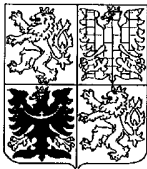


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 30.04.1998

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 05.05.1997

(31) Číslo prioritní přihlášky: 1997/97107404

(33) Země priority: EP

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 16.02.2000
(Věstník č. 2/2000)

(86) PCT číslo: PCT/EP98/02546

(87) PCT číslo zveřejnění: WO98/50540

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 3910

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/11

C 07 H 21/00

A 61 K 31/70

A 61 P 35/00

(71) Přihlašovatel:

HOECHST MARION ROUSSEL
DEUTSCHLAND GMBH, Frankfurt am Main, DE;

(72) Původce:

Uhlmann Eugen, Glashütten, DE;
Peyman Anuschirwan, Kelkheim, DE;
Will David William, Schwalbach, DE;
Chang Esther, Chevy Chase, MD, US;
Pirollo Kathleen, Arlington, VA, US;
Rait Antonina, Arlington, VA, US;

(74) Zástupce:

Kubát Jan Ing., Přístavní 24, Praha 7,
170 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Modifikované oligonukleotidy
komplementární k lidskému genu Ha-ras a
farmaceutické přípravky, které je obsahují**

(57) Anotace:

Specificky modifikované oligonukleotidy komplementární k úseku lidského genu Ha-ras a mRNA, a jejich použití ke specifické regulaci, modulaci nebo inhibici exprese genu Ha-ras, a dále jejich použití jako léku v léčení nemocí, které jsou důsledkem abnormální exprese genu Ha-ras, zejména v kombinaci s další chemoterapií nebo radioterapií. Modifikovaný oligodeoxynukleotid podle vynálezu má sekvenci 5'-TxAxTxTxCxGxTxCxAxT-3'-O-PO₂-O-R, kde x je o nebo s, a to s podmínkou, že x je 4 až 9krát s, o znamená fosfodiesterovou internukleosidovou vazbu a s znamená fosforothioátovou internukleosidovou vazbu, R je alkylová skupina s 8 až 21 atomy uhlíku, -/CH₂CH₂O/_n-/CH₂/_m-CH₃ nebo -CH₂-CH/OH/CH₂/O/CH₂/_q-CH₃, kde n je celé číslo od 1 do 6, m je celé číslo od 0 do 20 a q je celé číslo od 7 do 20, A je 2'-deoxyadenosin, G je 2'-deoxyguanosin, C je 2'-deoxycytidin a T je thymidin.

03.11.99

PV 3910-99

~~4420~~

177368/KB

1

Modifikované oligonukleotidy komplementární k lidskému genu Ha-ras a farmaceutické přípravky, které je obsahují

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká specificky modifikovaných oligonukleotidů komplementárních k úseku lidského genu Ha-ras a mRNA, a jejich použití ke specifické regulaci, modulaci nebo inhibici exprese genu Ha-ras, a dále jejich použití jako léku k léčení nemocí, které jsou důsledkem abnormální exprese genu Ha-ras.

Dosavadní stav techniky

V celé řadě systémů, jak *in vivo* tak *in vitro*, bylo ukázáno, že antisense oligonukleotidy (AO) jsou specifickými inhibitory genové exprese (Uhlmann a Peyman, Chem. Rev. 1990, 90, 543).

Jeden z hlavních problémů, se kterým se setkáváme při použití nemodifikovaných oligonukleotidů obsahujících pouze fosfodiesterové internukleosidové vazby (PO-oligonukleotidy), je rychlá degradace tohoto typu oligonukleotidů v buňkách a biologických tekutinách jako je např. sérum nebo cerebrospinální mok, díky celé řadě nukleolytických aktivit. Bylo prováděno mnoho různých modifikací oligonukleotidů, aby se zlepšila jejich nukleolytická stabilita (Uhlmann a Peyman, Chem. Rev. 1990, 90, 543). K těmto modifikacím patří modifikace nebo nahrazení fosfodiesterové internukleosidové vazby, cukru, nukleobáze nebo cukr-fosfátové kostry oligonukleotidu. Nejvíce zkoumanou modifikací je změna

internukleosidové vazby, zahrnující fosforothioátové (PS), metylfosfonátové (MeP) a fosforodithioátové (PSS) vazby. Je třeba zdůraznit, že modifikace oligonukleotidu nemění pouze jeho nukleázovou stabilitu, ale také další vlastnosti oligonukleotidu jako je např. buněčný příjem, aktivace Rnázy H, síla a specifická vazba k cílové nukleové kyselině apod. Nesmíme zapomenout také na to, že stabilita modifikovaného oligonukleotidu v séru, často užívaná k určení nukleázové stability oligonukleotidu, není jediným určujícím faktorem intracelulární aktivity (P.D. Cook, v Antisense Research and Applications, Crooke and Lebleu, Eds., CRC Press, Boca Raton, 1993, kapitola 9, s. 149 a následující).

Fosforothioáty (PS) modifikované oligonukleotidy jsou nejčastěji užívané modifikované oligonukleotidy. Pro umístění fosforothioátových (PS) vazeb v antisense oligonukleotidech byly vyvinuty následující strategie:

1) Nahrazení všech fosfodiesterových internukleosidových vazeb fosforothioátovými vazbami

Výsledné "vše-PS-oligonukleotidy" (zkráceně PS-oligonukleotidy) jsou mnohem stabilnější a odolnější proti nukleázám než PO-oligonukleotidy (Monia et al., J. Biol. Chem. 1996, 271, 14533). Např. degradace vše-PS-oligonukleotidů endonukleázami je zpomalena 2 až 45x ve srovnání s PO-oligonukleotidy (Stein et al., Nucleic Acids Res. 1988, 16, 3209). V oocytech nebo embryích *Xenopus* degradace mikroinjikovaných PO-oligonukleotidů probíhá s poločasem kolem 30 minut, zatímco vše-PS-oligonukleotidy mají za stejných podmínek poločas kolem 3 hodin (Woolf et al., Nucleic Acids Res. 1990, 18, 1763). Vše-PS-oligonukleotidy si uchovávají schopnost aktivovat Rnázu H. Hlavní nevýhodou vše-PS-oligonukleotidů je to, že jejich

schopnost vytvářet stabilní hybridy s cílovou nukleovou kyselinou je snížena a že často dochází ke vzniku nespecifických "non-antisense" účinků (Monia et al., J. Biol. Chem. 1996, 271, 14533).

2) Oligonukleotidy obsahující jak fosforothioátové tak i fosfodiesterové internukleosidové vazby

Ve snaze překonat nežádoucí "non-antisense" účinky pozorované u vše-PS-oligonukleotidů, byly syntetizovány oligonukleotidy obsahující jak fosforothioátové tak i fosfodiesterové internukleosidové vazby a byla testována jejich stabilita a biologická aktivita.

Ghosh et al. (Anticancer Drug Design 1992, 8, 15) popsali PS-PO-oligonukleotidy obsahující různé procento zastoupení PS vazeb. Jejich konstrukty byly např. podle vzorce $(PS-PO-PO-PO)_n$, $(PO-PO-OPS)_n$, $(PS-PO)_n$, $[(PO)_2-(PS)_2]_n$, $(PO-PS-PS)_n$. Ukázali, že obsah nejméně 50 % PS vazeb je nezbytný pro selektivní inhibici translace *in vitro* a aktivita dramaticky klesala, když obsah PS vazeb byl menší než 50 %. Nedávno bylo ukázáno, že oligonukleotidy obsahující 50 % PS-vazeb uspořádaných podle vzorce $(PS-PO)_n$ neprojevují žádnou biologickou aktivitu v testovacím systému, kde vše-PS-oligonukleotidy a PO-PS-oligonukleotidy s "koncovým uzavřením" (viz dále) se stejnou sekvencí byly vysoce aktivní.

3) Oligonukleotidy s "koncovým uzavřením", kde jeden, dva nebo tři internukleosidové můstky na 5'- a/nebo 3'-konci oligonukleotidu jsou modifikované fosforothioátem (tzv. "gap technika").

Tento způsob modifikace byl původně navržen pro ochranu oligonukleotidů před degradací exonukleázami. Zvláště

modifikace na 3'-konci oligonukleotidu jsou potřebné, neboť ty ochraňují před degradací 3'-exonukleázami, které jsou nejhojnějšími nukleázami v séru (Uhlmann a Peyman, Chem. Rev. 1990, 90, 543).

