpovídá prokolagenu α_2(I). Na obr. 22 linie 4 až 6 ukazují intracelulární prokolagen I alespoň 5 krát vyšší v buňkách, vystavených antisenznímu působení (linie 6) než v kontrolních buňkách (linie 4 a 5). Na obr. 22 linie 7 ukazuje markery molekulové hmotnosti.

Tyto výsledky ukazují, že c–*myc* antisenzní terapie snižuje množství prokolagenu, sekretovaného lidskými fibroblastovými buňkami a zvyšuje množství prokolagenu v buňkách.

Příklad 14

C–*myc* antisenzní oligonukleotidy nemění termální stabilitu intracelulárního prokolagenu v lidských kožních fibroblastech.

Terciární struktura intracelulárního prokolagenu se neměnila c–*myc* antisenzním působením. Lidské fibroblastové buňky se po 24 hodin vystavily čerstvému médiu, neobsahujícímu žádné oligonukleotidy, nebo obsahujícímu 16 μM scramblované oligonukleotidy, nebo 16 μM c–*myc* antisenzní oligonukleotidy. Teplota tání prokolagenu při všech experimentálních podmínkách se měřila způsobem zde popsaným a podle stavu techniky známým. Obr. 23 ukazuje, že profily tání pro kontrolní buňky (bez oligonukleotidů a se scramblovanými oligonukleotidy) a buňky vystavené antisenznímu působení jsou podobné. Tyto výsledky ukazují, že prokolagen přítomný uvnitř buněk, vystavených antisenznímu působení, zachovává normální triple–helikální konformaci stejnou jako v kontrolních buňkách.

Tyto výsledky ukazují, že c–*myc* antisenzní terapie nevede k pozorovatelné změně ve struktuře prokolagenu, která by vedla k nárůstu intracelulární degradace nebo ke snížení exportu proteinu z buňky.

Příklad 15

Terapie c–*myc* antisenzní oligonukleotidy nemění hladinu prokolagenu A_1(I) mRNA v lidských kožních fibroblastech.

Tento příklad ukazuje, že terapie c–*myc* antisenzními oligonukleotidy neinhibuje syntézu proteinů extracelulární matrice, zejména prokolagenu I, redukcí hladiny mRNA prokolagenu v lidských kožních fibroblastových buňkách. Antisenzní terapie neredukuje hladiny mRNA prokolagenu ve stimulovaných lidských kožních fibroblastových buňkách (po působení 20% FBS).

A. Měření mRNA prokolagenu α_1(I).

RNA se izolovala Northern analýzou způsobem zde uvedeným: Buňky se 3x promyly vychlazeným PBS pufrem a lýzovaly v 4M guanidinium izothiokyanátu. RNA se extrahovala fenol/chloroformem a kvantifikovala spektrofotometricky absorbancí při 260/280 mm. RNA vzorky (20 μg) se dělily elektroforeticky na 0,8% agarózo–formaldehydových gelech. Po přenosu RNA na nitrocelulózové filtry se bloty fixovaly ultrafialovým ozářením. Bloty se prehybridizovaly 5x ve standardním fyziologickém citrátu, 2x Denhardtovým roztokem, 0,1% SDS a 0,2 mg/ml denaturovanou DNA (salmon sperm) alespoň 4 hodiny při 65 °C. Hybridizace se prováděla přes noc s použitím stejného pufru, obsahujícího cDNA radioznačené ^{32}P dCTP nick–translací na specifickou aktivitu 108–109 cpm/μg. Bloty se promyly při 65 °C v 0,5% standardním fyziologickém citrátu a 0,1% SDS. Filtry se exponovaly na Kodak X–Omat film při – 70 °C s intenzifikací stínítka 1 až 5 dní. Autoradiografie výsledných Northern blotů se kvantifikovala skenovací denzitometrií a integrací ploch píků. V těchto studiích se použily proby: 1,8 Kb pro–alfa 1(1) (HF–677) cDNA odpovídající COOH–terminálnímu propeptidu a karboxy–terminální doméně triple–helikální oblasti lidského pro–alfa 1(1) řetězce typu I prokolagenu (Chu et al., *Nucleic Acids Res.*, 10, 5925–5934 (1982).

B. Hladiny mRNA prokolagenu α_1(I) nejsou sníženy c–*myc* antisenzní terapií.

Hladina mRNA prokolagenu alfa I v lidských fibroblastových buňkách nebyla ovlivněna c–*myc* antisenzní terapií. Lidské fibroblastové buňky se po 24 hodin vystavily čerstvému médiu, neobsahujícímu žádné oligonukleotidy, nebo obsahujícímu 16 μM scramblované oligonukleotidy, nebo 16 μM c–*myc* antisenzní oligonukleotidy. mRNA se purifikovala při všech experimentálních podmínkách a analyzovala se na přítomnost mRNA prokolagenu alfa I způsobem zde popsaným a podle stavu techniky známým. Obr. 23 ukazuje, že hladiny mRNA prokolagenu I v kontrolních buňkách (bez oligonukleotidů a se scramblovanými oligonukleotidy; linie 1, respektive 2) jsou podobné hladinám mRNA prokolagenu alfa I v buňkách, vystavených antisenznímu působení (linie 3). Tyto výsledky ukazují, že c–*myc* antisenzní terapie lidských fibroblastových buněk nesnižuje regulaci mRNA transkripce genu prokolagenu alfa I.

Výsledky testování mRNA společně s dalšími zde uváděnými výsledky ukazují, že c–*myc* antisenzní terapie snižuje sekreci prokolagenu I a III, což jsou proteiny vedoucí k syntéze kolagenu v extracelulární matrici.

Příklad 16

C–*myc* antisenzní oligonukleotidy nemění obnovu syntézy proteinů extracelulární matrice po přerušení terapie c–*myc* antisenzními oligonukleotidy v lidských kožních fibroblastech.

Schopnost lidských fibroblastových buněk syntetizovat kolagen I po odstranění terapie c–*myc* antisenzní oligonukleotidy nebyla narušena. Lidské fibroblastové buňky se po 24 hodin vystavily čerstvému médiu, neobsahujícímu žádné oligonukleotidy, nebo obsahujícímu 16 μM scrambled oligonukleotidy, nebo 16 μM c–*myc* antisenzní oligonukleotidy. Lidské fibroblastové buňky při všech experimentálních podmínkách se poté vystavily čerstvému médiu bez přídavku jakéhokoliv oligonukleotidu a testovaly se na přítomnost kolagenu I způsobem zde popsaným. Obr. 25 ukazuje, že kontrolní buňky (bez oligonukleotidů a se scrambled oligonukleotidy) a buňky vystavené antisenznímu působení produkují podobné hladiny extracelulárního kolagenu I 24 hodin po ukončení terapie. Tyto výsledky ukazují, že po 24 hodinách došlo k úplnému obnovení produkce kolagenu lidských fibroblastových buňkách vystavených c–*myc* antisenzní terapii.

C–*myc* antisenzní terapie nevykazuje žádné cytotoxické efekty, které by vedly k neschopnosti buňky se vrátit k sekreci předterapeutických hladin prokolagenu.

Příklad 17

Inhibice syntézy extracelulární matrice v prasečích koronárních arteriích.

Tento příklad dále ukazuje *in vivo* účinnost lokalizované terapie c–*myc* antisenzními oligonukleotidy při snižování progrese syntézy extracelulární matrice po tkáňovém traumatu. Tento příklad také dále ukazuje *in vivo* účinnost lokalizované terapie c–*myc* antisenzními oligonukleotidy při snižování progrese zjizvení vnitřních orgánů, stejně jako při snižování progrese zjizvení tkáně, spojeného se syntézou molekul extracelulární matrice, jako kolagenu.

A. Inhibice produkce fibrilárních látek extracelulární matrice terapií c–*myc* antisenzními oligonukleotidy.

Pro určení vlivu c–*myc* antisenzní terapie na progresi syntézy extracelulární matrice po tkáňovém traumatu, se *in vivo* poranila prasečí srdce, vystavila působení oligonukleotidů, jak se popisuje v příkladu 8 (pokud není uvedeno jinak), usmrtila po 3, 7 a 28 dnech po podání oligonukleotidů.

Byly použity stejné c–*myc* antisenzní a senzní oligonukleotidy (sekvence ID No:1 a 2) a dávky (1 mg na arterii) jako v příkladu 8.

Průřezy traumatizovanými (poraněnými) koronariemi z prasat, vystavených antisenzní terapii, vykazovaly rozdíly v mikroskopické extracelulární architektuře ve srovnání s traumatizovanými koronariemi vystavenými senzní terapii. Traumatizované koronarie z každé experimentální skupiny se testovaly jako slepé vzorky světelnou mikroskopií, se zvětšením 20 až 62x. Tkáň se barvila Verhoff–Van–Giesonovým barvivem, podle stavu techniky známým, ke zvýraznění buněk a extracelulární matrice, a sirriovou červení, podle stavu techniky známou, ke zvýraznění kolagenu. Cévy, vystavené antisenzní terapii, které vykazovaly menší oblast neointimy než kontrolní cévy, také vykazovaly menší zbarvení červení než kontrolní cévy (vystavené senzní terapii). Cévy vystavené antisenzní terapii vykazovaly nižší extracelulární fibrilární látky než cévy vystavené senzní terapii; a cévy vystavené antisenzní terapii vykazovaly menší extracelulární prostor mezi buňkami. Neointimální proliferace buněk hladkého svalstva byla stanovena s použitím imunozbarvení pro PCNA (jaderný antigen proliferujících buněk) po balonkové denudaci a transkatétrovým podáváním c–*myc* senzních (S) nebo antisenzních (AS) oligonukleotidů (1 mg) do prasečích koronárních arterií, viz tabulka IV. Antisenzní terapie koronárií inhibovala progresi proliferaci buněk hladkého svalstva, způsobenou tkáňovým traumatem, ve srovnání se senzní terapií koronárií. PCNA zbarvení umožnilo stanovení počtu proliferujících buněk v daném průřezu neointimou. Obecně se napočítalo 200 až 1000 buněk a určila se procenta proliferujících buněk hladkého svalstva a vyjádřila jako proliferační index. Proliferační index (PI), poměr neointima/média (I/M) a redukce v I/M poměru (ΔI/M) byly následující:

Tabulka IV

Den	R_x	n	P*(%)	Poměr I/M	ΔI/M (%)
	S	4	5 ± 2	0,09 ± 0,03	
3	AS	8	3 ± 5	0,05 ± 0,02	↓ 44
	S	4	47 ± 13	0,28 ± 0,04	
7	AS	8	11 ± 13**	0,12 ± 0,05**	↓ 57
	S	6	N/A	1,19 ± 0,51	
28	AS	4	N/A	0,47 ± 0,30*	↓ 61

P* proliferující buňky/celkový počet buněk x 100, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Koronárie s redukovaným poměrem I/M měly zlepšený lumenální průměr. Tyto výsledky ukazují, že lokalizovaná c–*myc* antisenzní terapie inhibuje během doby růst buněk hladkého svalstva a vznik extracelulární matrice.

Lokalizovaná c–*myc* antisenzní terapie inhibuje progresi vzniku jizev v traumatizované tkáni, jako vznik jizev v koronáriích po traumatu balonkové angioplastiky, způsobený proliferací buněk hladkého svalstva a vznik extracelulární matrice.

Příklad 18

Rychlá lokalizace c–*myc* antisenzních oligonukleotidů v prasečích koronárních arteriích.

Tento příklad ukazuje *in vivo* účinnost c–*myc* antisenzních oligonukleotidů při penetraci vaskulární a pojivovou tkání s použitím prostředků lokální dopravy. Ve spojení s dalšími výsledky zde diskutovanými tyto výsledky ukazují schopnost c–*myc* antisenzní terapie lokalizovat se v buněčném jádru během 30 minut a před počátkem *c–myc* indukce (ke které dochází během 3 až

4 hodin). Lokální distribuce c–*myc* antisenzních oligonukleotidů po lokální administraci do stěny cévy koronární arterie potlačuje vznik jizev po balonkové angioplastice.

A. Lokální dopravování c–*myc* antisenzních oligonukleotidů, značených buď karboxyfluoresceinem, nebo ^{35}S–fosforothioátem.

C–*myc* antisenzní oligonukleotidy, použité v tomto příkladu, se připravily způsobem zde uvedeným. Fosforothioátové antisenzní oligonukleotidy (sekvence ID No:1), řízené proti oblasti iniciace translace lidského *c–myc* genu použité při distribučních studiích byly značeny karboxyfluoresceinem (480 nm excitace, 520 nm emise, Molecular Probes, Inc.) popsaným způsobem (Inverson et al., *Antisenze Res. Dev.* 2, 211–222 (1992)) a metodami zde zahrnutými v odkazu. Pro kvantitativní studie se oligonukleotidy značily ^{35}S na každé internukleotidové vazbě se specifickou aktivitou 1,8 x 10^8 cpm/μmol.

