

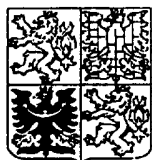
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

285 408

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2014-91**

(22) Přihlášeno: **01. 07. 91**

(30) Právo přednosti:
02. 07. 90 DE 90/4021019

(40) Zveřejněno: **15. 01. 92**
(Věstník č. 1/92)

(47) Uděleno: **07. 06. 99**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **11. 08. 99**
(Věstník č. 8/99)

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 H 21/00

C 07 H 21/04

A 61 K 31/70

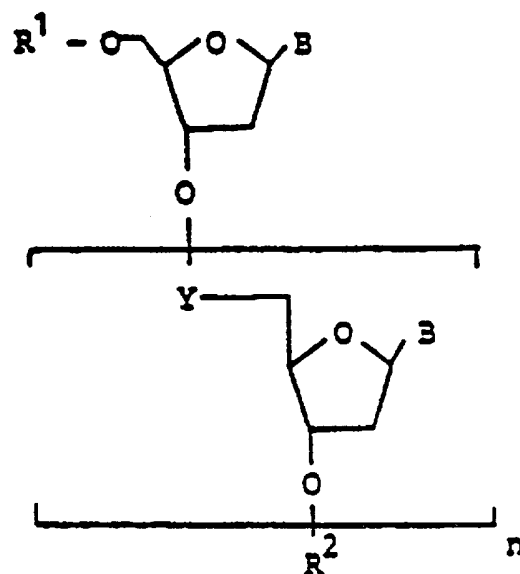
(73) Majitel patentu:
HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT,
Frankfurt am Main, DE;

(72) Původce vynálezu:
Rösch Hannelore, Ulm, DE;
Fröhlich Anja, Illerkirchberg, DE;
Ramalho-Ortigao Jose Flavio, Ulm, DE;
Montenarh Matthias prof. dr., Senden-Ay,
DE;
Seliger Hartmut prof. dr.,
Elchingen-Thalflingen, DE;

(74) Zástupce:
Všetečka Miloš JUDr. advokát, Žitná 25,
Praha 1, 11504;

(54) Název vynálezu:
**Analogy oligonukleotidů s terminálními
3'-3', popřípadě
5'-5'-internukleotidovými vazbami,
způsob jejich výroby a použití**

(57) Anotace:
Řešení se týká analogů oligonukleotidů s terminálními 3'-3', popřípadě 5'-5'- internukleotidovými vazbami obecného vzorce I, ve kterém mají substituenty významy uvedené v popise, způsobu jejich výroby, farmaceutických prostředků tyto látky obsahujících a jejich použití pro regulaci nebo potlačovací funkce nukleových kyselin.



CZ 285 408 B6

Analogy oligonukleotidů s terminálními 3'-3', popřípadě 5'-5'-internukleotidovými vazbami, způsob jejich výroby a použití

5 Oblast techniky

Vynález se týká biologie, konkrétně analogů oligonukleotidů s terminálními 3'-3', popřípadě 5'-5'-internukleotidovými vazbami.

10

Dosavadní stav techniky

Jako oligonukleotidy s řetězcem proti smyslu kódu se označují fragmenty nukleových kyselin, jejichž řetězec je komplementární ke kódovému řetězci ve smyslu kódu mRNA popřípadě ke kódujícímu řetězci DNA. Takové oligonukleotidy se ve vzrůstající míře používají k inhibici exprese genů in vitro nebo v systémech buněčných kultur. Použití těchto látek v medicínsko-
15 terapeutické oblasti, například jako protivirových farmak, je předmětem rozsáhlého výzkumu.

V biologii jsou již dlouho známé RNA řetězce proti smyslu kódu jako přírodní regulátory exprese genů v prokaryotických organismech (T. Mizuno, M. Y. Chou a M. Inouye, Proc. Nati. Acad. Sci. USA 81, 1966-1970 (1984) a také v eukaryotických organismech (S. M. Heywood, Nucleic Acids Res. 14, 6771-6772 (1986)). Působí inhibování translace hybridisací u příslušných mRNA. V mnoha experimentech bylo mezitím možno dokázat, že tyto RNA řetězce proti smyslu kódu v bakteriích (A. Hirashima, S. Sawaki, Y. Inokuchi a M. Inouye, PNAS USA 83, 7726-7730 (1986)) nebo eukaryotických buňkách (J. G. Izant a H. Weintraub, Cell 36, 1007-1015 (1984)) mohou zabráňovat expresi genů a ukazují jak protivirový (L. J. Chang a C. M. Stolfus, J. Virology 61, 921-924 (1987), tak také protinádorový účinek (J. T. Holt, T. V. Gopal, A. D. Moutton a A. W. Neinhuis, PNAS USA 83, 4784-4798 (1986)). Pro tyto výzkumy mají
25 syntetické oligonukleotidy proti biologickým RNA proti smyslu kódu výhodu větší stability a snazší přístupnosti. Snazší přístupnost je důsledkem zlepšené techniky syntézy v poslední době, která dnes relativně snadno zpřístupňuje kratší oligomery (o např. 12-30 bázích) (E. Sonveaux, Bioorganic Chemistry 14, 274-325 (1986); Oligodeoxynucleotides, Antisense Inhibitors of Gene Expression, J. S. Cohen, ed., Macmillan Press, 1989; str. 7ff).