Zajímavé srovnání strategií lze najít v publikaci Hoke et al. (Nucleic Acids Res. 1991, 19, 5743). Autoři srovnávali účinek celé řady antisense PS-oligonukleotidů proti HSV-1 v buněčné kultuře. Jejich zjištění potvrdilo, že oligonukleotidy s 3'- nebo 3'+5'-koncovým uzavřením (první tři internukleosidové vazby byly v každém případě modifikovány), podobně jako vše-PS-oligonukleotidy, jsou dostatečně chráněny před degradací nukleázami ze séra. Naproti tomu oligonukleotidy modifikované uvnitř (tři PS můstky) a oligonukleotidy s uzavřením jen na 5'-konci (opět první tři internukleosidové vazby byly modifikovány) jsou rychle degradovány. Ale v rozporu s tím autoři zjistili, že uzavření ani na 5'- ani na 3'-konci či na obou současně nejsou dostatečné pro aktivitu uvnitř buňky, a tudíž dospěli k závěru, že je nutná uniformní modifikace (tj. vše-PS-oligonukleotidy) k dosažení dostatečné stability proti nukleázám v buňce.

V současnosti bylo zjištěno, že pyrimidinové nukleosidy jsou v oligonukleotidech místa s největší citlivostí k nukleázám (Peyman, A., Uhlmann, E. Biol. Chem, Hoppe-Seyler 1996, 1996, 377, 67, EP 0 653 439 A2). Bylo zjištěno, že kombinace ochrany pyrimidinových pozic v oligonukleotidu pomocí koncových uzavření a PS (tzv. metoda "minimální modifikace") jsou dostatečné k tomu, aby se oligonukleotidy staly vysoce rezistentní k degradaci nukleázami. Biologická účinnost oligonukleotidu (proti viru Herpes simplex) s tímto

typem PS modifikace byla srovnatelná s účinností vše-PS-oligonukleotidu.

Jeden z hlavních problémů, se kterým se setkáváme při použití AO, ať jsou stabilizovány proti degradaci nebo nikoliv, je to, že jsou špatně přijímány buňkou. Byly vyzkoušeny různé přístupy, aby se tento problém odstranil. Většina těchto metod zahrnuje připojení různých látek k oligonukleotidu. K takovým modifikacím patří např. připojení peptidu k oligonukleotidu (Lemaitre, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987, 84, 648) a nebo připojení lipofilního zbytku jako např. alkylového řetězce nebo cholesterolu k oligonukleotidu (Saison-Behmoaras, T. et al., EMBO J., 1991, 1111-1118, Will, D.W. a Brown, T, Tetrahedron lett., 1992, 33, 2729). Avšak bylo zjištěno, že v mnoha případech vnesení lipofilní skupiny způsobuje biologické účinky, které jsou nezávislé na sekvenci oligonukleotidu. Nespecifické účinky byly např. popsány pro konjugáty cholesterol-oligonukleotid (Henderson, G.B. a Stein, C.A., Nucleic. Acids Res. 1995, 23, 3726) a pro oligonukleotid navázaný na alkylový řetězec (Shea, R.G. et al., Nucleic. Acids Res. 1990, 18, 3777). Saison-Behmoaras, T. et al. (EMBO J., 1991, 1111-1118, W096/34008) publikovali, že 9mer vše-PO-oligonukleotidu derivatizovaný na 3'-konci dodekanolovou skupinou a na 5'-konci akridinovým zesíťovacím činidlem, přičemž tento oligonukleotid byl antisense oligonukleotidem k mutovanému genu Ha-ras, inhiboval proliferaci buněk T24 lidského karcinomu močového měchýře. Nebylo však provedeno žádné srovnání antiproliferační aktivity tohoto oligonukleotidu s odpovídajícím oligonukleotidem bez konjugace s dodekanolem. Buněčný příjem dodekanolového oligonukleotidu byl charakterizován jako 4x vyšší než příjem nemodifikovaného oligonukleotidu buňkami T24. Oligonukleotid

modifikovaný dodekanolem a akridinem neměl žádný vliv na proliferaci lidských buněk z prsu nesoucích nemutovaný gen Ha-ras. To může být dáno buďto sekvenční specifičností antisense oligonukleotidu nebo je to důsledek nedostatečného příjmu buňkou. Jelikož buněčný příjem oligonukleotidu modifikovaného dodekanolem a akridinem buňkami prsu nebyl stanoven, příčinou může být zcela, nebo alespoň částečně to, že oligonukleotid nebyl buňkami prsu přijímán a tudíž neměl příležitost projevit sekvenčně nespecifický účinek na buněčnou proliferaci.

Asi 20 % lidských nádorů má mutace v jednom z genů ras (Ha-ras, Ki-ras a N-ras), které vedou k nadměrné expresi proteinu p21, který hraje důležitou roli v transformovaném fenotypu (Bos, T.L., Mutation Res. 1988, 195, 255). Bylo publikováno, že inhibice různých genů ras v různých typech buněk buďto neměla žádný účinek nebo inhibovala buněčnou proliferaci, a to v závislosti na tom, který z genů ras kontroluje buněčnou proliferaci (Chen et al., J. Biol. Chem., 1996, 271, 28259-65). Bylo navrženo, že diferenciální modulace jednotlivých genů ras by mohla být způsobem, jak inhibovat růst nádorů a přitom minimalizovat účinek na růst normálních buněk. Jedním z návrhů úspěšné terapie nádorů indukovaných Ha-ras bylo regulovat, modulovat nebo inhibovat expresi genu Ha-ras. Bylo ukázáno, že antisense oligodeoxynukleotidy (oligonukleotidy) působí jako specifické inhibitory exprese ras mRNA v bezbuněčných systémech, v kulturách transformovaných buněk (Saison-Behmoaras, T. et al., EMBO J., 1991, 1111-1118, Monia et al., J. Biol. Chem. 1996, 271, 14533) a *in vivo* v ras-aktivovaných nádorech (Gray, G.D., Cancer Res. 1973, 53, 577).

Aby bylo možné modulovat expresi divoké formy nebo mutovaného genu ras, Brown et al. (Oncogene Res. 1989, 4,

243-252) navrhli použít anti-ras oligodeoxyribonukleosid-metylfosfonáty, které jsou komplementární k úseku s iniciačním kodonem mRNA Blab-ras P21 (myší verze lidského genu Ha-ras). Avšak je dobře známo, že metylyfosfonáty projevují několik hlavních nevýhod ve srovnání s fosforothioáty, kromě jiného mají špatný příjem buňkou.

Monia et al. (J. Biol. Chem. 267, 1 9954-1 9962, 1 992; WO 92/22651) popsali antisense vše-PS-oligonukleotidy a antisense oligonukleotidy obsahující různé procentuální zastoupení PS vazeb (WO 94/08003) namířených proti úseku iniciace translace nebo kodonu 12 lidského genu Ha-ras, což má ovšem již výše zmíněnou nevýhodu špatného buněčného příjmu.

Pirollo et al. (Biochem. Biophys. Research Comm. 230, 196-201, 1997) navrhli použít anti-ras vše-PS-oligonukleotidy, aby se zrušila/zvrátila odolnost nádorových buněk proti záření. Avšak tyto oligonukleotidy měly nevýhody (špatný buněčný příjem, nestabilita).

Proto je cílem předkládaného vynálezu poskytnout oligonukleotidy, modifikovaná tak, že se zlepší jejich stabilita a příjem buňkami které jsou komplementární k mRNA Ha-ras a které specificky regulují, modulují nebo inhibují expresi genu Ha-ras divokého typu nebo v mutované formě, a které se mohou užít k inhibici proliferace nádorových buněk, ke zrušení/zvrácení rezistence nádorových buněk k záření a k léčení nemocí, které jsou způsobeny abnormální expresí genu Ha-ras.

Předkládaný vynález řeší problém tím, že poskytuje modifikovaný oligodeoxynukleotid se sekvencí id. č. 1:

5'-TxAxTxTxCxGxTxCxAxT-3'-O-PO₂-O-R,

kde

x je o nebo s,

A je 2'-deoxyadenosin,

G je 2'-deoxyguanosin,

C je 2'-deoxycytidin a

T je thymidin.