Pro experimenty se použila domestikovaná imbrední prasata. (*Sus scrofa*), příprava probíhala způsobem zde popsaným. Koronární ostia byla kanylována s použitím 9 French SAL 1 zaváděcího katétru (Cordis Corp., Miami, FL) pod fluoroskopickým vedením. Po intrakoronární injekci nitroglycerinu (100 μg) se získala baselinová koronární angiografie. Vybrané domény koronárních arterií se poté podrobily denudaci (traumatizaci) zvětšelým balonkem inflantovaným 3 x (6 atm) po 30 sekund. Poté se zavedlo dopravovací zařízení Kaplan–Simpson Infusasleeve (LocalMed, Palo Alto, CA) přes standardní angioplastikový balonek („podpůrný" balonek) do vybrané oblasti. Toto zařízení se skládá z multilumenální infuzní oblasti (18 mm), obsahující multiplitní postranní otvory (40 μm), které jsou umístěny proti stěně cévy prostřednictvím inflantujícího podpůrného balonku. Zařízení používalo při studiích infuzní roztoky s použitím rigidních nekolapsovatelných kanálků. Tento tvar minimalizoval ztrátu léčiva v krevním toku a povoloval separátní kontrolu infuze léčiva a umístění zařízení na dopravování léčiva v cévě. Po úplné expanzi interního balonkového katétru se fluoroskopicky ověřila infuzní doména a administrovaly se c–*myc* antisenzní oligonukleotidy. Intramurální injekce se prováděly pod externím tlakem 100 PSI. Celkový objem injektátu byl 5 až 6 ml, dopravený externí pumpou s 40 ml/min. Administrovaná dávka byla 1 mg na arterii. Po ukončení injekce se zařízení odstranila a natočily se finální angiogramy. K zajištění vhodných podmínek dopravování oligonukleotidů se použila sériová koronární angiografie k měření luminálního průměru vybraných koronárních arterií, luminálního průměru před dodáním oligonukleotidu (to jest po dedudaci poraněním) a po administraci oligonukleotidu. Navíc se *in situ* měřily průměry denudací a podpůrných balonků. Jako škálovací zařízení se pro všechna angiografická měření použil zaváděcí katétr. V určených časech byla zvířatům podána letální dávka pentobarbitalu sodného (100 mg/kg iv).

Jak ukazuje tabulka V, průměrný luminální průměr cévy byl 2,5 ± 0,1 mm při baselině. Poranění koronární arterie se docílilo zvětšelým balonkem (také známým jako denudační) (průměrný poměr balonek/arterie 1,1). Všechny cévy zůstaly průchodné po roztažení balonkem s průměrným luminálním průměrem 2,6 ± 0,1 mm. C–*myc* antisenzní oligonukleotidy se administrovaly expandovaným dopravovacím zařízením při dosažení přímého kontaktu s endoluminálním povrchem cévy (průměrný poměr balonek/arterie 1,0).

Tabulka V

Angiografické charakteristiky, založené na kvantitativní koronární angiografii (n– 14).

Počáteční luminální průměr (mm)	2,5 ± 0,1
Poměr denudační balonek/arterie	1,1 ± 0,0
Luminální průměr po denudaci (mm)	2,6 ± 0,1
Poměr dopravovací balonek/arterie	1,0 ± 0,0
Luminální průměr po dopravení (mm)	2,6 ± 0,1

B. Kvalitativní stanovení dopravování oligonukleotidů.

Pro určení distribuce fluorescenčně značených oligonukleotidů po transkatétrovém dopravování byly koronární arterie vyříznuty s přilehlými tkáněmi. Po vypláchnutí lumene cévy PBS se arterie fixovaly v 10% pufrovaném formalinu 6 hodin a vložily se do parafínu. Arterie se nařezaly na sériové 4 μm silné řezy (50 mm na cévu včetně 18 mm injektované domény).

Prohlídka místa injekce a proximálních a distálních domén cévy poskytla informaci o podélné distribuci oligonukleotidů. Navíc neinjektovaná koronární arterie ze stejného zvířete sloužila jako další kontrola. Řezy se zbavily parafínu a konce se obalily SlowFade–Light antifadovým činidlem (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR). Každé krycí sklíčko obsahovalo cévu, periadventiciální tkáň a přilehlý myokard (obr. 17), který umožnil určení hloubky penetrace oligonukleotidů. Fluorescentně značené antisenzní oligonukleotidy se zviditelnily pod mikroskopem Nikon Ophtiphot vybaveným XF–22 filtrem pro epifluorescenci. Fotografie se snímaly na filmech Kodak Ektachrome P1600.

Pro analýzu intracelulární lokalizace fluorescenčně značených oligonukleotidů *in vitro* a *in vivo* se použil laserový skenovací konfokální mikroskop (model Zeiss Axiovert 100), vybavený MRC–600 krypton–argonovým laserem. Krypton–argonový laser emituje laserové linie při excitační vlnové délce 488 nm. Indukované fluorescenční světlo je skenováno přes objektiv 63x a konvertováno na video signál k zobrazení na obrazovce počítače. Obrazy se fotografovaly z obrazovky počítače na filmy Kodak Ektachrome 100. Pro studie *in vivo* k určení časového průběhu příjmu oligonukleotidů vaskulárními buňkami hladkého svalstva se buňky 2 dny pěstovaly na komůrkových krycích sklíčkách v médiu, obsahujícím 10% fetální hovězí sérum a přidaly se fluorescenčně značené oligonukleotidy (8 μM) na 2 minuty, 30 minut a 2 hodiny. Poté se buňky promyly třikrát s PBS a fixovaly 50% acetonem a 50% methanolem. Pro studie *in vivo* se řezy koronárních arterií, získané postupem výše popsaným, analyzovaly konfokální mikroskopií při optické tloušťce 0,4 až 0,5 μm.

C. Distribuce antisenzních oligonukleotidů ve stěně cévy.

Pro určení distribuce oligonukleotidů ve stěně cévy se měřila jejich lokalizace v koronárních arteriích 30 minut a 3 dny po intramurální administraci (n = 4). Fluorescenčně značené oligonukleotidy se detekovaly pouze v oblasti injekce, ale ne v distálních segmentech nebo v neinjektovatelných koronárních arteriích. Po 30 minutách se v injektovaných segmentech, které předtím prodělaly balonkovou denudaci, pozorovaly tři rozdílné fokální vzory distribuce oligonukleotidů. Hustá transmurální lokalizace, zahrnující celou tloušťku médie, byla spojena s více rozptýlenou adventiciální a perivaskulární distribucí (obr. 27a a 27b). V každém řezu oligonukleotidy zaujímaly pouze doménu arteriálního obvodu. Subintimální nontransmurální vzor byl obecný; byl buď roztroušený mezi transmurální lokalizací, nebo na okrajích injektovaných segmentů (obr. 27c a 27d). Středostěnový nontransmurální vzor byl nejméně obvyklý a byl nalezen v sousedství transmulární lokalizace (obr. 27e a 27f). Adventicia cévy byla v řezech, vykazujících nontransmurální distribuci, prosta antisenzních oligonukleotidů.

Také byla studována role předchozího vaskulárního poranění při distribuci c–*myc* antisenzních oligonukleotidů v arteriální stěně. Analýza konsekutivních destiček ukázala transmurální distribuci, nejobvyklejší v oblastech disekce s lokalizací oligonukleotidů, dosahující k sousedícím řezům. Subintimální nontransmurální vzor byl obvykle spojen se zachovanou vaskulární integritou. Po 3 dnech byly oligonukleotidy jasně zřetelné v transmurální lokalizaci (obr. 28a a 28b). Subintimální nontransmurální distribuce byla méně zřetelná jako výsledek vymývání oligonukleotidů. Žádný důkaz lineární „jet–like" lokalizace nebyl pozorován po 30 minutách nebo 3 dnech.

Tyto údaje společně ukazují na fokální vzor intramurální distribuce oligonukleotidů po transkatétrové administraci pod tlakem. Disekce koronární arterie, způsobená předchozí balonkovou

denudací, usnadnila vstup a transmurální distribuci oligonukleotidů. Nontransmurální vzor byl obvykle spojen s intaktní interní elastickou laminou.

D. Intramurální dopravování oligonukleotidů v koronárních arteriích.

Doba usazení oligonukleotidů se *in situ* měřila pro určení, zda antisenzní terapie vede k retenci oligonukleotidů. Pro kvantitativní adresování do tkáně byly do prasečích koronárních arterií s použitím transkatétru dopraveny ^{35}S–značené c–*myc* antisenzní oligonukleotidy. Jak ukazuje obr. 29, po 30 minutách po místně specifické administraci se měřila radioaktivita v tkáni, která odráží obsah oligonukleotidů 2510 ± 1436 cpm (n = 6) ve stěně cévy a 2163 ± 966 cpm (n = 6) v perivaskulární tkáni oproti tkáňovému pozadí 17 ± 4 cpm. O 3 dny později radioaktivita spojená s oligonukleotidem vzrostla na 3595 ± 1672 cpm (n = 4) ve stěně cévy, zatímco hladiny v periadventiciální tkáni poklesly na 432 ± 201 cpm (n = 4). Výše uvedená hladina oligonukleotidů byla dosažena přes rychlé vyprázdnění plazmy ($t_{1/2}$ 15 ± 2 min). Množství detekovaných oligonukleotidů při 30 minutách a 3 dnech odpovídalo 0,1 % celkově administrované dávky. Tyto výsledky indikují, že transkatétrové podávání pod tlakem vede k depozici antisenzních oligonukleotidů v mediálních a adventiciálních tkáních a v perivaskulárních tkáních.

E. Vaskulární integrita po intramurální administraci oligonukleotidů.

Protože transkatétrová injekce pod tlakem jakéhokoliv terapeutického činidla do stěny arterie může indukovat vaskulární poničení, měřil se rozsah poničení. Nejdříve se s použitím kvalitativní koronární angiografie pozorovala neprůtoková limitující koronární disekce v 1 z 14 intramurálních injekcí v prasečích koronárních arteriích, neodolávajících předchozímu poranění zvětšelým balonkem. Za druhé se ke stanovení luminálního průměru po intramurálním dopravení oligonukleotidů (n = 14) použila kvantitativní koronární angiografie. Nebyla pozorována žádná signifikantní změna v luminálním průměru po transkatétrové administraci oligonukleotidů (tabulka V). Za třetí se s použitím světelné mikroskopie stanovily účinky transkatétrové injekce oligonukleotidů. Pro určení jemných změn ve složkách celulární a extracelulární matrice ve stěně cévy se vyhodnocovaly řezy koronárních arterií s transmurální distribucí oligonukleotidů a žádnou viditelnou disekcí. Jak ukazuje obr. 30a, transmurální distribuce oligonukleotidů (obr. 30a) byla spojena s intaktní vnitřní elastickou laminou a elastickými tkáněmi ve stěně cévy (obr. 30b). Slabý pokles v cytoplazmovém zbarvení a jaderná pyknóza byla příležitostně pozorována v místě retence oligonukleotidů po 30 min (obr. 30c). Tyto změny nebyly pozorovány po 3 dnech po dopravení (obr. 30d).

Příklad 19

Rychlá jaderná lokalizace c–*myc* antisenzních oligonukleotidů *in vitro* v lidských buňkách hladkého svalstva a *in vivo* v prasečích buňkách hladkého svalstva.

Tento příklad dále ukazuje účinnost terapie c–*myc* antisenzními oligonukleotidy *in vivo* ukázáním rychlé lokalizace c–*myc* antisenzních oligonukleotidů v jádru buněk hladkého svalstva jak *in vitro* (lidských), tak *in vivo* (prasečích). Tento rychlý časový průběh umožňuje inhibici aktivace c–*myc* antisenzního genu, dříve stanovenou v řádu hodin (3 až 4 hodiny).

A. Intracelulární lokalizace karboxyfluoresceinem značených c–*myc* antisenzních oligonukleotidů.

Pro analýzu intracelulární lokalizace fluorescenčně značených oligonukleotidů *in vitro* se použil laserový skenovací konfokální mikroskop (model Zeiss Axiovert 100), vybavený MRC–600 krypton–argonovým laserem (Bio–Rad). Krypton–argonový laser emituje laserové linie při excitační vlnové délce 488 nm. Indukované fluorescenční světlo je skenováno přes objektiv 63x a konvertováno na video signál pro zobrazení na obrazovce počítače. Obrazy se fotografovaly

z obrazovky počítače na filmy Kodak Ektachrome 100. Pro studie *in vivo* k určení časového průběhu příjmu oligonukleotidů vaskulárními buňkami hladkého svalstva se buňky 2 dny pěstovaly na komůrkových krycích sklíčkách v médiu, obsahujícím 10% fetální hovězí sérum a poté se na 2 minuty, 30 minut a 2 hodiny přidaly fluoresceinem značené oligonukleotidy (8 μM). Buňky se poté promyly 3 krát s PBS a fixovaly 50% acetonem a 50% methanolem.

B. Celulární příjem antisenzních oligonukleotidů.

Intramurální podávání antisenzních oligonukleotidů je následováno rychlým celulárním příjmem oligonukleotidů, aby se umožnila inhibice exprese cílového genu, v tomto případě c–*myc*. Jak ukazuje obr. 31, vaskulární buňky hladkého svalstva vykazují *in vitro* preferenční jadernou lokalizaci fluorescence 30 minut po inkubaci s fluoresceinem značeným oligonukleotidy. Podobně 30 minut po *in vivo* transkatetrové administraci v prasatech byla jaderná lokalizace oligonukleotidů pozorovaná v médii (obr. 32) a adventicii (obr. 33), což ukazuje srovnatelně rychlý příjem antisenzních oligonukleotidů *in vivo*. K intracelulárnímu příjmu antisenzních oligonukleotidů vaskulárními buňkami hladkého svalstva *in vitro* a *in vivo* dochází během kritického časového okna, poskytnutého pro modulaci c–*myc* protoonkogenu, důležitého inducibilního genu regulujícího proliferaci buněk hladkého svalstva po poranění stěny cévy.