35 Ukázalo se, že již takové krátké oligomery jsou účinné jako modulátory exprese. Mimo to mohou tyto oligonukleotidy také působit vazbou na DNA-dvojité řetězce za vzniku trojitého helixu. Aby se oligonukleotidy s řetězcem proti smyslu kódu a oligonukleotidy ve formě triplexu mohly nasadit v biologických systémech, musí ovšem být splněny následující předpoklady (Oligodeoxynucleotides, Antisense Inhibitors of Gene Expression, J. S. Cohen ed. Macmillan Press, 1989, str. 1ff):
40

1. musí jednak být dobře rozpustné ve vodě, jednak však snadno procházet lipofilní buněčnou membránou
- 45 2. musí být uvnitř buňky dostatečně stabilní proti odbourání, tj. stabilní proti nukleázám
3. musí s intrabuněčnými nukleovými kyselinami při fyziologických teplotách tvořit stabilní hybridy
- 50 4. hybridizace musí být selektivní; rozdíl disociační teploty k oligonukleotidu, který poskytuje defektní párování, musí být dostatečně velký, aby se poslední mohlo ještě specificky vymývat.

1978 mohli Zamecznik a Stephenson, PNAS USA 75, 280–284 a 285–288 (1978) poprvé ukázat, že nemodifikované oligonukleotidy mohou omezovat viry Rous Sarcom. Oligonukleotidy byly ovšem použity ve velmi vysokých koncentracích, k tomu byly experimenty většinou prováděny v předem vyhřátých médiích, aby se nukleázy inaktivovaly. Nutnost těchto opatření se vysvětluje rychlým enzymatickým odbouráním, kterému jsou cizí nukleové kyseliny v séru a buňkách vystaveny.

Proto se již dříve prováděly pokusy s cílem modifikovat oligonukleotidy strukturně tak, aby lépe splňovaly výše jmenované požadavky, zejména aby byly lépe chráněny proti nukleázovému odbourání. Tyto pokusy se především koncentrují na modifikaci fosfodiesterové internukleotidové vazby, poněvadž tato je posledním koncem působíště všech nukleáz. Strukturně modifikované internukleotidové vazby se zásadně mohou dělit v

a) nukleosidové vazby s fosforem jako centrálním atomem.

Tyto opět mohou být
 ionicky/chirální
 ionicky/achirální
 neutrálně/chirální

b) neutrálně/achirální bezfosforové nukleosidové vazby.

Ke strukturně modifikovaným, jako dříve k ionickým internukleosidovým vazbám náleží thiofosfátové a dithiofosfátové vazby. Thiofosfátem modifikované oligonukleotidy (Oligodeoxynucleotides, Antisense Inhibitors of Gene Expression, J. S. Cohen ed. Macmillan Press, 1989, str. 97ff) ukazují toho času nejlepší efekty inhibice exprese genů v buněčných kulturách, ovšem nezdá se, že je tato inhibice vázána na specifický řetězec, poněvadž i takové, thiofosfáty modifikované oligonukleotidy ukazují inhibiční efekty, které sestávají jen ze základu nukleové kyseliny, například thiofosfátové analogy oligocytidylylatu. Omezením pro nasazení thiofosfátem modifikovaných oligonukleotidů je dále jejich chiralita.

Poněvadž při přípravě oligonukleotidů o n bází 2^{n-1} se tvoří diastereomery, má pouze nejmenší podíl preparátu obsahujícího thiofosfátové vazby dobré hybridizační vlastnosti.