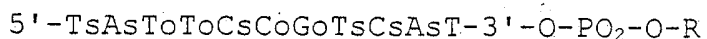
Modifikované oligodeoxynukleotidy podle předkládaného vynálezu jsou zvláště charakterizovány tím, že mají jednu z následujících sekvencí:

- (a) 5'-TsAsToToCsCoGoTsCsAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (b) 5'-TsAsToToCsCoGsToCsAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (c) 5'-TsAoTsToCsCoGoTsCsAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (d) 5'-TsAoTsTsCsCoGoTsCsAsT-3'-O-PO₂-O-R,
- (e) 5'-TsAoTsToCsCsGoTsCsAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (f) 5'-TsAoTsTsCsCsGoTsCsAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (g) 5'-TsAsToToCsCsGsToCsAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (h) 5'-TsAoTsTsCsCsGoTsCsAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (i) 5'-TsAsTsTsCsCsGoTsCsAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (j) 5'-TsAsToToCoCsGoTsCsAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (k) 5'-TsAsTsToCsCsGoTsCsAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (l) 5'-TsAsTsToCsCoGoTsCsAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (m) 5'-TsAsToTsCsCoGoTsCsAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (n) 5'-TsAsToToCsCsGoTsCoAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (o) 5'-TsAsToTsCsCoGoTsCoAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (p) 5'-TsAoTsTsCoCsGoTsCoAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (q) 5'-TsAsTsToCsCsGoToCsAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (r) 5'-TsAsTsToCoCsGoToCsAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (s) 5'-ToAoTsToCsCoGoToCsAsT-3'-O-PO₂-O-R nebo
- (t) 5'-TsAsTsTsCsCsGoTsCsAsT-3'-O-PO₂-O-R,

přičemž symboly o, s, R, m, n a q a A, G, C a T mají význam, jak bylo již uvedeno a bude vysvětleno dále.

Modifikované oligonukleotidy podle předkládaného vynálezu jsou komplementární k DNA nebo RNA odvozené z lidského genu Ha-ras. Modifikovaný oligonukleotid podle vynálezu je komplementární k úseku iniciace translace Ha-ras mRNA. Inhibuje tudíž jak expresi ras divokého typu tak i mutantu, což vede k inhibici proliferace nádorových buněk. Oligonukleotid je modifikován tak, aby se zlepšila jeho stabilita a vlastnosti buněčného příjmu. Oligonukleotid obsahuje čtyři až devět fosforothioátových vazeb v určitých pozicích, které jsou zvláště náchylné k napadení nukleázami. Oligonukleotid je modifikován na 3'-konci alkylovým řetězcem obsahujícím 8 až 21 atomů uhlíku nebo 1 až 21 atomů uhlíku, výhodně alkylovým řetězcem s 16 atomy uhlíku, kovalentně navázaným buďto prostřednictvím fosfodiesterového můstku nebo oligoetylénglykolfosfodiesterovou vazbou nebo glyceryléterfosfodiesterovou vazbou.

Zvláště výhodné provedení předkládaného vynálezu je modifikovaný oligonukleotid, který má sekvenci



obsahující šest fosforothioátových vazeb, přičemž proměnné o, s, R, m, n a q a A, G, C a T mají výše uvedený význam.

R je zvláště výhodně $\text{--CH}_2\text{CH(OH)CH}_2\text{O(CH}_2\text{)}_{15}\text{CH}_3$, $\text{--(CH}_2\text{)}_{15}\text{CH}_3$ nebo $\text{--(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{--(CH}_2\text{)}_{15}\text{CH}_3$, kde n je celé číslo od 1 do 6, výhodně n je 1, 2 nebo 3.

Předkládaný vynález se dále týká přípravy modifikovaných oligonukleotidů. Výhodně se oligonukleotid syntetizuje způsobem založeným na standardním chemickém procesu užívajícím fosforamidity, jak je ukázáno v příkladech 1 a 2.

Fosforothioátové vazby jsou pak vneseny např. sulfurizací pomocí Beaucageho činidla.

Překvapivě bylo zjištěno, že zvláště glycerolalkyléter, tj. skupina $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2)_q-\text{CH}_3$, kde q je celé číslo od 7 do 20, a konkrétně skupina $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$, navázaný fosfodiesterovou vazbou na 3'-konec oligonukleotidu poskytuje oligonukleotid, jehož optimální biologická aktivita již není závislá na smíchání s činidlem zesilujícím příjem. Bylo to poprvé, co byl nalezen oligonukleotid, který projevuje stejnou biologickou účinnost bez a nebo s přidáním činidla zesilujícího příjem.

Předkládaný vynález se dále týká přípravy modifikovaných oligonukleotidů. Výhodně se oligonukleotid syntetizuje způsobem založeným na standardním chemickém procesu užívajícím fosforamidit, jak je ukázáno v příkladech 1 a 2. Fosforothioátové vazby jsou pak vneseny např. sulfurizací pomocí Beaucageho činidla.

Modifikovaný oligonukleotid podle předkládaného vynálezu, jak byl popsán výše, je zvláště vhodný pro použití jako léčivo. Tudiž dalším předmětem předkládaného vynálezu je modifikovaný oligonukleotid podle vynálezu pro použití jako lék, konkrétně farmaceutický přípravek, který obsahuje účinné množství alespoň jednoho modifikovaného oligonukleotidu podle vynálezu. Modifikovaný oligonukleotid podle předkládaného vynálezu je zvláště výhodný pro přípravu léku k léčení nemocí, které jsou způsobeny nadměrnou expresí a/nebo mutací genu Ha-ras nebo které jsou způsobeny hyperproliferativní poruchou. K takovým nemocem patří zejména rakovina, restenóza nebo psoriáza.

K transformující aktivaci genu ras dochází asi u 10 až 20 % lidských nádorů tím, že se amplifikuje gen ras na úrovni DNA nebo se nadměrně exprimuje protein ras na úrovni mRNA.

Geny ras mohou být aktivovány bodovou mutací v kodonu 12, 13 nebo 61 (Barbacid, M., Ann. Rev. Biochem., 1987, 56, 779-827, Bos, Lowy, viz výše). Bodová mutace genu ras v kodonu 12 přeměňuje normálně regulovaný protein na protein, který je nepřetržitě aktivní. Má se za to, že ztráta regulace normální funkce proteinu ras je zodpovědná za transformaci normální buňky na buňku vykazující maligní růst.

Modifikovaný oligonukleotid podle předkládaného vynálezu je zvláště vhodný k regulaci, modulaci nebo inhibici exprese genu Ha-ras. Modifikovaný oligonukleotid podle vynálezu je komplementární k úseku iniciace translace Ha-ras mRNA. Inhibuje tudíž jak expresi ras divokého typu tak i mutantu, což vede k inhibici proliferace nádorových buněk. Oligonukleotid je modifikován tak, aby se zlepšila jeho stabilita a vlastnosti buněčného příjmu. Oligonukleotid obsahuje čtyři až devět fosforothioátových vazeb v určitých pozicích, které jsou zvláště náchylné k napadení nukleázami. Buněčný příjem oligonukleotidu je zlepšen alkylovou skupinou obsahující 8 až 21 atomů uhlíku nebo 1 až 21 atomů uhlíku, kovalentně navázaným buďto prostřednictvím fosfodiesterového můstku nebo oligoetylénglykolfosfodiesterovou vazbou nebo glyceryléterfosfodiesterovou vazbou. Díky zlepšené stabilitě a zlepšenému buněčnému příjmu optimální biologická aktivita oligonukleotidu podle vynálezu již není závislá na smíchání s činidlem zesilujícím příjem.

Proto je oligonukleotid podle vynálezu zvláště výhodný pro přípravu léku, který je určen k regulaci, modulaci nebo inhibici exprese genu Ha-ras, a to jak divokého typu Ha-ras tak i jeho mutant.

V případě, že nemoc, která je důsledkem mutace genu Ha-ras, je rakovina, oligonukleotid podle předkládaného vynálezu

je zvláště vhodný pro přípravu léku, který inhibuje proliferaci nádorových buněk.

Avšak na druhé straně oligodeoxynukleotid se výhodně užíje pro přípravu léku proti rakovině, který se užívá v kombinaci s chemtoterapií, a to zvláště v případech, kdy se rakovinné buňky staly rezistentní k chemoterapii, neboť oligodeoxynukleotid podle vynálezu zruší/zvrátí chemorezistenci rakovinných buněk. Proto je dalším předmětem vynálezu použití modifikovaných oligonukleotidů popsanych výše pro přípravu léku, který zruší chemorezistenci rakovinných buněk.