Průmyslová využitelnost

Vynález poskytuje způsob terapie poruch, spojených s nepřiměřenou syntézou proteinů extracelulární matrice s použitím oligonukleotidových antisenzních a antigenových látek. Vynález poskytuje způsob prevence selhání místa hemodialyzačního přístupu a vaskulárních štěpů stykem místa hemodialyzačního přístupu nebo vaskulárního štěpu s oligonukleotidem, komplementárním k jaderné protoonkogenové mRNA. Vynález dále poskytuje způsob redukce vzniku jizev v lidské tkáni administrací terapeuticky efektivního množství antisenzního oligonukleotidu protoonkogenu do tkáně. Vynález také poskytuje způsob inhibice vzniku fibrózní pojivové tkáně administrací terapeuticky efektivního množství antisenzního oligonukleotidu protoonkogenu.

Seznam sekvencí

Sekvence ID No:1:

(i) sekvenční charakteristika:
(A) Délka: 15 nukleotidů
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Vláknitost: jednoduchá
(D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence: sekvence ID No:1:

AACGTTGAGG GGCAT 15

Sekvence ID No:2:

(i) sekvenční charakteristika:
(A) Délka: 15 nukleotidů
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Vláknitost: jednoduchá
(D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence: sekvence ID No:2:

ATGCCCCTCA ACGTT 15

Sekvence ID No:3:

(i) sekvenční charakteristika:
(A) Délka: 15 nukleotidů
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Vláknitost: jednoduchá
(D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence: sekvence ID No:3:

AACGTGGATT GGCAG 15

Sekvence ID No:4:

(i) sekvenční charakteristika:
(A) Délka: 15 nukleotidů
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Vláknitost: jednoduchá
(D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence: sekvence ID No:4:

GAACGGAGAC GGTTT 15

Sekvence ID No:5:

(i) sekvenční charakteristika:
(A) Délka: 24 nukleotidů
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Vláknitost: jednoduchá
(D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence: sekvence ID No:5:

TATGCTGTGC CGGGGTCTTC GGGC 24

Sekvence ID No:6:

(i) sekvenční charakteristika:
(A) Délka: 19 nukleotidů
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Vláknitost: jednoduchá
(D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence: sekvence ID No:6:

GGGAGAGTCG CGTCCTTGCT 20

Sekvence ID No:7:

(i) sekvenční charakteristika:
(A) Délka: 20 nukleotidů
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Vláknitost: jednoduchá
(D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence: sekvence ID No:7:

TCATGGAGCA CCAGGGGCTC 20

Sekvence ID No:8:

(i) sekvenční charakteristika:
(A) Délka: 20 nukleotidů
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Vláknitost: jednoduchá
(D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence: sekvence ID No:8:

TCATGGAGCA CCAGGGGCTC 20

Sekvence ID No:9:

(i) sekvenční charakteristika:
(A) Délka: 20 nukleotidů
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Vláknitost: jednoduchá
(D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence: sekvence ID No:9:

GGCCTTTTCA TTGTTTTCCA 20

Sekvence ID No:10:

(i) sekvenční charakteristika:
(A) Délka: 17 nukleotidů
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Vláknitost: jednoduchá
(D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence: sekvence ID No:10:

CATTGTTTTC CAACTCC 17

Sekvence ID No:11:

(i) sekvenční charakteristika:
(A) Délka: 17 nukleotidů
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Vláknitost: jednoduchá
(D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence: sekvence ID No:11:

TTCATTGTTT TCCAATT 17

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použití oligonukleotidu, specifického pro *c–myc* nebo *c–myb*, pro přípravu farmaceutické kompozice pro prevenci selhání hemodialyzačního místa v hemodialytickém pacientovi.

2. Použití oligonukleotidu podle nároku 1 pro přípravu farmaceutické kompozice pro prevenci selhání hemodialyzačního místa, vybraného ze skupiny, skládající se z BresciaCiminovy píštěle, tabatěrkové píštěle, brachiocefalové píštěle, PTFE hemodialyzačního štěpu, štěpu hovězí koronární arterie a autogenních štěpů.

3. Použití oligonukleotidu, specifického pro *c–myc* nebo *c–myb*, pro přípravu farmaceutické kompozice pro ošetření vaskulárních štěpů.

4. Použití oligonukleotidu podle nároku 3 pro přípravu farmaceutické kompozice pro ošetření vaskulárních štěpů, vybraných ze skupiny, skládající se z prostetické píštěle, arteriovenózního shuntu, přirozené píštěle, žilní píštěle, venózního štěpu, imunosupresovaného alloštěpu, imunosupresovaného xenoštěpu a venózního autoštěpu.

5. Použití oligonukleotidu podle kteréhokoliv z předcházejících nároků 1 až 4, kde oligonukleotid je specifický pro *c–myc*.

6. Použití oligonukleotidu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, kde oligonukleotid je specifický pro *c–myb*.

7. Použití oligonukleotidu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, kde oligonukleotid je vybraný ze skupiny, skládající se z SEQ ID NOS: 1, 5, 6 a 7.

8. Použití oligonukleotidu podle kteréhokoliv z předcházejících nároků 1 až 7, kde oligonukleotid je odolný proti nukleáze a má délku 20 až 60 nukleotidů.

9. Způsob *ex vivo* prevence selhání vaskulárního štěpu, vyrobeného ze žil, **vyznačující se tím**, že se žíla kontaktuje ex vivo s oligonukleotidem, specifickým pro *c–myc* nebo *c–myb*.

10. Způsob podle nároku 9, **vyznačující se tím**, že se žíla kontaktuje inkubaci s oligonukleotidem alespoň 10 minut ve sterilním fyziologicky přijatelném pufru.

11. Způsob podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že fyziologicky přijatelný pufr má teplotu 20 až 37 °C.

12. Způsob podle nároků 9 až 11, **vyznačující se tím**, že oligonukleotid má koncentraci 10 až 200 μM.

13. Způsob podle nároků 9 až 12, **vyznačující se tím**, že žíla je vybraná ze skupiny safenózních žil, cefalových žil, basilických žil, brachiálních žil a femorálních žil.

14. Způsob podle nároků 9 až 13, **vyznačující se tím**, že oligonukleotid je specifický pro *c–myc*.

15. Způsob podle nároků 9 až 13, **vyznačující se tím**, že oligonukleotid je specifický pro *c–myb*.

16. Způsob podle nároků 9 až 13, **vyznačující se tím**, že oligonukleotid je vybraný ze skupiny, skládající se z SEQ ID NOS: 1, 5, 6 a 7.

17. Prostředek pro prevenci selhání hemodialyzačního místa, **vyznačující se tím**, že obsahuje vyjmutou žílu, kompatibilní s lidským organizmem a oligonukleotid, lokalizovaný v cévní stěně žíly, kompatibilní s lidským organizmem, kde oligonukleotid je specifický pro *c–myc* nebo *c–myb*.

18. Prostředek podle nároku 17, **vyznačující se tím**, že vyjmutá žíla, kompatibilní s lidským organizmem, je vybraná ze skupiny safenózních žil, cefalových žil, basilických žil, brachiálních žil a femorálních žil.

19. Prostředek podle nároku 17 nebo 18, **vyznačující se tím**, že oligonukleotid je lokalizován alespoň v jedné vrstvě stěny cévy, vybrané ze skupiny, skládající se z endothelové vrstvy, střední a nahodile.

20. Prostředek podle nároku 18, **vyznačující se tím**, že oligonukleotid má koncentraci alespoň 10 μM alespoň v jedné vrstvě.

21. Prostředek podle nároků 17 až 20, **vyznačující se tím**, že oligonukleotid je specifický pro *c–myc*.

22. Prostředek podle nároků 17 až 20, **vyznačující se tím**, že oligonukleotid je specifický pro *c–myb*.

23. Prostředek podle nároků 17 až 20, **vyznačující se tím**, že oligonukleotid je vybraný ze skupiny, skládající se z SEQ ID NOS: 1, 5, 6, a 7.

24. Farmaceutická kompozice, **vyznačující se tím**, že obsahuje polynukleotid, specifický pro *c–myc* nebo *c–myb*, pro použití při prevenci selhání hemodialyzačního místa v hemodialytickém pacientovi nebo pro ošetření vaskulárního štěpu.

25. Farmaceutická kompozice podle nároku 24 pro použití při prevenci selhání hemodialyzačního místa, vybraného ze skupiny, skládající se z BresciaCiminovy píštěle, tabatěrkové píštěle, brachiocefalové píštěle, PTFE hemodialyzačního štěpu, štěpu hovězí koronární arterie a autogenních štěpů.

26. Farmaceutická kompozice podle nároku 24 pro použití při ošetření vaskulárních štěpů, vybraných ze skupiny, skládající se z prostetické píštěle, arteriovenózního shuntu, přirozené píštěle, žilní píštěle, venózního štěpu, imunosupresovaného alloštěpu, imunosupresovaného xenoštěpu a venózního autoštěpu.

27. Farmaceutická kompozice podle nároků 24 až 26, **vyznačující se tím**, že oligonukleotid je specifický pro *c–myc*.

28. Farmaceutická kompozice podle nároků 24 až 26, **vyznačující se tím**, že oligonukleotid je specifický pro *c–myb*.

29. Farmaceutická kompozice podle nároků 24 až 26, **vyznačující se tím**, že oligonukleotid je vybraný ze skupiny, skládající se z SEQ ID NOS: 1, 5, 6, a 7.

30. Prostředek nebo farmaceutická kompozice podle nároků 22 až 29, **vyznačující se tím**, že je obsažena v implantátu nebo nádržce pro vložení do perivaskulární tkáně.

31. Prostředek nebo farmaceutická kompozice podle nároků 22 až 29, **vyznačující se tím**, že oligonukleotid je odolný proti nukleáze a má délku 20 až 60 nukleotidů.

31 výkresů

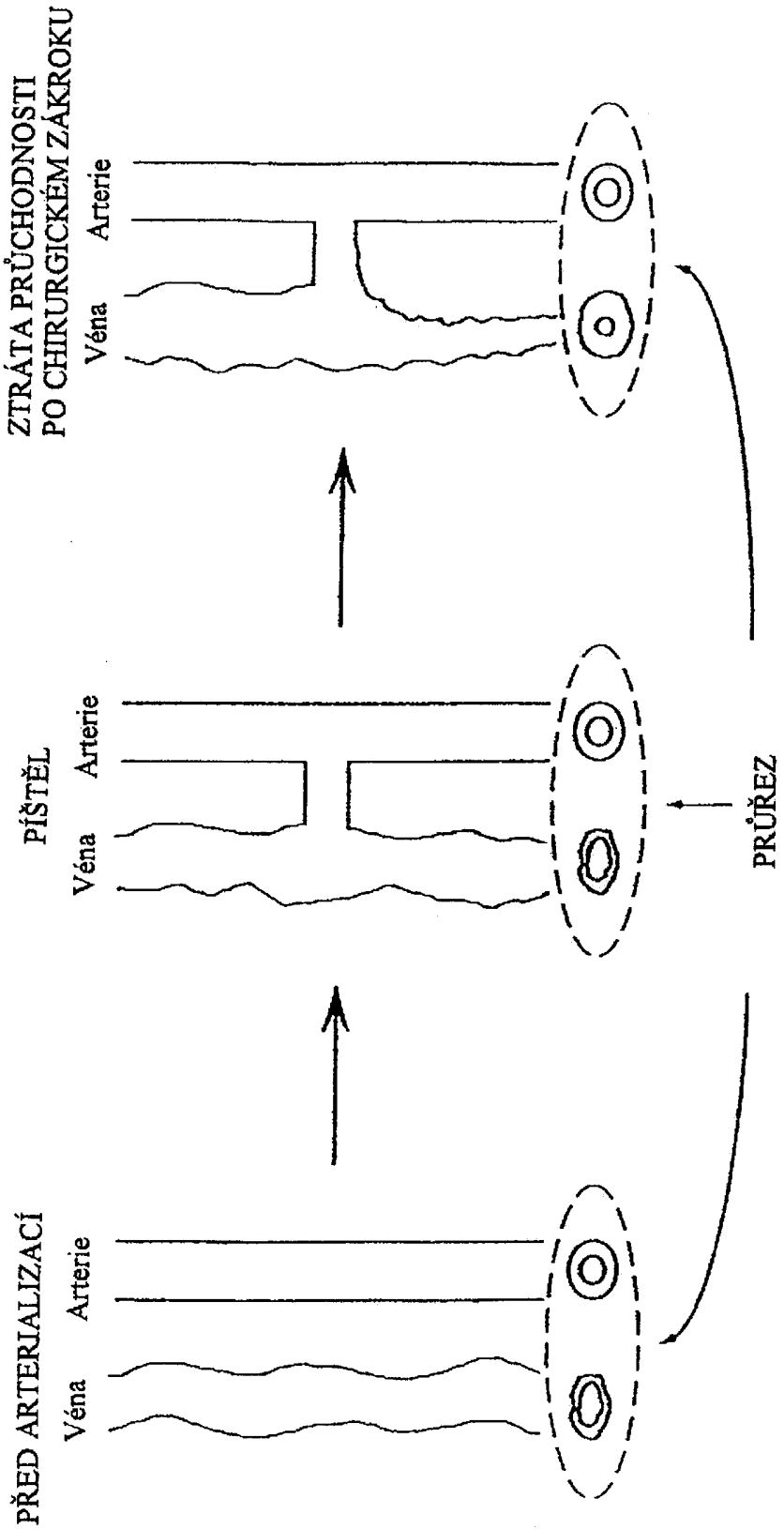

PŘED ARTERIALIZACÍ
Véna
Arterie
PÍŠTĚL
Véna
Arterie
ZTRÁTA PRŮCHODNOSTI
PO CHIRURGICKÉM ZÁKROKU
Véna
Arterie
PRŮŘEZ