U oligonukleotidů s dithiofosfátovými internukleosidovými vazbami (A. Grandas, William S. Marshall, John Nielsen a Martin H. Caruthers, Tetrahedron Lett. 20, 543–546 (1989), G. M. Porritt, C. B. Reese, Tetrahedron Lett. 30, 4713–4716 (1989)), se problémem chiralitě obcházejí. Tyto sloučeniny však jsou dosud přístupné pouze pomocí komplikovaných a ztrátových, mnohastupňových syntéz. Proto se dosud nemohly provádět rozsáhlejší pokusy s ohledem na hybridizační chování, především v buněčných kulturách.

Další třídou chemicky modifikovaných oligonukleotidů jsou oligonukleotidy s neionickými, tj. neutrálními internukleosidovými vazbami. K tomuto druhu modifikovaných struktur náleží oligonukleotidy s fosfortriesterovými nebo methylfosfonátovými internukleosidovými vazbami (Oligodeoxynucleotides, Antisense Inhibitors of Gene Expression, J. S. Cohen, ed. Macmillian Press, str. 79ff).

Oběma třídám sloučenin je společné, že ionizovatelný fosfátový zbytek je nahrazen nenabitou skupinou. Zavedením takové vazby se stávají oligonukleotidové analogy resistantními vůči nukleázám, mají však nevýhodu špatné rozpustnosti ve vodném prostředí.

Oligonukleotidy s neutrálně/achirální internukleosidovou vazbou se dosud mohly získávat pouze tím, že atom fosforu internukleosidové vazby byl nahrazen jiným centrálním atomem. Vazbě esteru kyseliny fosforečné je podobná siloxanová vazba. Oligonukleotidy se siloxanovými

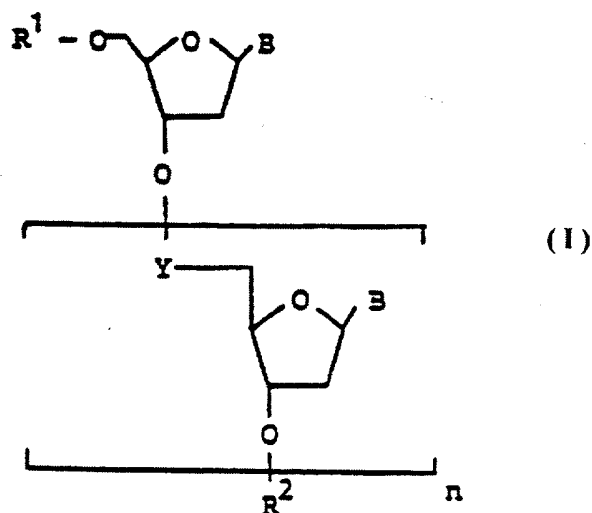
internukleosidovými vazbami (K. K. Ogilvie, J. F. Cormier, Tetrahedron Lett. 26, 4159 (1985), H. Seliger, G. Feger, Nucl. Nucl. 6 (182), 483–484 (1987) byly syntetizované a jsou stabilní vůči nukleázám.

- 5 Oligonukleotidy s uhličitanovými, acetalovými nebo karboxamidovými internukleosidovými vazbami jsou známe z M. Matteucci, Tetrahedron Lett. 31, 2385–2388 (1990), J. R. Tittensor, J. Chem. Soc. C. 1971, str. 2656 a J. Coull et al., Tetrahedron Lett. 28, 745 (1987).

- 10 Nukleázově resistentní analogy nukleotidů mohly také být vyráběné bez změny fosfodiesterové internukleotidové vazby tím, že byly nasazeny cukerné zbytky změněné konfigurace. To se provedlo syntézou oligonukleotidových analogů, u kterých jsou nukleobáze vázané α -glykosidicky (Oligodeoxynucleotides, Antisense Inhibitors of Gene Expression, J. S. Cohen, ed. Macmillan Press, 1989, str. 119ff). Tyto analogy oligonukleotidů však jsou preparativně těžko přístupné, poněvadž se musí stavět od cukrů a bází. K tomu vykazují, co se týká smyslu směru hybridizace, částečně nenormální chování.
- 15

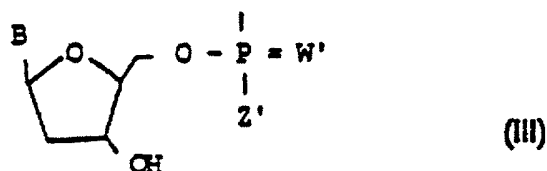
Podstata vynálezu

- 20 Předmětem předloženého vynálezu jsou analogy oligonukleotidů s terminálními 3'-3'-, popřípadě 5'-5'-internukleotidovými vazbami obecného vzorce I