Zvláště díky tomuto konkrétnímu účinku je oligonukleotid podle předkládaného vynálezu vhodný pro přípravu farmaceutického přípravku, který obsahuje účinné množství alespoň jednoho dalšího chemoterapeuticky účinného činidla. K takovým chemoterapeuticky účinným činidlům patří např. cis-platina a její deriváty, výhodně cis-platina, "N-lost" deriváty (deriváty bischloretylamínu), výhodně cyklofosfamid, trofosfamid a ifosfamid, aziridinové deriváty, výhodně thiothepa, deriváty N-nitrózomočoviny, antagonisté kyseliny listové, výhodně methotrexat, analogy purinových nebo pyrimidinových bazí, výhodně 5-fluorouracil, cytostaticky účinná antibiotika, výhodně adriamycin, mitomycin a daunorubicin, antagonisté estrogenu, výhodně tamoxifen, a deriváty nukleosidů, výhodně MDL 101,731 ((E)-2'-deoxy-2'-(fluorometylen)cytidin, Cancer Res. 54, 1485-1490, 1994).

O genech ras je známo, že se účastní signální transdukce různých faktorů ovlivňujících růst, diferenciaci a onkogenezi. Nedávné výzkumy ukázaly, že onkogen raf-1, který leží "downstream" od ras v dráze signální transdukce, se podílí na expresi fenotypu reistence k záření. Lze ukázat, že antisense oligonukleotid podle předkládaného vynálezu

namířený proti iniciačnímu kodonu Ha-ras ruší rezistenci nádorových buněk.

Proto je dalším předmětem předkládaného vynálezu použití modifikovaného oligonukleotidu podle vynálezu pro přípravu farmaceutického přípravku k léčení rakoviny v kombinaci s radioterapií. Zejména modifikovaný oligondeoxyukleotid podle předkládaného vynálezu je vhodný pro přípravu léku, který ruší rezistenci rakovinných buněk k záření.

Modifikované oligonukleotidy podle předkládaného vynálezu se připravují použitím 1-alkanolu a oligoetylénglykomonoalkyléteru ve spojení s 3' derivatizací způsobem popsaným v dokumentech EP 0 552 767 A2 a EP 0 552 766 A2, nebo s využitím glyceryléterfosfodisterové vazby pomocí pevného nosiče, jak je popsáno v příkladu 1.

Tabulka 1: Přehled oligonukleotidů použitých v příkladech

Modifikace		Kód
částečně fosforothioát antisense	SEQ ID. Č. 2: 5'-TsAsToToCsCoGoTsCsAsT-3'	PPS
částečně fosforothioát sense	SEQ ID. Č. 3: 5'- AsTsGoAoCsGoGoAsAsTsA-3'	PPS-S
částečně fosforothioát sense+3'- C ₁₆ alkyl	SEQ ID. Č. 4: 5'-AsTsGoAoCsGoGoAsAsTsA-(PO ₂ - O-CH ₂ CH(OH)CH ₂ O(CH ₂) ₁₅ CH ₃)-3'	PPS-C16-S
částečně fosforothioát antisense+3'- C ₁₆ alkyl	SEQ ID. Č. 5: 5'-TsAsToToCsCoGoTsCsAsT-(PO ₂ - O-CH ₂ CH(OH)CH ₂ O(CH ₂) ₁₅ CH ₃)-3'	PPS-C16

Popis obrázků

Obr. 1. Protinádorový účinek PPS-C16 *in vivo*. (□) +R je kontrola s ozařováním ale bez oligonukleotidu, (■) -R je kontrola bez ozařování a bez oligonukleotidu, (○) AS+R je ošetření oligonukleotidem PPS-C16 (antisense) společně s ozařováním, (●) AS-R je ošetření oligonukleotidem PPS-C16 bez ozařování a (Δ) S+R je ošetření oligonukleotidem PPS-C16-S (sense) s ozařováním.

Obr. 2. Zrušení rezistence k záření v buněčné kultuře po ošetření oligonukleotidem PPS-C16. Hodnota D_{10} je dávka záření potřebná ke snížení přežívání buněk na 10 %.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Syntéza pevného nosiče pro syntézu oligonukleotidu funkcionalizovaného na 3'-konci glycerolhexadecyléterem navázaným fosfodiesterovou vazbou

DL- α -hexadecylglycerol (1 mmol) byl vysušen odpařením s 3x5 ml bezvodého pyridinu, pak rozpuštěn v bezvodém pyridinu (3 ml). Roztok byl ochlazen na 0 °C a přidal se 4,4'-dimethoxytritylchlorid (1,15 mmol). Reakce se míchala přes noc. Reakce byla zastavena přidáním vody (100 ml) a pak odpařena do sucha. Zbytek byl rozpuštěn v dichlormetanu (20 ml) a extrahován třikrát 10 ml 0,1M fosfátového pufru s pH 7.

Organická fáze byla vysušena nad síranem sodným, přefiltrována a odpařena. Zbytek byl sušen odpařením s 2 x 5 ml bezvodého pyridinu, pak rozpuštěn v bezvodém pyridinu (2 ml). pak se přidal 4,4-dimetylaminoypyridin (1,4 mmol) a anhydrid kyseliny jantarové (2,1 mmol). Reakce se míchala přes noc. Reakční roztok se odpařil do sucha a pak dvakrát koevaporoval s toluen:dichlometan/1:1. Zbytek se pak rozpustil dichlormetanem (20ml), extrahoval 10% kyselinou citronovou (11 ml) a třikrát promyl vodou (11 ml). K organické fázi se pak přidaly dvě kapky triethylaminu, organická fáze se vysušila nad síranem sodným, filtrovala a odpařila. Produkt se dále purifikoval chromatografií na silikagelu užitím gradientu 1-4% metanol, 1% triethylamin v dichlormetanu. Výsledný produkt byl získán jako čirý olej s výtěžkem 510 mg (62 %). Produkt (0,056 mmol), N-etylmorfolin (0,07 mmol) a TBTU (0,056 mmol) byly rozpuštěny v MF (2 ml) a přidal se k aminopropylovému sklu s kontrolovanými póry (CPG, 500 mg, 500 Å, Fluka). Směs se třepala 4 hodiny a CPG se pak oddělilo filtrováním a opláchlo metanolem a dichlormetanem. CPG se pak uzavíral 1 hodinu použitím anhydridu kyseliny ocotové/N-metylimidazolu v THF, přefiltroval a opláchlo metanolem, dichlormetanem, THF a dietaléterem. Po vysušení ve vakuu byla nasycení dimetoxytrytylovými skupinami určeno na 80mmol g⁻¹.

Příklad 2

Syntéza oligonukleotidů

Oligonukleotidy byly syntetizovány pomocí automatického syntetizátoru DNA typu 394 firmy Applied Biosystems (Applied

Biosystems, Inc., Foster City, USA) standardním postupem s fosforamidit. Po navázání byly vneseny fosforothioátové vazby sulfurizací použitím Beaucageho činidla (viz Iyer et al., 1990) a pak následovalo uzavření anhydridem kyseliny octové a N-metylimidazolem v tetrahydrofuranu. Po odštěpení z pevného nosiče a závěrečné deprotekcí (odstranění chránicí skupiny) provedené koncentrovaným amoniakem, oligonukleotidy byly purifikovány gelovou elektroforézou. Pro syntézu hexadecyl-modifikovaných oligonukleotidů byl použit pevný nosič podle předchozího příkladu 1. Všechny oligonukleotidy byly analyzovány hmotovou spektroskopií s negativním iontovým sprejem (Fisons Bio-Q), která ve všech případech potvrdila vypočtenou hmotnost.

Příklad 3

Inhibice translace Ha-ras mRNA *in vitro*

0,06 mg RNA bylo zahřáto společně s příslušným oligonukleotidem v 10mM Tris-HCl, pH 7,5, 5mM MgCl₂, 25mM KCl a 1mM DTT na 90 °C na 2 minuty a ponecháno pomalu chladnout na teplotu místnosti, což vedlo k nasednutí oligonukleotidu. Translační reakční směs (10 µl) obsahovala 0,06 mg RNA, různá množství oligonukleotidu (1, 5, 10 nebo 20 µM), 8 U RNasinu, inhibitoru ribonukleáz (40 U/µl) (Promega Biotec), 20µM směs aminokyselin bez methioninu (Promega Biotec), 0,8 mCi ³⁵S-methioninu (>1000mCi/µM, Amersham), 3 až 6 µl nukleázou ošetřeného lyzátu z králičích retikulocytů (Promega Biotec), a 1 µM dithiotreitol (DTT). Translace probíhala 1 hodinu ve 30 °C.