FIG. 1



FIG.2A

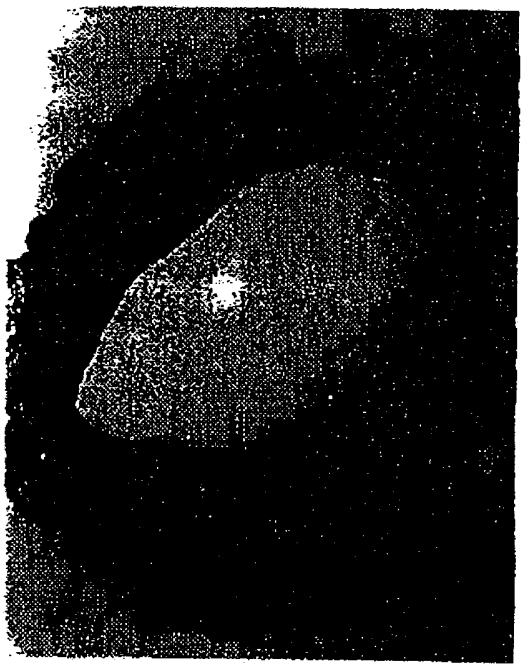


FIG.2B



FIG.3A



FIG.3B



FIG.4A

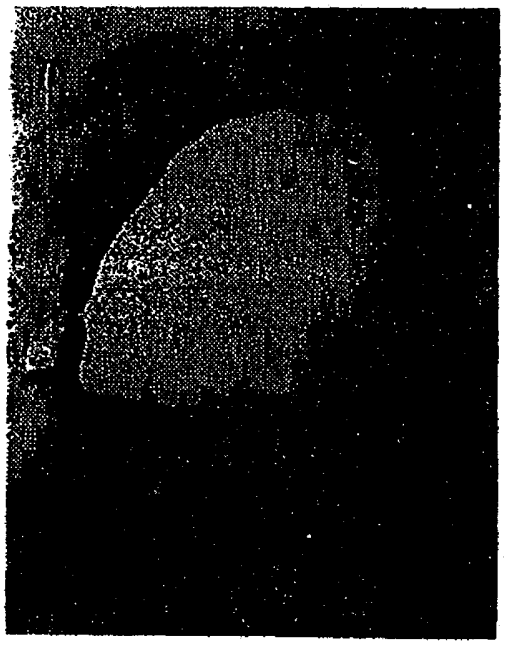


FIG.4B



FIG.4C



FIG.5A



FIG.5B



FIG.5C

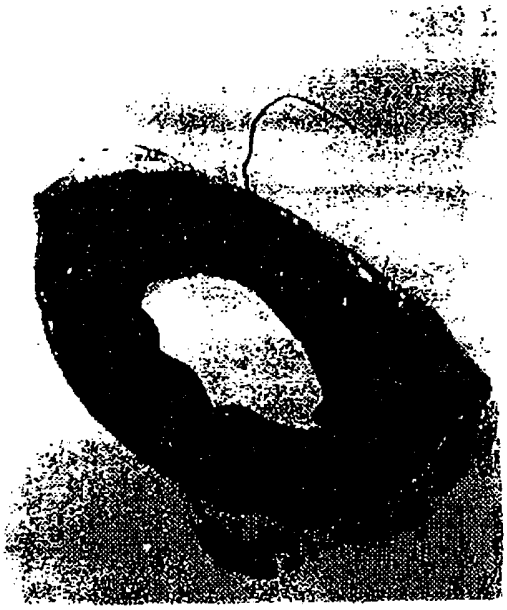


FIG.6A



FIG.6B

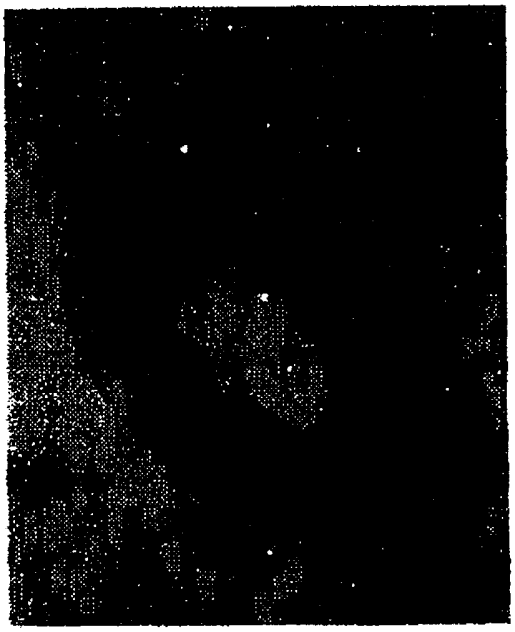


FIG.6C



FIG.6D

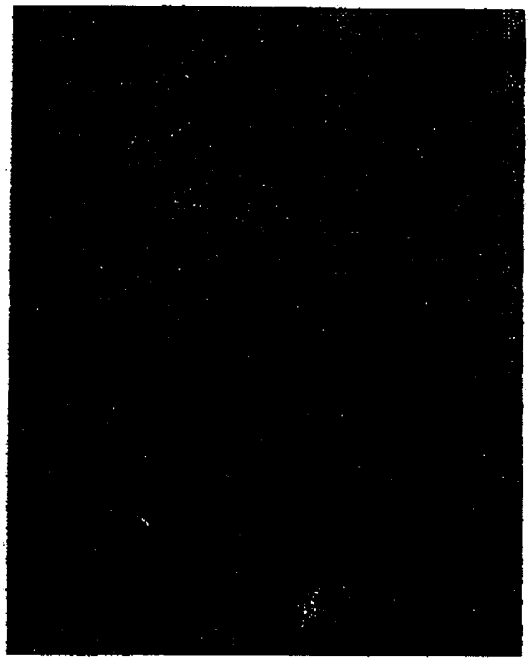


FIG.7A

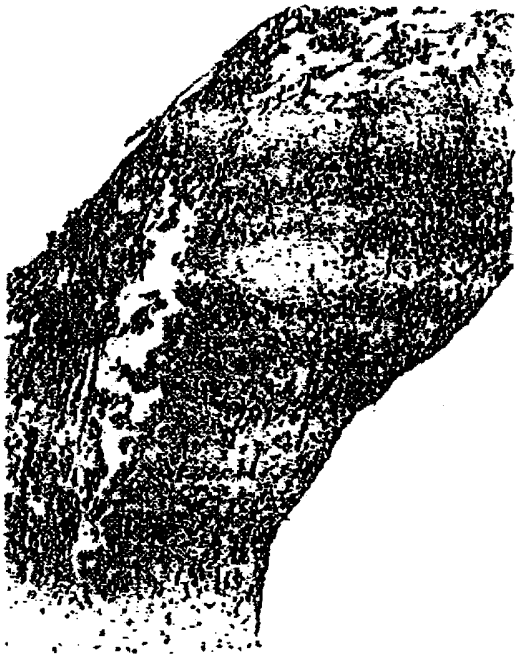


FIG.7B

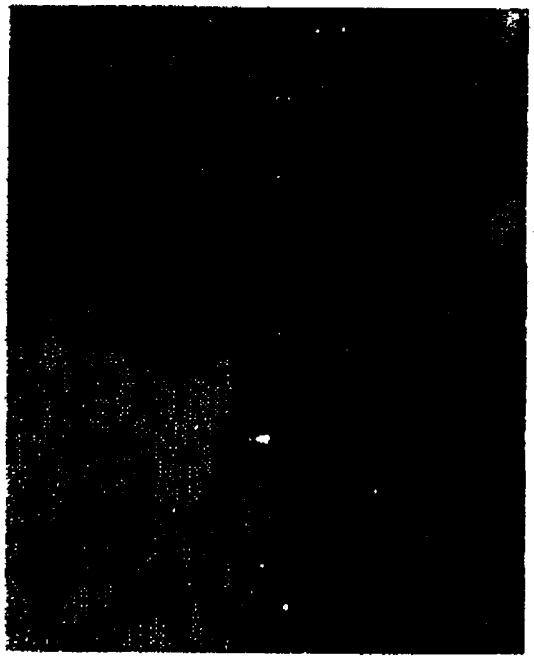


FIG.7C

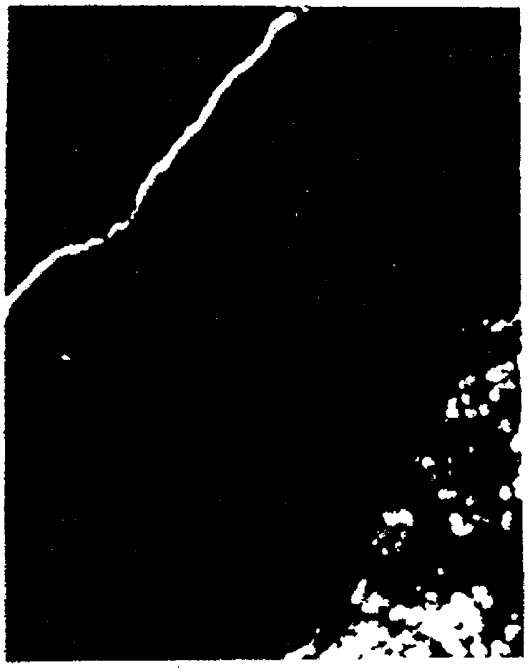


FIG.8A



FIG.8B



FIG.8C



FIG.8D



FIG.9A



FIG.9B



FIG.9C



FIG.10



FIG.11

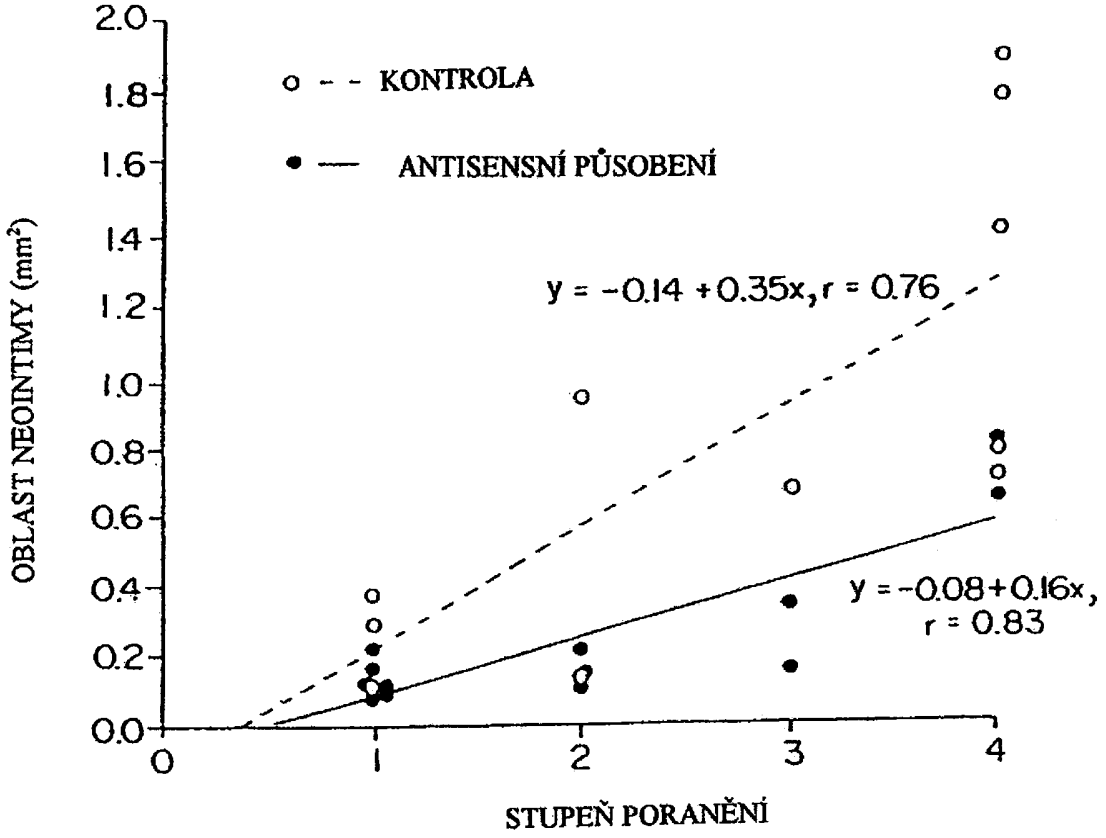

2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
OBLAST NEOINTIMY (mm²)
o - - KONTROLA
• — ANTISENSNÍ PŮSOBENÍ
y = -0.14 +0.35x, r = 0.76
y = -0.08+0.16x,
r = 0.83
0
1
2
3
4
STUPEŇ PORANĚNÍ

FIG. 12

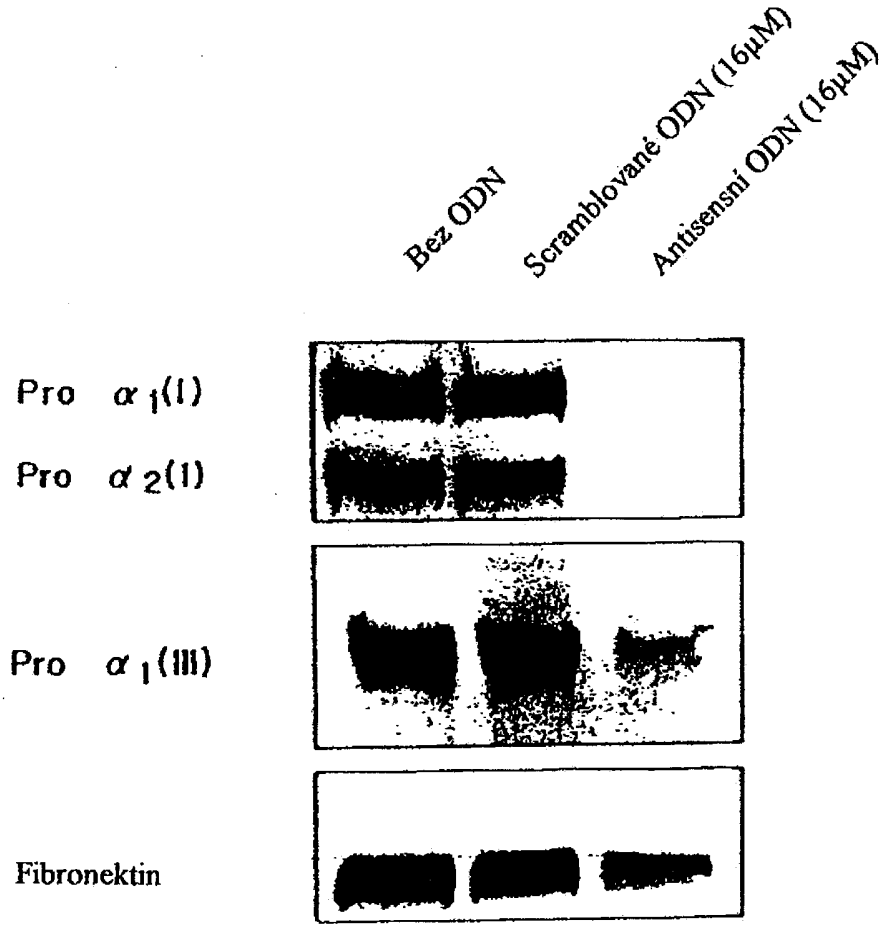

Bez ODN
Scramblované ODN (16μM)
Antisensní ODN (16μM)
Pro α1(I)
Pro α2(I)
Pro α1(III)
Fibronektin

FIG.13

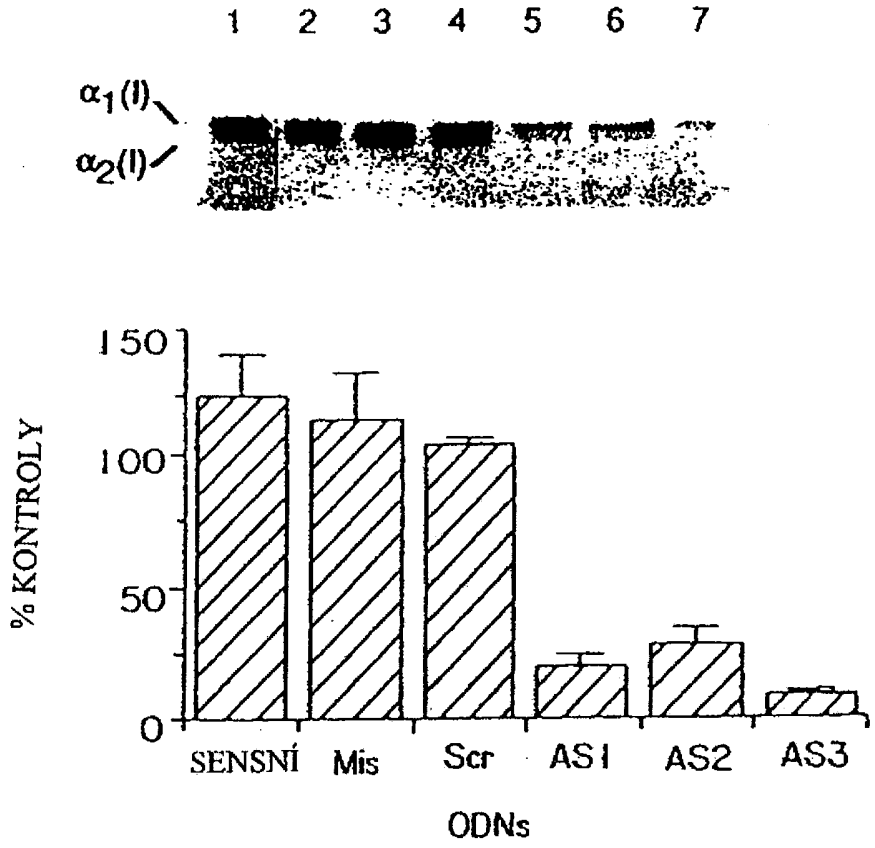

1 2 3 4 5 6 7
α1(I)
α2(I)
150
100
50
0
% KONTROLY
SENSNÍ
Mis
Scr
AS1
AS2
AS3
ODNs

FIG.14

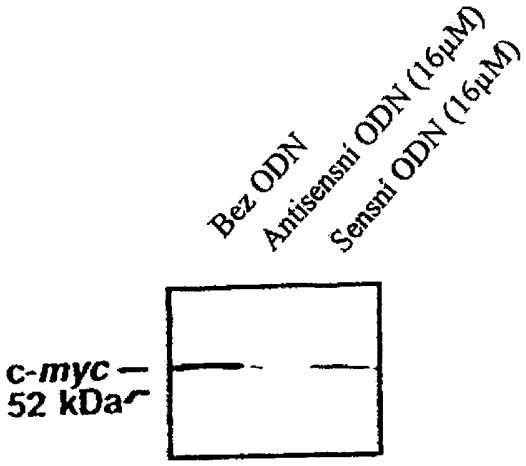

Bez ODN
Antisensní ODN (16μM)
Sensní ODN (16μM)
c-myc
52 kDa

FIG.15

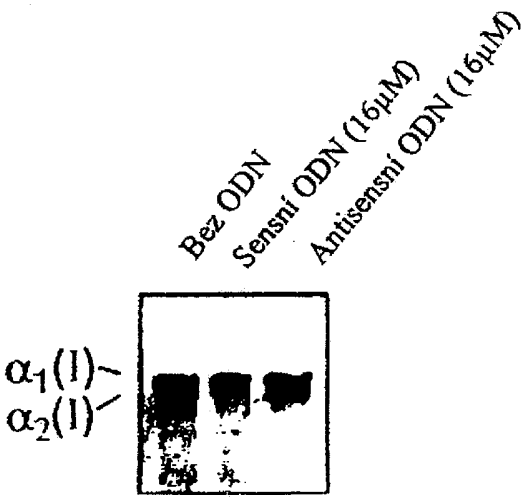

Bez ODN
Sensní ODN (16μM)
Antisensní ODN (16μM)
α1(I)
α2(I)

FIG.17

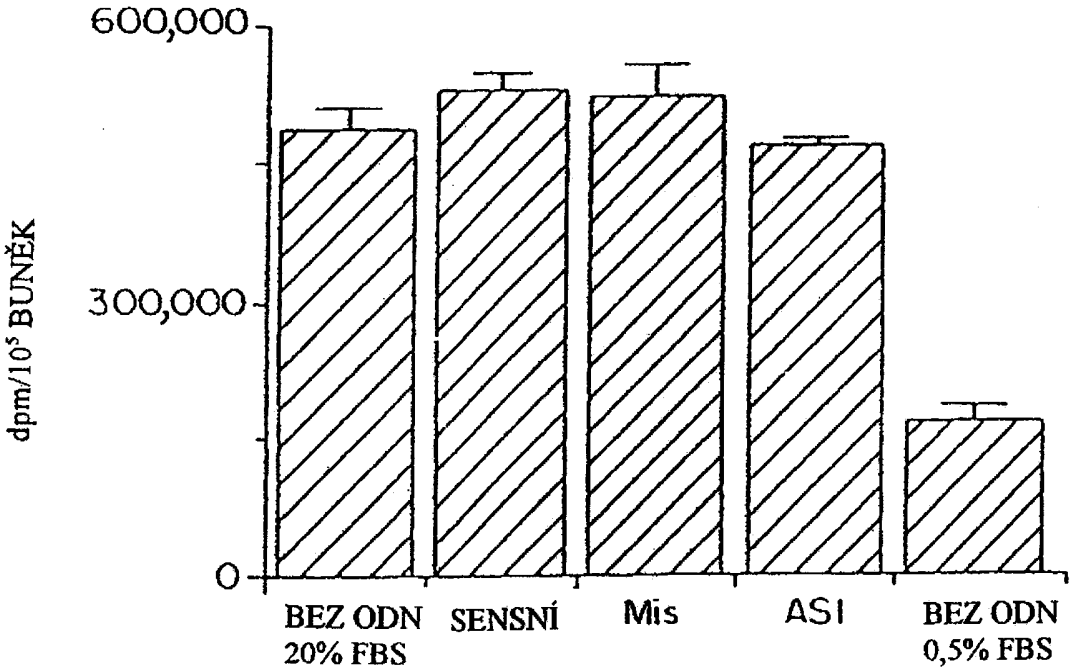

600,000
300,000
0
dpm/10⁵ BUNĚK
BEZ ODN
20% FBS
SENSNÍ
Mis
ASI
BEZ ODN
0,5% FBS

FIG. 16

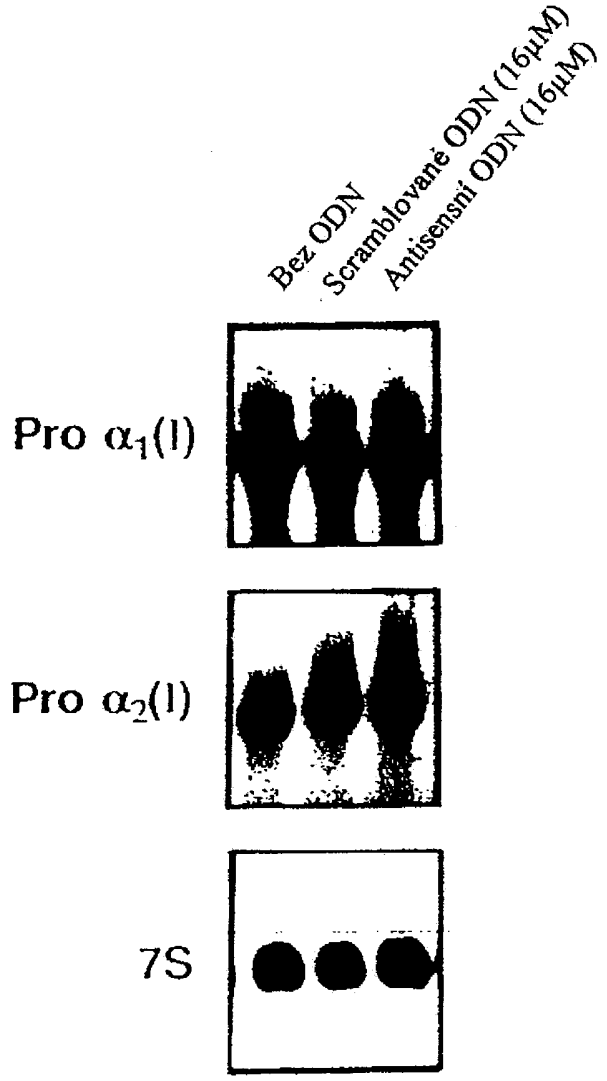

Bez ODN
Scramblované ODN (16μM)
Antisensní ODN (16μM)
Pro α1(I)
Pro α2(I)
7S

FIG.18

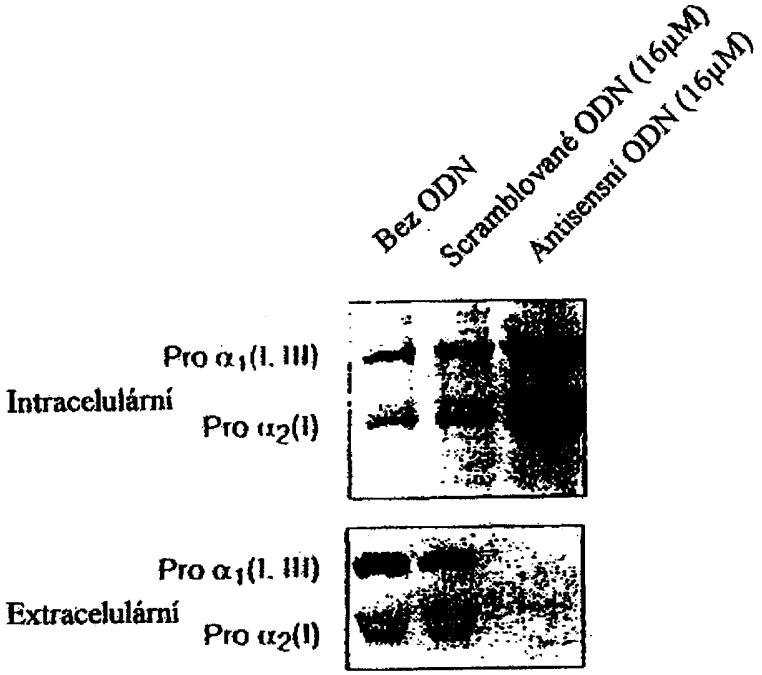

Bez ODN
Scramblované ODN (16μM)
Antisensní ODN (16μM)
Pro α1(I. III)
Intracelulární
Pro α2(I)
Pro α1(I. III)
Extracelulární
Pro α2(I)