Po ukončení translace bylo přidáno ke každému vzorku 10 μ l pufru RIPA (PBS, 1% NP40, 0,5% deoxycholeát sodný, 0,1% SDS) s čerstvými inhibitory (0,1 mg/ μ l PMSF, 1 mM ortovanadát sodný, 30 μ g/ml aprotinin, Sigma, katalog. č. A6279) a směs se inkubovala na ledu 20 minut. Pak se přidalo 7 μ l 4xSDS vzorkového pufru (obsahujícího 1,25 M Tris-HCl, pH 6,8, 6% SDS, 40 % glycerol, 12 % 2-merkaptoetanol a 0,001% bromfenolové modři) a vzorky se vařily 5 minut. 10 μ l každého vzorku se pak analyzovalo elektroforézou v 5 až 12,5% polyakrylamidovém gelu (PAGE). Dokončený gel byl fixován, usušen a exponován na film Kodak XAR-5 s intenzifikačním stínítkem při -80 °C.

Výsledky: Antisense oligonukleotid podle vynálezu 5'-TsAsToToCsCoGoTsCsAsT-(PO₂-O-CH₂CH(OH)CH₂O(CH₂)₁₅CH₃)-3' (PPS-C16) inhiboval translaci proteinu ras p21 přibližně z 10, 40, 50 a 80 % v koncentracích 1, 5, 10 a 20 μ M. Kontrola, ve které se užil oligonukleotid 5'-AsTsGoAoCsGoGoAsAsTsA-(PO₂-O-CH₂CH(OH)CH₂O(CH₂)₁₅CH₃)-3' (PPS-C16-S), nejevila žádnou inhibici až do 20 μ M koncentrace, kdy se projevila 11% inhibice. To vede k závěru, že alkylový řetězec s 16 uhlíky nezpůsobil žádné sekvenčně-nespecifické účinky v tomto translačním systému.

Příklad 4

Inhibice exprese proteinu p21 ras v buněčné kultuře

Buněčné linie

Jako experimentální buněčné linie k hodnocení sekvenčně-specifické inhibice buněčného růstu a exprese proteinu p21 ras pomocí oligonukleotidů cílených na prvních jedenáct

oligonukleotidů úseku iniciačního kodonu Ha-ras mRNA byly použity myší fibroblasty NIH 3T3 (Chang et al., Biochemistry 30, 1991, 8283-86) transformované lidským genem Ha-ras (RS485).

Buňky RS485 byly pěstovány v médiu dle Dulbecca modifikovaném Eaglem (DMEM, Flow Labs) s přidavkem 10 % tepelně inaktivovaného (30 minut v 65 °C) fetálního telecího séra (FCS), antibiotik (50 U/μl penicilinu, streptomycinu a neomycinu) a 4mM L-glutaminu.

Ošetření buněk RS485 oligonukleotidem v kultuře

Buňky RS485 byly vysety na 6jamkové detičky (10⁵ buněk na jamku) a po 20 až 24 hodinách (40 až 60 % konfluence) byly ošetřeny oligonukleotidem. Z jamek bylo odstraněno médium, do každé jamky se přidal 1 ml čerstvého média s oligonukleotidy v různé koncentraci a destičky se pak inkubovaly ve 37 °C ve zvlhčovaném vzduchu obsahujícím 5% CO₂ po 24 až 48 hodin.

Lipofekce oligonukleotidu do buněk RS485 v kultuře

Buňky RS485 (40 až 60 % konfluence) byly transfekovány oligonukleotidem pomocí činidla Lipofectin™ podle návodu výrobce (Life Technologies). Stručně shrnuto, byly naředěny různé koncentrace oligonukleotidů ve 100 μl média bez séra. V samostatné zkumavce se přidal k médiu bez séra Lipofectin v koncentraci 7 μl/100μl. Po 30 minutách při teplotě místnosti se 100 μl lipofectinového roztoku smíchalo se 100 μl oligonukleotidového roztoku, inkubovalo dalších 15 minut při teplotě místnosti a pak se smíchalo s 800 μl média bez séra. Buňky byly dvakrát opláchnuty médiem bez séra a byly převrstveny roztokem (1 ml) obsahujícím komplex oligonukleotid-Lipofectin. Po šesti hodinách se přidal 1 ml čerstvého média obsahujícího 8 mM L-glutamin a 20% telecí

sérum a buňky se inkubovaly dalších 38 hodin. Ošetřené buňky pak byly opláchnuty PBS, sklizeny pomocí trypsinu a byly z nich extrahovány buněčné proteiny.

Výsledky

Účinek oligonukleotidů PPS a PPS-C16 na expresi p21 v buňkách RS485 byl srovnán pro ošetření s Lipofectinem a bez (jak bylo popsáno výše). Po ošetření byl extrahován celkový protein a byla stanovena hladina p21 užitím westernového přenosu.

Lipofectin sám neměl žádný účinek na expresi p21. Oba komplexy PPS a PPS-C16 s Lipofectinem v koncentraci 1 μM téměř úplně inhibovaly expresi p21 v buňkách RS485. Překvapivě oligonukleotid PPS-16C bez Lipofectinu inhiboval úplně inhiboval expresi p21 v koncentraci 5 μM . Oligonukleotid PPS ve stejné koncentraci bez modifikace C16 inhiboval expresi p21 pouze z 50 %.

Bylo provedeno také srovnání účinku komplexu PPS-Lipofectin a samotného PPS-C16 na expresi p21 v buňkách RS485. Hladina p21 byla snížena o 30 % a 43 % při koncentracích PPS-Lipofectin 0,25 μM a 0,5 μM . Za povšimnutí stojí, že oligonukleotid PPS-C16 zcela bez přídavku Lipofectinu projevil přibližně stejnou míru inhibice, konkrétně 33 % při koncentraci 0,25 μM a 40 % při 0,5 μM . Při 1 μM koncentraci byla pozorována úplná inhibice, což ukazuje na to, že přenos pomocí Lipofectinu nijak nezvyšuje inhibici zprostředkovanou PPS-C16.

Nakonec bylo provedeno i srovnání účinku PPS a PPS-C16 bez Lipofectinu na inhibici exprese p21 v buňkách RS485. PPS sám způsoboval inhibici asi 50 % při koncentraci 5 μM . Avšak oligonukleotid PPS-C16 o pouhé koncentraci 0,75 μM způsobil téměř 60 % inhibici exprese p21 v buňkách RS485.

Příklad 5

Inhibice buněčného růstu a syntézy proteinu p21 ras v buněčné kultuře

Inhibice buněčného růstu - studie na buněčné kultuře

Buňky ošetřené anisense oligonukleotidem nebo buňky transfekované komplexem oligonukleotid-Lipofectin byly sklizeny a lyzovány v pufru RIPA. Spektrofotometricky byla stanovena hladina celkového proteinu v každé jamce. Inhibice buněčného růstu byla stanovena jako poměr proteinu (mg) v buňkách ošetřených oligonukleotidem a proteinu v kontrolních buňkách. Kontrolní buňky byly buďto buňky ošetřené samotným Lipofectinem nebo neošetřené buňky.

Analýza proteinu ras westernovým přenosem

Celkový buněčný protein byl připraven lyzí buněk v pufru RIPA s čerstvě přidanými inhibitory (PMSF, aprotinin, ortovanadát sodný) a homogenizací užitím jehly č. 21, a sice podle protokolu firmy Santa Cruz Biotechnology, Inc. Extrakt byl pak vyčištěn centrifugací při 15000 g 20 minut ve 4 °C a byla stanovena koncentrace proteinu v supernatantu. 40 µg proteinu bylo frakcionováno podle velikosti na 5 až 12,5% polyakrylamidovém gelu a přeneseno elektroosmózou na nitrocelulózovou membránu. Membrána pak byla inkubována s primární protilátkou proti Ha-ras (C20) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a pak s kozím anti-králičím imunoglobulinem G konjugovaným s křenovou peroxidázou. Chemoluminiscenční systém ECL pro detekci westernových přenosů (Amersham, Arlington Heights, Ill.) byl užit k detekci sekundární sondy.