FIG.19

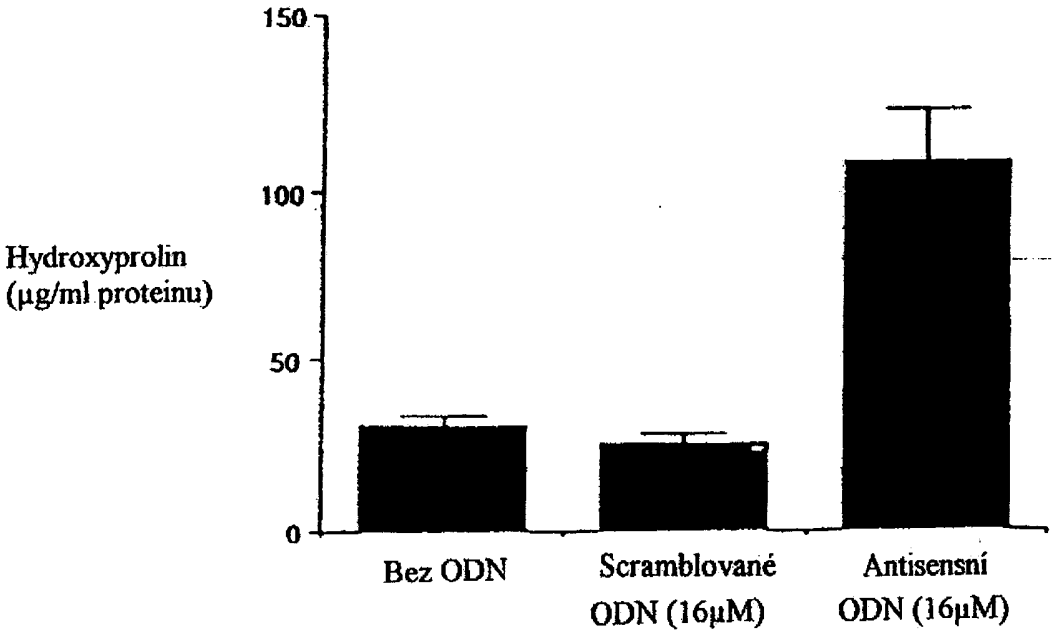

Hydroxyprolin
(μg/ml proteinu)
150
100
50
0
Bez ODN
Scramblované ODN (16μM)
Antisensní ODN (16μM)

FIG.20

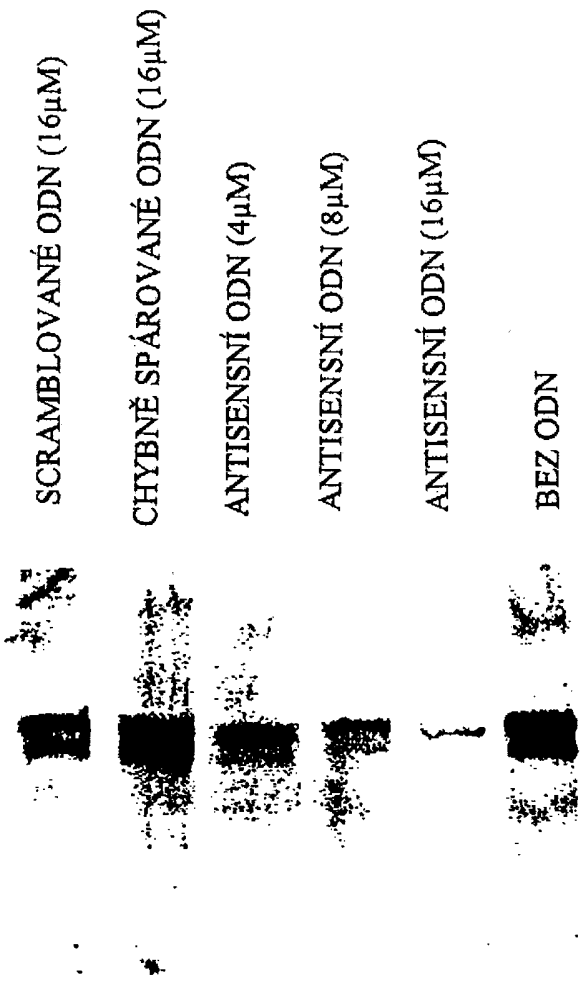

SCRAMBLOVANÉ ODN (16μM)
CHYBNĚ SPÁROVANÉ ODN (16μM)
ANTISENSNÍ ODN (4μM)
ANTISENSNÍ ODN (8μM)
ANTISENSNÍ ODN (16μM)
BEZ ODN

FIG. 21

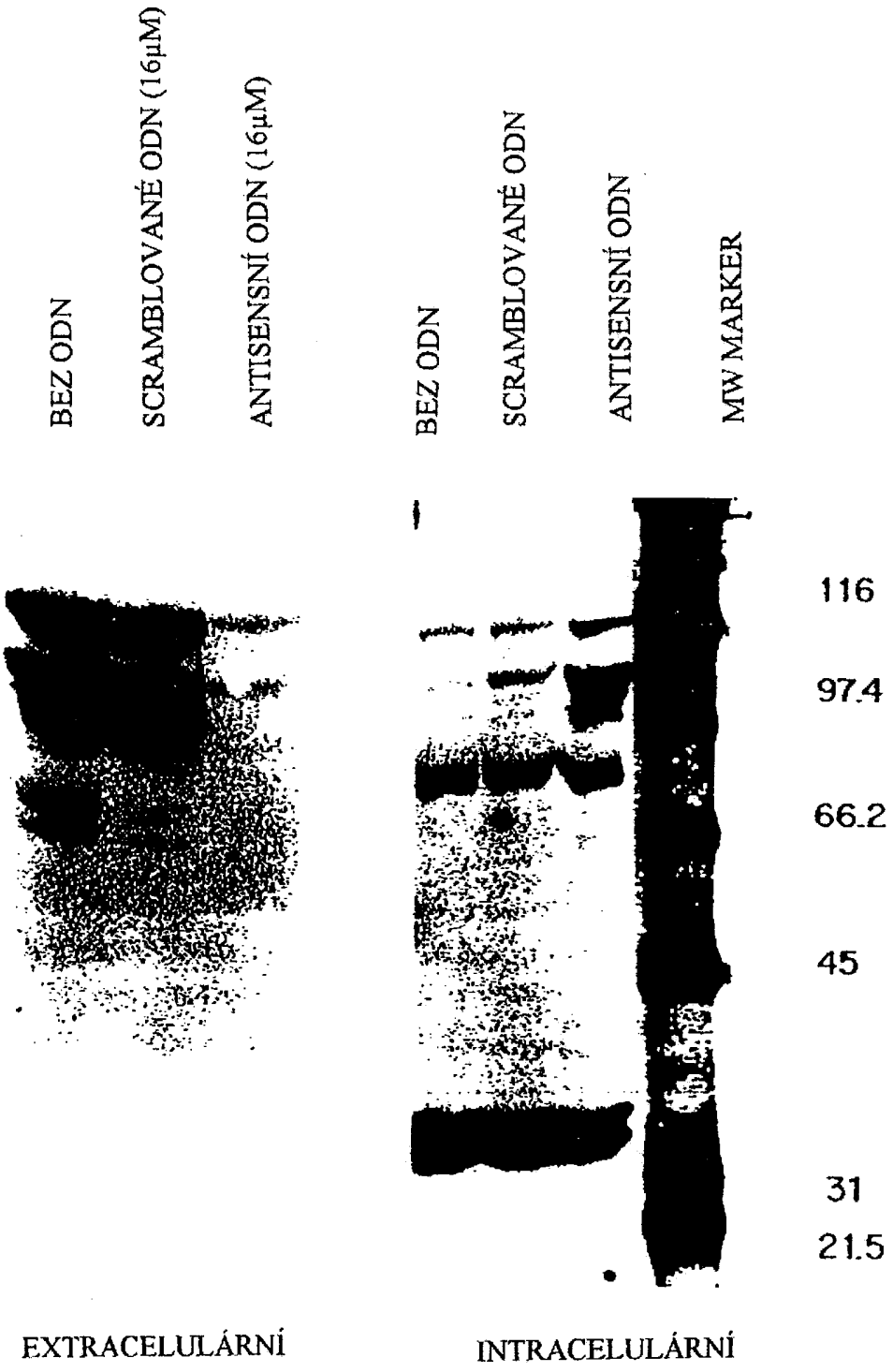

BEZ ODN
SCRAMBLOVANÉ ODN (16μM)
ANTISENSNÍ ODN (16μM)
BEZ ODN
SCRAMBLOVANÉ ODN
ANTISENSNÍ ODN
MW MARKER
116
97.4
66.2
45
31
21.5
EXTRACELULÁRNÍ
INTRACELULÁRNÍ

FIG.22

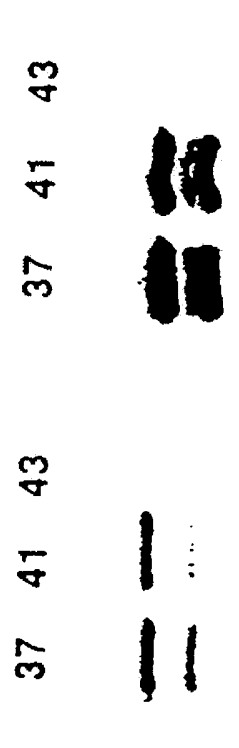

Bez ODN
Scramblované ODN (16μM)
Antisensní ODN (16μM)
Teplota (°C)
37 41 43 37 41 43 37 41 43
α1 (I) —
α2 (I) —

FIG.23

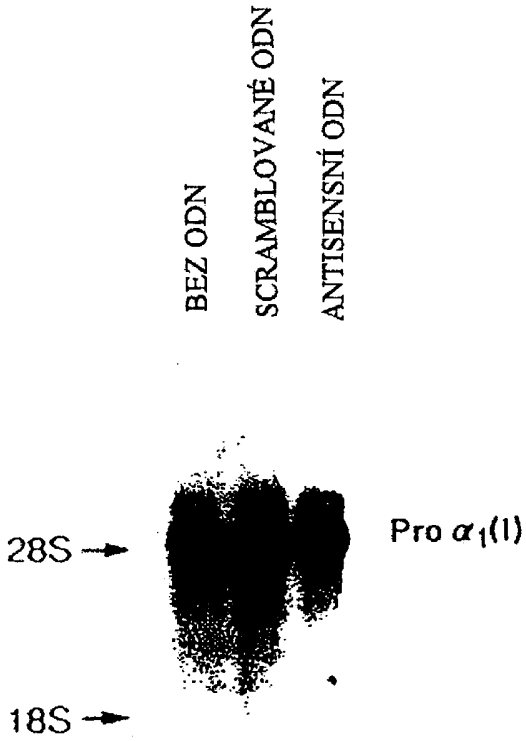

BEZ ODN
SCRAMBLOVANÉ ODN
ANTISENSNÍ ODN
28S
18S
Pro α_1(I)

FIG.24

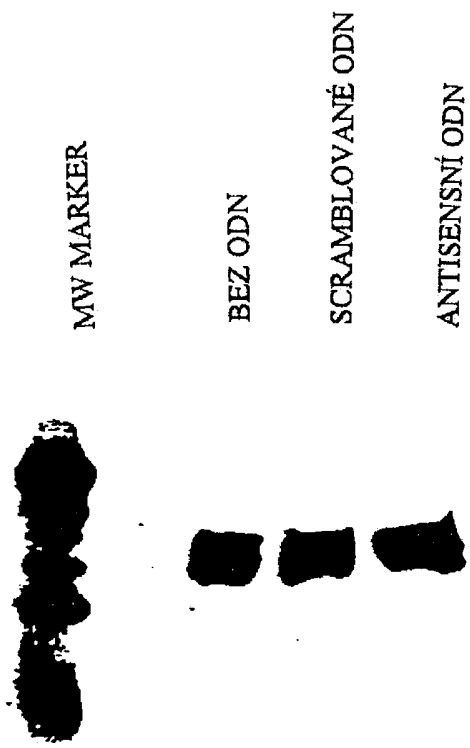

MW MARKER
BEZ ODN
SCRAMBLOVANÉ ODN
ANTISENSNÍ ODN

FIG.25



FIG.26

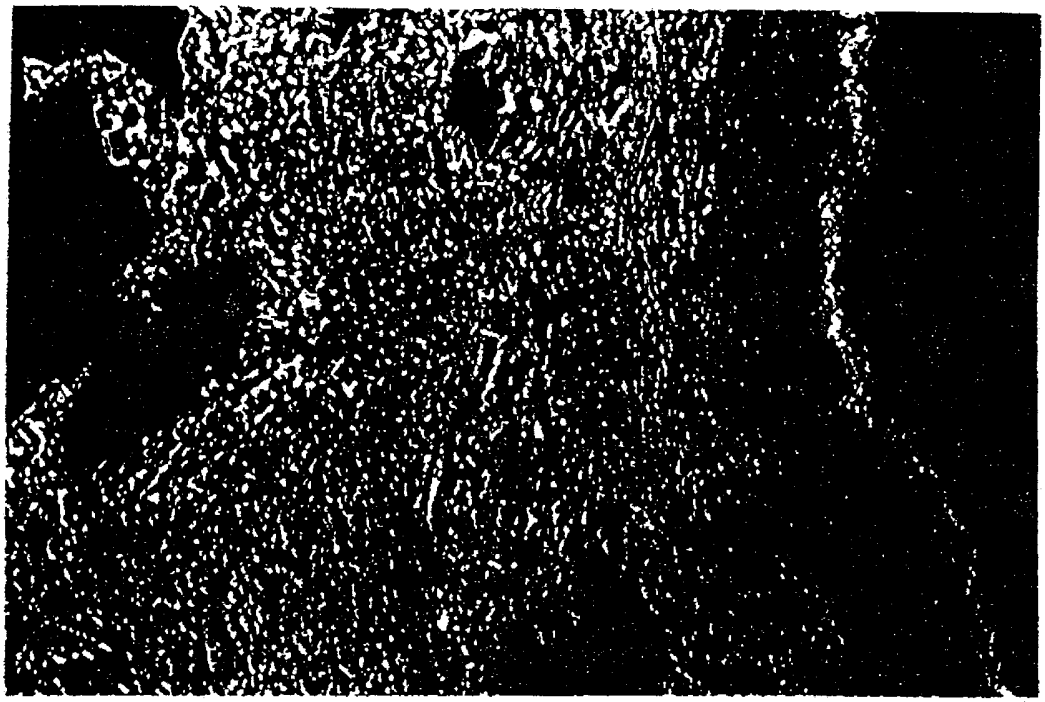


FIG.27A

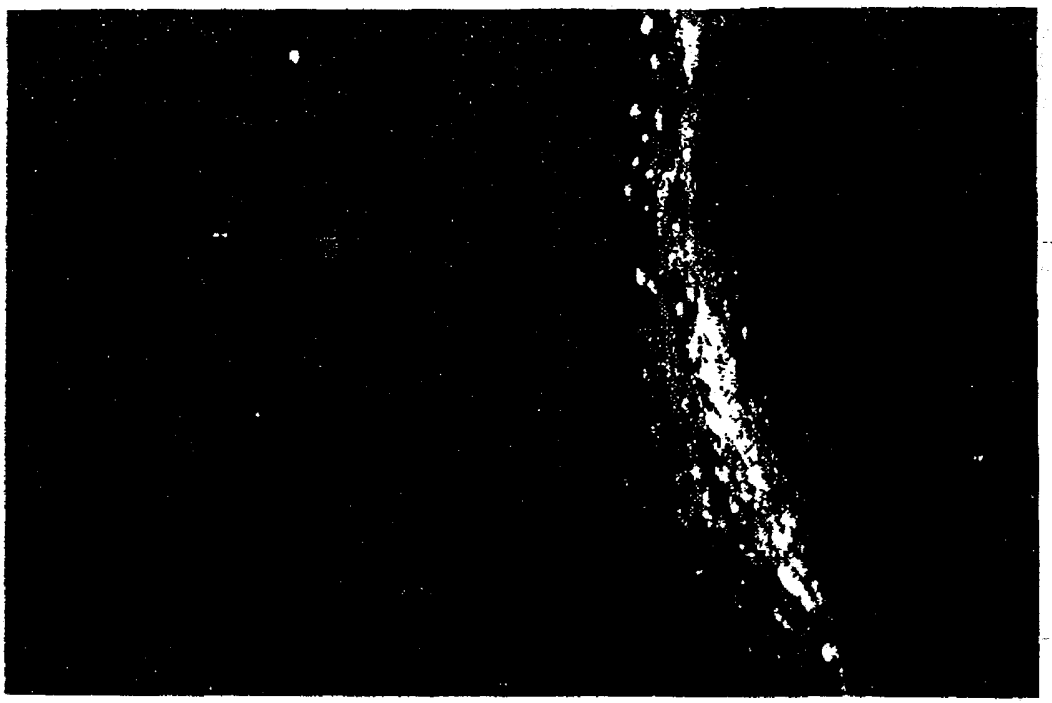


FIG 27B



FIG.27C

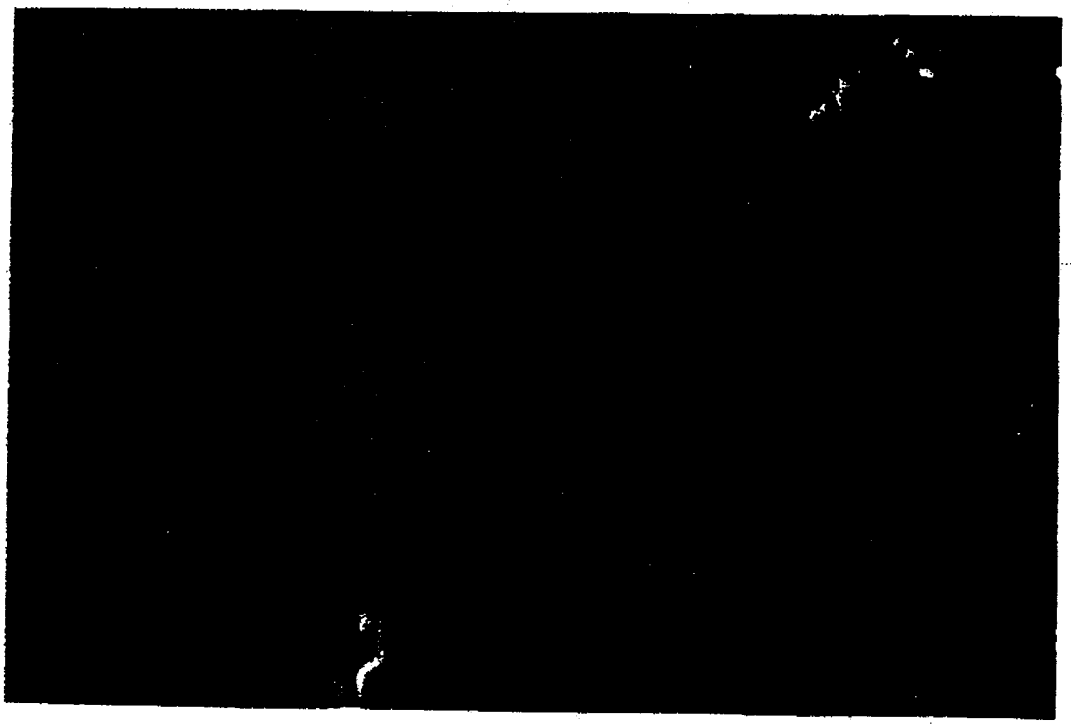


FIG 27D

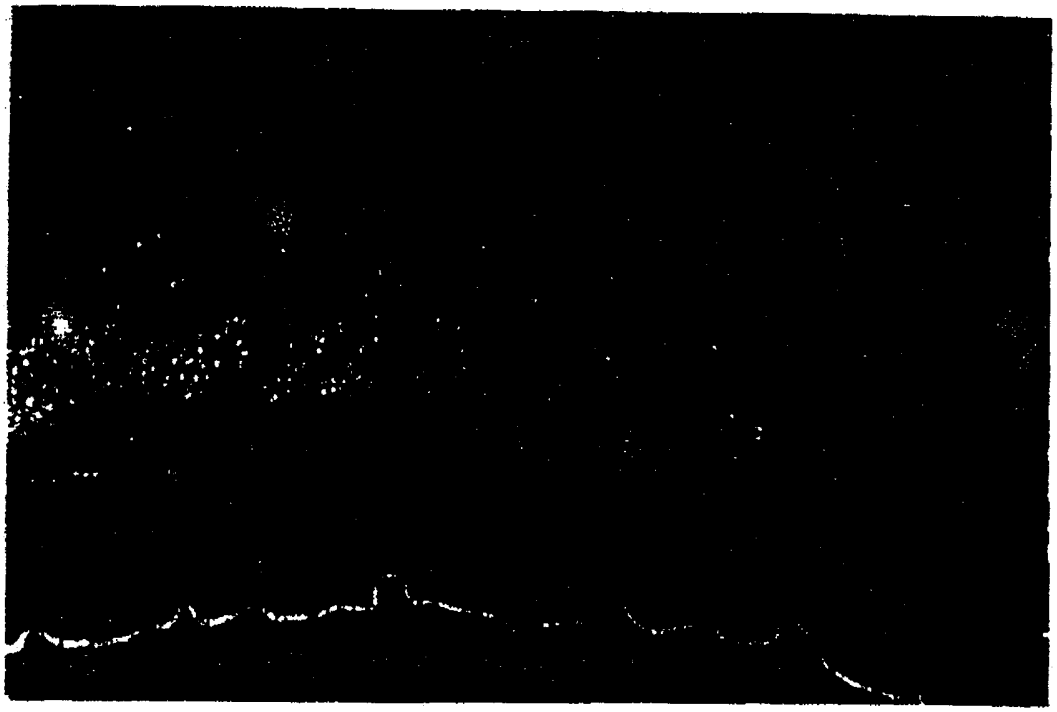


FIG.27E



FIG 27F

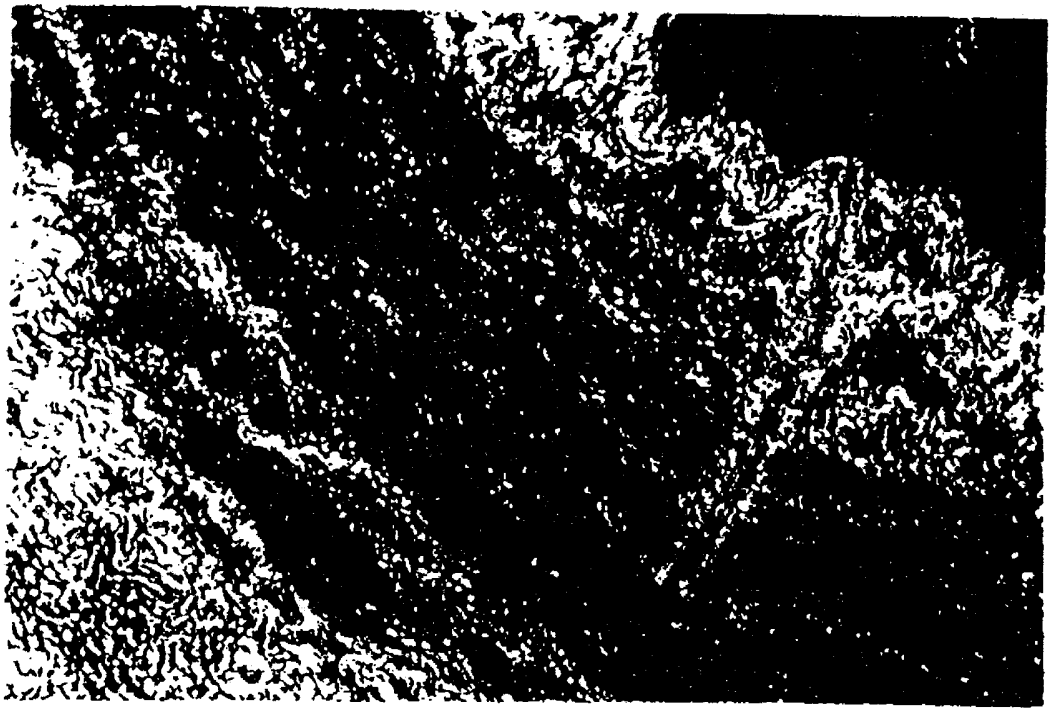


FIG.28A