Výsledky

Byla provedena série pokusů k prozkoumání sekvenčně-specifických účinků oligonukleotidů PPS a PPS-C16 na buňky RS485. Ošetření buněk RS485 1 až 5 μ M PPS a PPS-C16 v přítomnosti Lipofectinu (viz výše) redukovalo po 2 dnech buněčný růst přibližně o 35 až 50 %. Lipofectin sám měl slabý toxický účinek (asi 15%) na buňky. Srovnání pomocí westernové analýzy exprese p21 uvnitř buněk RS485 s buňkami kultivovanými při inhibici PPS a OPPS-C26 ukázalo, že 1 μ M komplex oligonukleotid-Lipofectin úplně inhibuje expresi p21, ale inhibuje buněčný růst pouze z 35 %.

PPS-C16 bez Lipofectinu inhiboval buněčný růst z 11 % při 0,75 μ M koncentraci zatímco expresi p21 z 60 %. PPS inhiboval buněčný růst z 22 % při 5 μ M koncentraci, při téže koncentraci byla exprese p21 inhibována o 50 %. Lipofectin vykazoval toxický účinek, když byl použit s PPS v koncentraci vyšší než 1 μ M a oligonukleotid PPS-C16 bez Lipofectinu v koncentracích v rozmezí 0,25 až 1 μ M byl stejně účinný jako oligonukleotid PPS s Lipofectinem.

Příklad 6

Zrušení rezistence k záření - studie na zvířatech

Protinádorový účinek antisense oligonukleotidů *in vivo*

Buňky RS504 jsou buňky NIH 3T3 transformované onkogenem Ha-ras izolovaným z EJ/T24, lidského karcinomu močového měchýře. Nádor byl indukován injekcí 5×10^6 buněk RS504 subkutánně samici bezthymové myši NCr-nu. Po 48 hodinách, když byly nádory viditelné (6 MM3), byl částečně fosofrothioátový antisense (AS) nebo sense (S) oligonukleotid

modifikovaný C16 (PPS-C16) injikován přímo do nádoru a sice v množství 50 μ l 5 μ M roztoku (250 pmol) na každý nádor. Po 24 hodinách byly nádory ozářeny dávkou 2,0 Gy (viz obr. 1, tenké šipky). Ozařování se opakovalo každých 48 hodin, dokud nebyla dosažena kumulovaná dávka 20 Gy. Injekce oligonukleotidu se opakovala za 48 hodin (50 μ l), 192 hodin (50 μ l) a 240 hodin (100 μ l) po první injekci (viz obr. 1, silné šipky). Byl zaznamenáván objem nádoru v mm³. Kontroly představovaly nádory, které nebyly injikovány oligonukleotidy a nebyly ozařovány, nádory, které, nebyly injikovány, ale byly ozařovány, a nádory injikované antisense oligonukleotidem PPS-C16, ale bez ozařování.

Růst nádorů

Je známo, že geny ras se účastní signální transdukce různých růstových, diferenciačních a onkogenních faktorů. Z nedávných studií vyplývá, že onkogen raf-1, který leží "downstream" od ras v signální transdukční dráze, se podílí na expresi fenotypu odolného k záření. Bylo ukázáno, že antisense oligonukleotid podle předkládaného vynálezu ruší rezistenci k záření. Aby se určilo, zda existuje rozdíl v účincích záření na ras-indukované nádory po ošetření oligonukleotidem, RS-504 indukované nádory u nahých myši byly ošetřeny antisense a sense oligonukleotidy PPS-C16. Obr. 1 ukazuje, že antisense oligonukleotid PPS-C16 současně s ozařováním byl nejúčinnější způsob inhibice růstu nádorů během 17 dnů pozorování a léčení.

Příklad 7

Zrušení rezistence k záření v buněčné kultuře

Zrušení/zvrácení fenotypu rezistence k záření v buněčné kultuře ošetřením buněčné linie karcinomu močového měchýře (T24, získané z ATCC, Rockville, MD)) oligonukleotidem PPS-C16 se provádělo v médiu McCoye 5A s přidavkem 10 % fetálního telecího séra a 50 µg/ml penicilinu, streptomycinu a neomycinu a 2mM L-glutaminu. Pro ošetření oligonukleotidem byly buňky vysety na 6jamkové kultivační destičky po 1×10^5 buněk/jamka. Po 24 hodinách, když dosáhly přibližně 40 až 60 % konfluence, byly buňky transfekovány oligonukleotidy s pomocí Lipofectinu v postatě podle pokynů výrobce lipofectinového činidla, Life Technologies, Inc. Po 6 hodinách byl lipofectinový roztok odstraněn a monovrstva buněk byla opláchnuta médiem obsahujícím 8mM L-glutamin a 20% sérum. Buňky pak byly inkubovány dalších 16 až 18 hodin v 1 ml stejného média. Reakce buněk na ozařování byly vyhodnocovány pomocí testu přežívání kolonií. Exponenciálně rostoucí monovrstvy každé buněčné linie byly ošetřeny oligonukleotidem jak bylo popsáno výše, po 24 až 48 hodinách byly buňky sklizeny, resuspendovány v čerstvém médiu a ozařovány při teplotě místnosti odstupňovanými dávkami γ záření ^{137}Cs , a sice dávkovou 36 Gy/minuta v ozařovači Mark I (J.L. Shephard and Associates). Poté byly buňky naředěny a vysety v koncentraci 300 až 5000 buněk/jamka na 6jamkové kultivační destičky. Dva až tři dny po vysetí se k buňkám přidal 0,5 ml séra s 5 µg/ml hydrokortisonu. přibližně po 7 až 14 dnech byly buňky obarveny 1% krystalovou violetí a kolonie (obsahující 50 nebo více buněk normálního vzhledu) byly spočítány. Hodnota D_{10} (radiační dávka potřebná

k přežití 10 % buněk) pro buňky T24 ošetřené antisense oligonukleotidem (PPS-C16) poklesla z hodnoty 5,5 pro vysoce rezistentní buňky (neošetřené buňky nebo buňky ošetřené sense oligonukleotidem PPS-16-S) na hodnotu 4,5 Gy, což je hodnota, která charakterizuje citlivost k záření. Tyto výsledky jsou ukázány na obr. 2.

SEZNAM SEKVENCÍ

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 21 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (syntetická)

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: exon
- (B) POZICE: 1...21

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 1:

TxAxTxTxCxGxTxCxAxT-O-PO₂-O-R

21

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 21 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (syntetická)

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: exon
- (B) POZICE: 1...21

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 2:

TsAsToToCsCoGoTsCsAsT

21

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 21 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (syntetická)

(ix) ZNAKY:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: exon

(B) POZICE: 1...21

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 3:

AsTsGoAoCsGoGoAsAsTsA

21

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 21 párů bazí

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (syntetická)

(ix) ZNAKY:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: exon

(B) POZICE: 1...21

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 4:

AsTsGoAoCsGoGoAsAsTsA- (PO₂-O-CH₂CH(OH)CH₂O(CH₂)₁₅CH₃)

21

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 21 párů bazí

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (syntetická)

(ix) ZNAKY:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: exon

(B) POZICE: 1...21

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 5:

TsAsToToCsCoGoTsCsAsT- (PO₂-O-CH₂CH (OH) CH₂O (CH₂)₁₅CH₃)

21

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Modifikovaný oligodeoxynukleotid, který má sekvenci
id. č. 1: 5'-TxAxTxTxCxGxTxCxAxT-3'-O-PO₂-O-R,

kde

x je o nebo s, a to s podmínkou, že x je 4 až 9krát s, a
o znamená fosfodiesterovou internukleosidovou vazbu a
s znamená fosforothioátovou internukleosidovou vazbu,
R je alkylová skupina s 8 až 21 atomy uhlíku, -(CH₂CH₂O)_n-
(CH₂)_m-CH₃ nebo -CH₂-CH(OH)CH₂O(CH₂)_q-CH₃, kde n je celé číslo
od 1 do 6, m je celé číslo od 0 do 20 a q je celé číslo od 7
do 20,

A je 2'-deoxyadenosin,

G je 2'-deoxyguanosin,

C je 2'-deoxycytidin a

T je thymidin.