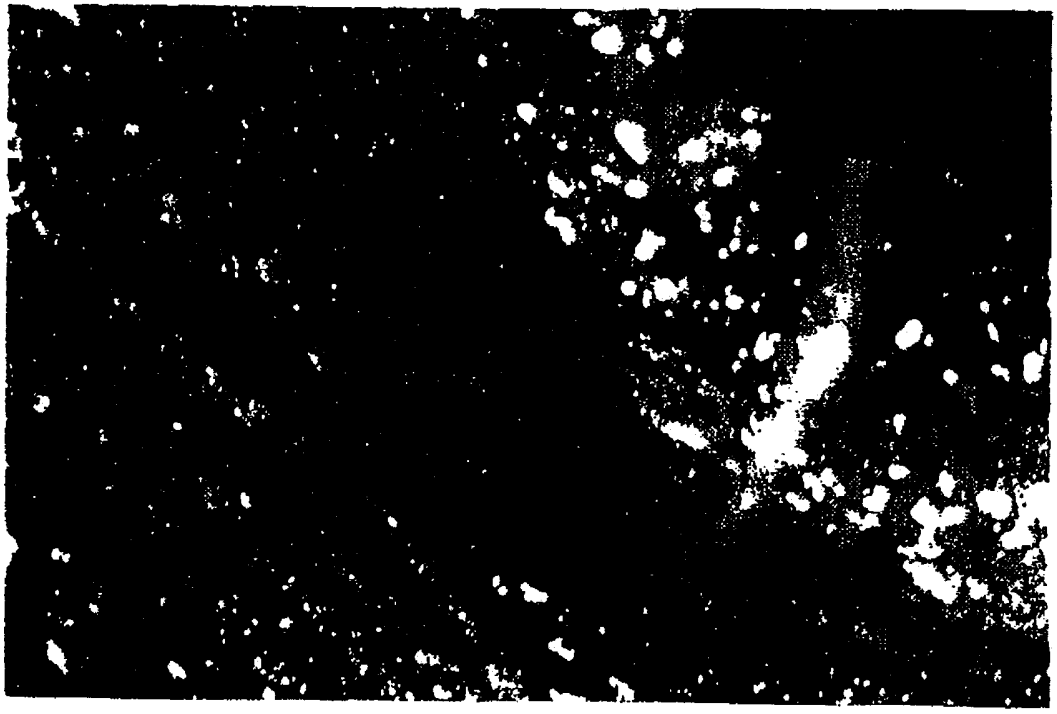


FIG 28B

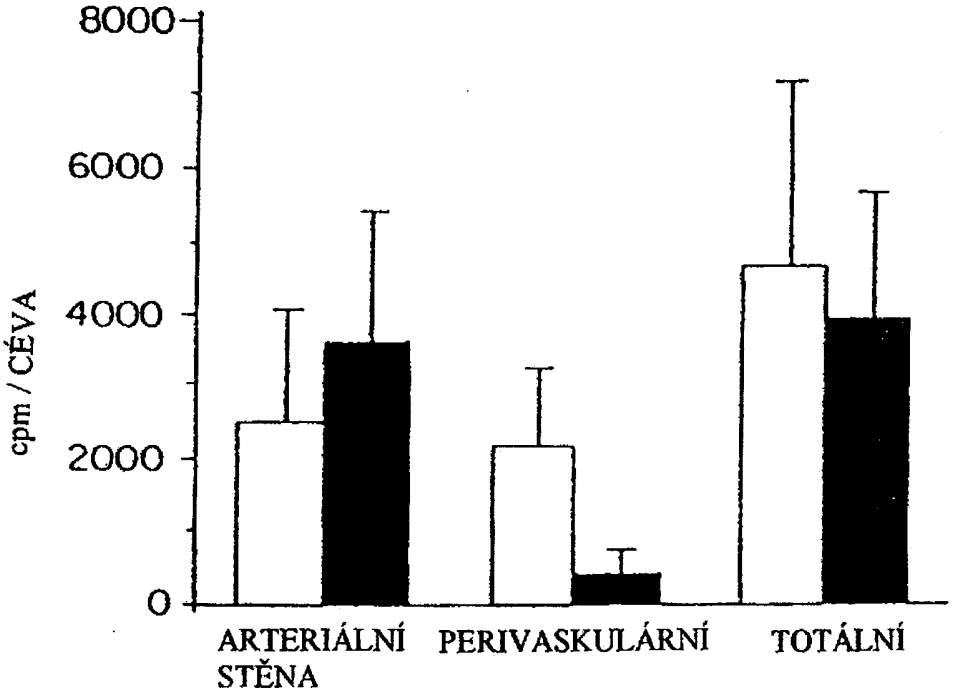

8000
6000
4000
2000
0
cpm / CÉVA
ARTERIÁLNÍ STĚNA
PERIVASKULÁRNÍ
TOTÁLNÍ

FIG. 29



FIG.30A



FIG 30B

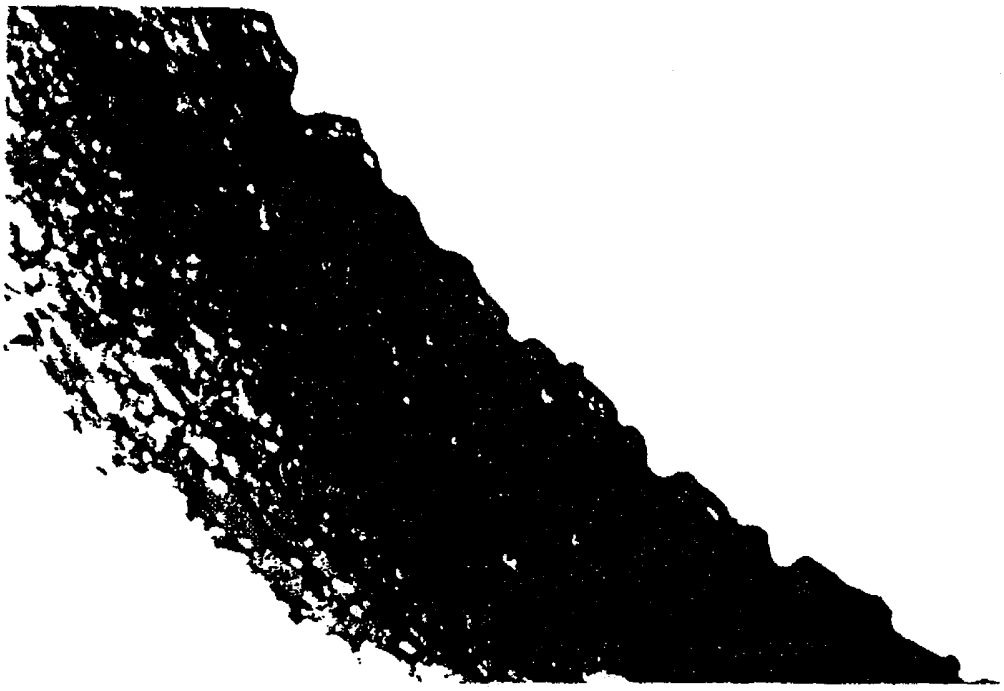


FIG.30C

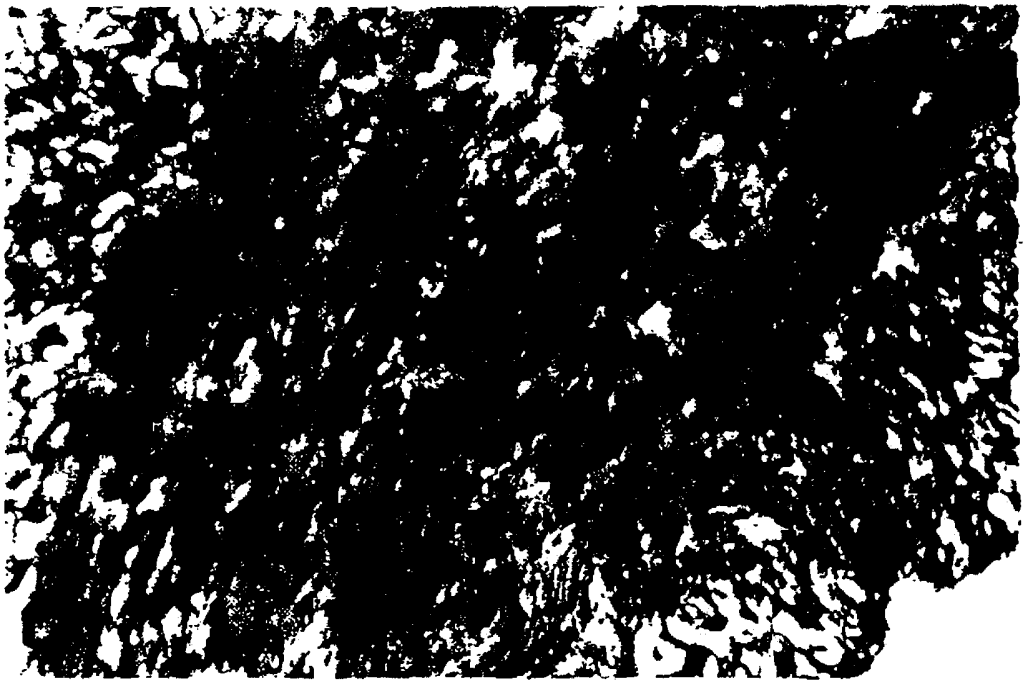


FIG 30D



FIG.31

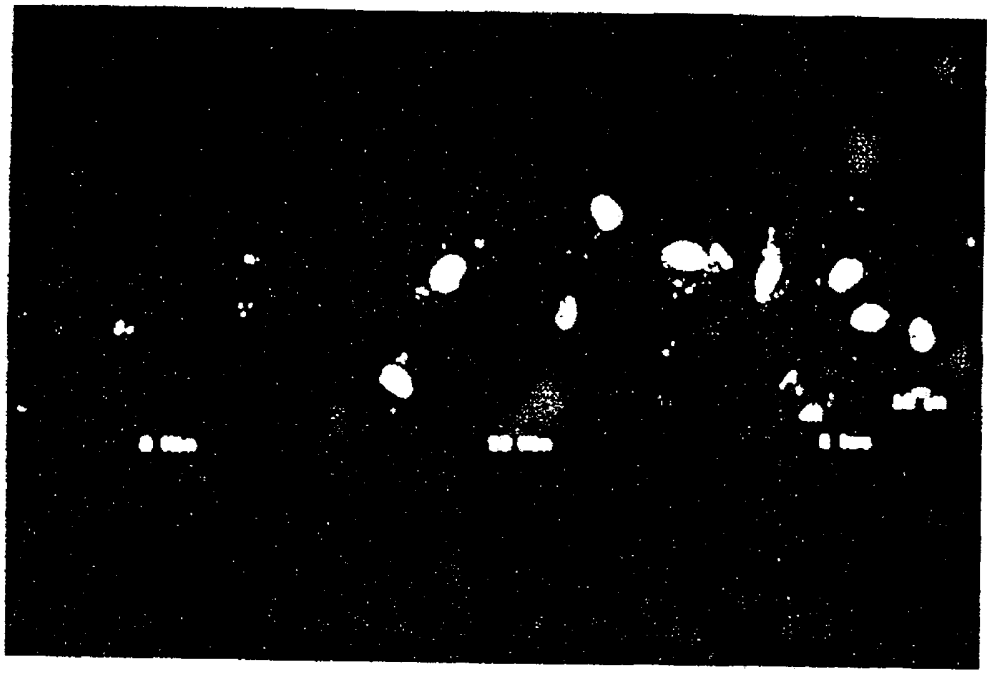


FIG.32

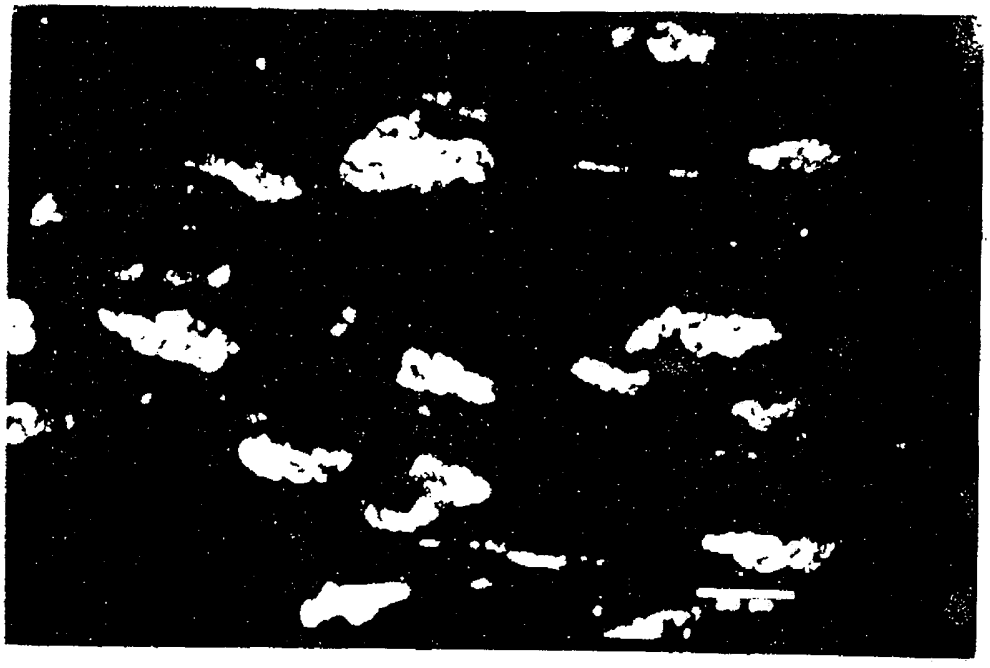


FIG.33

Konec dokumentu