2. Modifikovaný oligodeoxynukleotid podle nároku 1 který má
sekvenci vybranou z následujících sekvencí

- (a) 5'-TsAsToToCsCoGoTsCsAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (b) 5'-TsAsToToCsCoGsToCsAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (c) 5'-TsAoTsToCsCoGoTsCsAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (d) 5'-TsAoTsTsCsCoGoTsCsAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (e) 5'-TsAoTsToCsCsGoTsCsAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (f) 5'-TsAoTsTsCsCsGoTsCsAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (g) 5'-TsAsToToCsCsGsToCsAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (h) 5'-TsAoTsTsCsCsGoTsCsAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (i) 5'-TsAsTsTsCsCsGoTsCsAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (j) 5'-TsAsToToCoCsGoTsCsAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (k) 5'-TsAsTsToCsCsGoTsCsAsT-3'-O-PO₂-O-R

- (l) 5'-TsAsTsToCsCoGoTsCsAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (m) 5'-TsAsToTsCsCoGoTsCsAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (n) 5'-TsAsToToCsCsGoTsCoAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (o) 5'-TsAsToTsCsCoGoTsCoAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (p) 5'-TsAoTsTsCoCsGoTsCoAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (q) 5'-TsAsTsToCsCsGoToCsAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (r) 5'-TsAsTsToCoCsGoToCsAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (s) 5'-ToAoTsToCsCoGoToCsAsT-3'-O-PO₂-O-R
- (t) 5'-TsAsTsTsCsCsGoTsCsAsT-3'-O-PO₂-O-R,

kde

o znamená fosfodiesterovou internukleosidovou vazbu a

s znamená fosforothioátovou internukleosidovou vazbu,

R je alkylová skupina s 8 až 21 atomy uhlíku, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$
 $(\text{CH}_2)_m-\text{CH}_3$ nebo $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_q-\text{CH}_3$, kde n je celé číslo
 od 1 do 6, m je celé číslo od 0 do 20 a q je celé číslo od 7
 do 20,

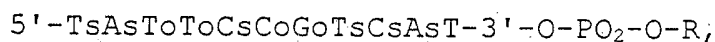
A je 2'-deoxyadenosin,

G je 2'-deoxyguanosin,

C je 2'-deoxycytidin a

T je thymidin.

3. Modifikovaný oligodeoxynukleotid podle nároku 1 nebo 2,
 který má sekvenci



kde

o znamená fosfodiesterovou internukleosidovou vazbu a

s znamená fosforothioátovou internukleosidovou vazbu,

R je alkylová skupina s 8 až 21 atomy uhlíku, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$
 $(\text{CH}_2)_m-\text{CH}_3$ nebo $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_q-\text{CH}_3$, kde n je celé číslo
 od 1 do 6, m je celé číslo od 0 do 20 a q je celé číslo od 7
 do 20,

A je 2'-deoxyadenosin,

G je 2'-deoxyguanosin,
C je 2'-deoxycytidin a
T je thymidin.

4. Modifikovaný oligodeoxynukleotid podle jednoho nebo několika nároků 1 až 3, kde

R je $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$.

5. Modifikovaný oligodeoxynukleotid podle jednoho nebo několika nároků 1 až 3, kde

R je $-(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$.

6. Modifikovaný oligodeoxynukleotid podle jednoho nebo několika nároků 1 až 3, kde

R je $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$, kde n je celé číslo od 1 do 6.

7. Modifikovaný oligodeoxynukleotid podle nároku 6, kde n se rovná 1.

8. Modifikovaný oligodeoxynukleotid podle nároku 6, kde n se rovná 2.

9. Modifikovaný oligodeoxynukleotid podle nároku 6, kde n se rovná 3.

10. Modifikovaný oligodeoxynukleotid podle jednoho nebo několika nároků 1 až 9 pro použití jako léčivo.

11. Farmaceutický přípravek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje účinné množství alespoň jednoho modifikovaného oligodeoxynukleotidu podle jednoho nebo několika nároků 1 až 9.

12. Použití modifikovaného oligodeoxynukleotidu podle jednoho nebo několika z nároků 1 až 9 pro přípravu léku k léčení nemoci, která je důsledkem nadměrné exprese a/nebo mutace genu Ha-ras.

13. Použití modifikovaného oligodeoxynukleotidu podle jednoho nebo několika z nároků 1 až 9 pro přípravu léku k léčení nemoci, která je důsledkem hyperproliferativní poruchy.

14. Použití podle nároku 13, kdy nemoc je rakovina.

15. Použití podle nároku 14 v kombinaci z radioterapií.

16. Použití podle nároku 14 v kombinaci s chemoterapií.

17. Použití podle nároku 13, kdy nemoc je restenóza.

18. Použití podle nároku 13, kdy nemoc je psoriáza.

19. Použití modifikovaného oligodeoxynukleotidu podle jednoho nebo několika z nároků 1 až 9 pro přípravu léčiva, které je určeno k regulaci, modulaci nebo inhibici exprese genu Ha-ras.

20. Použití modifikovaného oligodeoxynukleotidu podle jednoho nebo několika z nároků 1 až 9 pro přípravu léčiva, které inhibuje proliferaci nádorových buněk.

21. Použití modifikovaného oligodeoxynukleotidu podle jednoho nebo několika z nároků 1 až 9 pro přípravu léčiva, které ruší rezistenci nádorových buněk k záření.

22. Použití modifikovaného oligodeoxynukleotidu podle jednoho nebo několika z nároků 1 až 9 pro přípravu léčiva, které ruší rezistenci nádorových buněk k chemoterapii.

23. Farmaceutický přípravek podle nároku 11 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje účinné množství alespoň jednoho dalšího chemoterapeuticky účinného činidla.

24. Farmaceutický přípravek podle nároku 11 v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň jedno z dalších chemoterapeuticky účinných činidel je vybráno ze skupin obsahující cis-platinu a její deriváty.

25. Farmaceutický přípravek podle nároku 24 v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň jedno z dalších chemoterapeuticky účinných činidel je cis-platina.

26. Farmaceutický přípravek podle nároku 23 v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň jedno z dalších chemoterapeuticky účinných činidel je vybráno ze skupiny "N-lost" (bischloretylaminových) derivátů.

27. Farmaceutický přípravek podle nároku 26 v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň jedno z dalších chemoterapeuticky účinných činidel je cyklofosfamid.

28. Farmaceutický přípravek podle nároku 26 v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň jedno z dalších chemoterapeuticky účinných činidel je trofosfamid.

29. Farmaceutický přípravek podle nároku 26
v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň jedno z dalších
chemoterapeuticky účinných činidel je ifosfamid.

30. Farmaceutický přípravek podle nároku 23
v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň jedno z dalších
chemoterapeuticky účinných činidel je vybráno ze skupiny
aziridinových derivátů.

31. Farmaceutický přípravek podle nároku 30
v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň jedno z dalších
chemoterapeuticky účinných činidel je thiotepa.

32. Farmaceutický přípravek podle nároku 23
v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň jedno z dalších
chemoterapeuticky účinných činidel je vybráno ze skupiny
derivátů N-nitrózomočoviny.

33. Farmaceutický přípravek podle nároku 23
v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň jedno z dalších
chemoterapeuticky účinných činidel je vybráno ze skupiny
antagonistů kyseliny listové.

34. Farmaceutický přípravek podle nároku 33
v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň jedno z dalších
chemoterapeuticky účinných činidel je methotrexat.

35. Farmaceutický přípravek podle nároku 23
v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň jedno z dalších
chemoterapeuticky účinných činidel je vybráno ze skupiny
analogů purinových a pyrimidinových bazí.

36. Farmaceutický přípravek podle nároku 35
v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň jedno z dalších
chemoterapeuticky účinných činidel je 5-fluorouracil.

37. Farmaceutický přípravek podle nároku 23
v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň jedno z dalších
chemoterapeuticky účinných činidel je vybráno ze skupiny
cytostaticky účinných antibiotik.

38. Farmaceutický přípravek podle nároku 37
v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň jedno z dalších
chemoterapeuticky účinných činidel je adriamycin.

39. Farmaceutický přípravek podle nároku 37
v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň jedno z dalších
chemoterapeuticky účinných činidel je mitomycin.

40. Farmaceutický přípravek podle nároku 37
v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň jedno z dalších
chemoterapeuticky účinných činidel je daunorubicin.

41. Farmaceutický přípravek podle nároku 23
v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň jedno z dalších
chemoterapeuticky účinných činidel je vybráno ze skupiny
antagonistů estrogenu.

42. Farmaceutický přípravek podle nároku 41
v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň jedno z dalších
chemoterapeuticky účinných činidel je tamoxifen.

43. Farmaceutický přípravek podle nároku 23
v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň jedno z dalších

chemoterapeuticky účinných činidel je vybráno ze skupiny nukleosidových derivátů.

44. Farmaceutický přípravek podle nároku 43 v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň jedno z dalších chemoterapeuticky účinných činidel je MDL101,731.

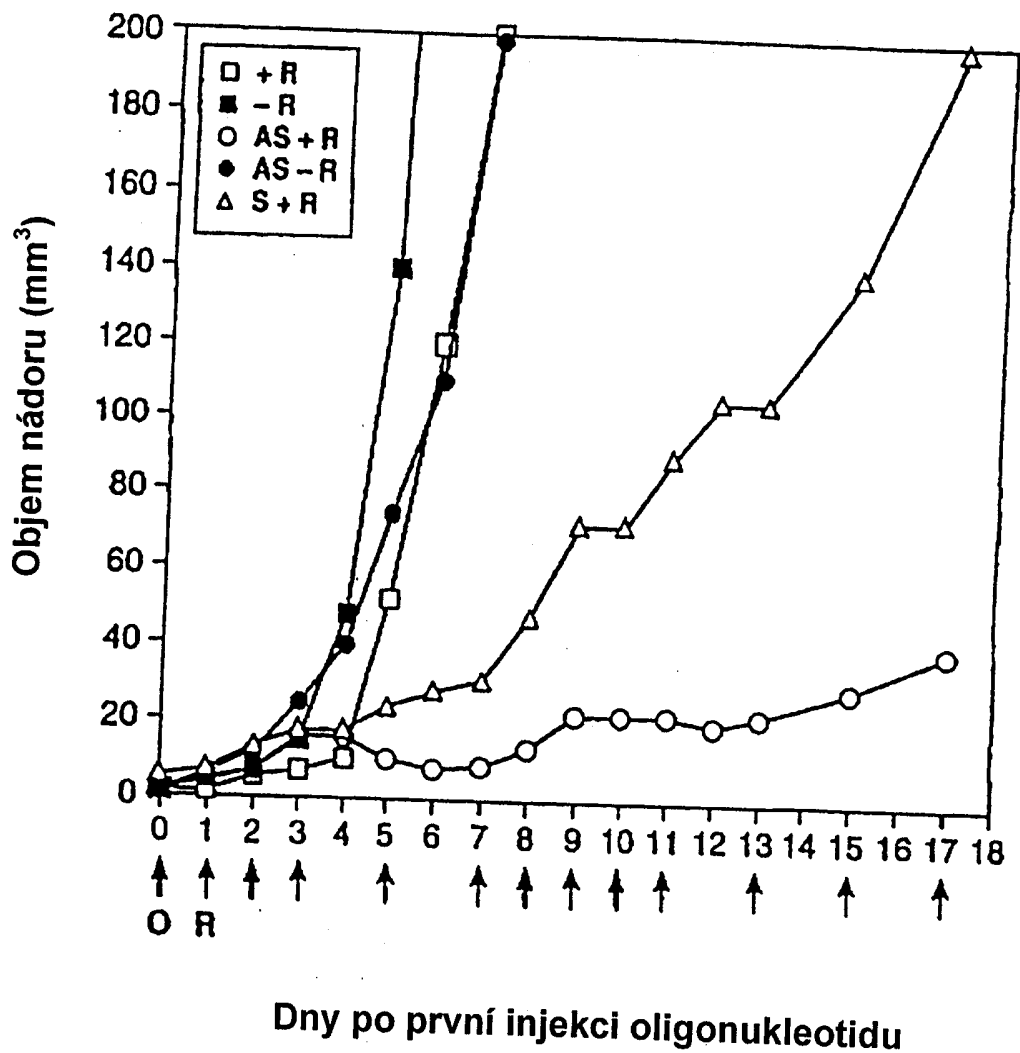
45. Způsob přípravy oligonukleotidu podle jednoho nebo několika nároků 1 až 9 v y z n a č u j í c í s e t í m, že fosforothioátové vazby byly vneseny sulfurizací použitím Beaucageho činidla.

03.11.99

PV 3910-99

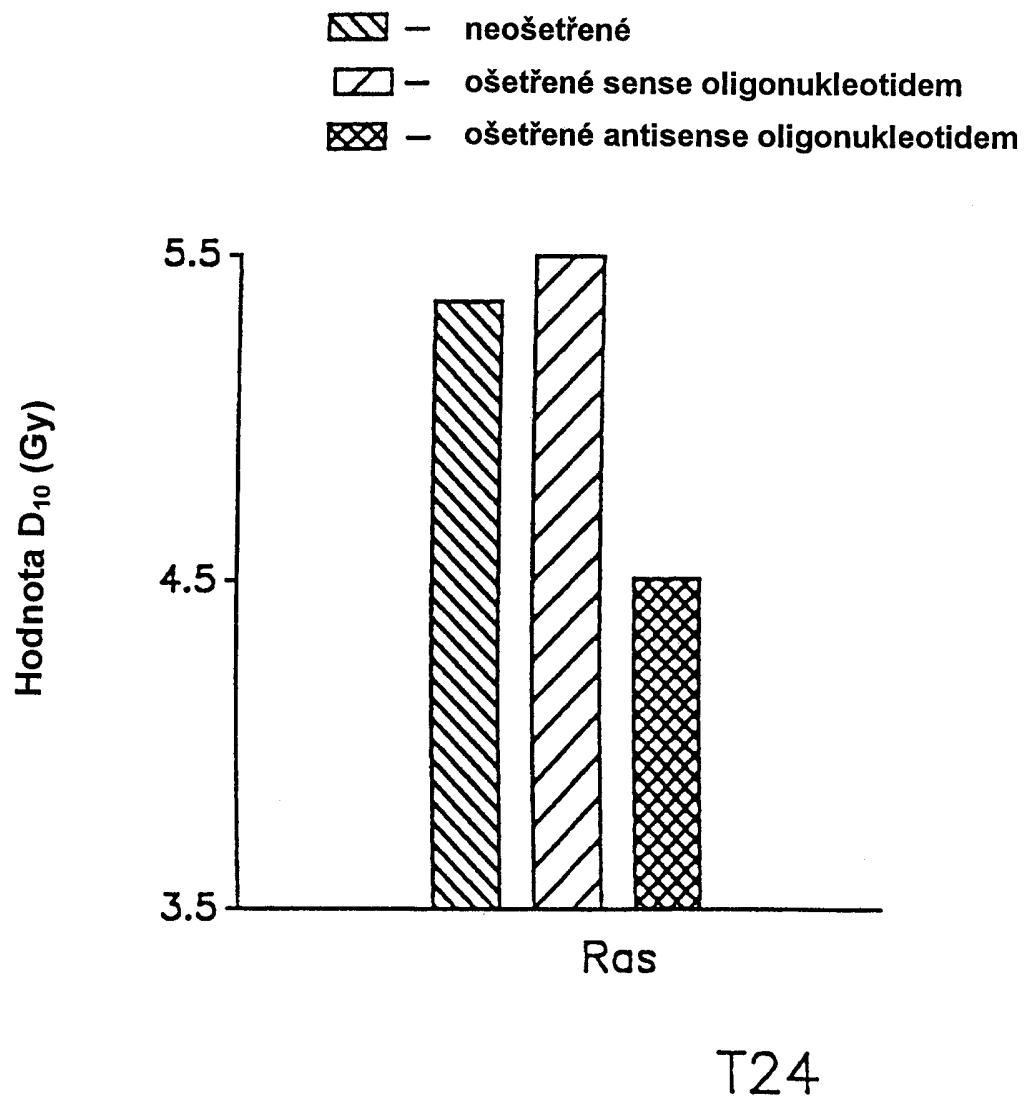
1/2

4/12/00



Obr. 1. Protinádorový účinek PPS-C16 *in vivo* (□) +R je kontrola s ozařováním ale bez oligonukleotidu, (■) -R je kontrola bez ozařování a bez oligonukleotidu, (○) AS+R je ošetření oligonukleotidem PPS-C16 (antisense) společně s ozařováním, (●) AS-R je ošetření oligonukleotidem PPS-C16 bez ozařování a (Δ) S+R je ošetření oligonukleotidem PPS-C16-S (sense) s ozařováním.

Obr. 1



Obr. 2. Zrušení rezistence k záření v buněčné kultuře po ošetření oligonukleotidem PPS-C16. Hodnota D_{10} je dávka záření potřebná ke snížení přežívání buněk na 10 %.

Obr. 2