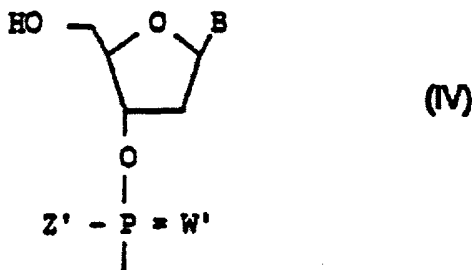
- 25 kde

R^1 značí vodík nebo zbytek vzorce III



- 30

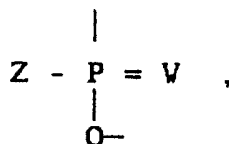
R^2 značí vodík nebo zbytek vzorce IV



přičemž však alespoň jeden ze zbytků R^1 nebo R^2 představuje zbytek vzorce III nebo IV,

5 B představuje bázi, vybranou ze skupiny zahrnující adenin, cytosin, guanin nebo nepřírodní báze purin, 2,6-diaminopurin, 7-deazaadenin, 7-deazaguanin, N^4 -ethanocytosin popřípadě jejich prekurzorové formy

10 Y značí zbytek z řady $O-Si(R)_2$, OCH_2 , $C(O)NR$ nebo $OCH_2-C(O)$, kde R představuje alkyl s 1 až 6 atomy uhlíku, fenylovou skupinu, fenylovou skupinu, substituovanou jednou až třikrát alkylovou skupinou s 1 až 6 uhlíkovými atomy, alkoxy skupinou s 1 až 6 uhlíkovými atomy a/nebo atomem halogenu, cykloalkylovou skupinu s 5 nebo 6 uhlíkovými atomy nebo skupinu



15

W a W' nezávisle na sobě značí kyslík nebo síru,

20 Z a Z' nezávisle na sobě značí O^- ; S^- ; alkoxy skupinu s 1 až 18 atomy uhlíku; alkyl s 1 až 18 atomy uhlíku; skupinu NHR^3 s R^3 znamenajícím alkyl s 1 až 18 atomy uhlíku, nebo alkoxy-alkyl s 1 až 4 atomy uhlíku v alkoxyzbytku a s 1 až 6 atomy uhlíku v alkylovém zbytku; skupinu NR^3R^4 , kde R^3 má shora uvedený význam a R^4 značí alkyl s 1 až 18 atomy uhlíku, nebo kde R^3 a R^4 spolu s nosným atomem dusíku značí 5 až 6 členný heterocyklický kruh, který může navíc obsahovat další heteroatom z řady O, S, N a

25 n znamená celé číslo 5 až 60,

30 jakož i jejich fyziologicky snášenlivé sole a tyto sloučeniny, substituované skupinami, podporujícími intrabuněčnou absorpci, skupinami, které slouží jako značící skupiny in vitro nebo in vivo, chemiluminiscenčními skupinami a/nebo skupinami, které při hybridizaci oligonukleotidu na biologické DNA nebo RNA napadají tyto DNA- nebo RNA-molekuly za vazby nebo štěpení.

35 Dále jsou výhodné oligonukleotidy vzorce I, ve kterém R^2 znamená zbytek vzorce IV a R^1 značí vodík; R^1 popřípadě R^2 znamená zbytek vzorců III popřípadě IV; nebo R^2 značí vodík a R^1 zbytek vzorce III, přičemž buď W, nebo Z v posledním případě neznamenají kyslík.

Zvlášť je dále třeba jmenovat oligonukleotidy vzorce I, kde W znamená kyslík nebo Z a W oba představují kyslík.

40 Zcela zvlášť výhodné jsou oligonukleotidy vzorce I, kde

R^2 představuje zbytek vzorce IV a R^1 značí vodík.

Dále je třeba jmenovat oligonukleotidy vzorců I, které jsou navíc substituované skupinami, které podporují intrabuněčné absorpce, které slouží jako značící skupiny in vitro nebo in vivo a/nebo skupiny, které při hybridizaci oligonukleotidu na biologické DNA nebo RNA tyto molekuly DNA nebo RNA napadají za vázání nebo štěpení.

5

Jako příklad skupin, které podporují intrabuněčnou absorpci, jsou lipofilní zbytky, jako alkylové zbytky například až s 18 atomy uhlíku nebo cholesteryl, nebo konjugáty, které využívají přírodní přenašecí systémy, jako například kyselinu žlučovou nebo peptidy pro příslušné receptory (např. endocytosu).

10

Příklady pro značící skupiny jsou fluoreskující skupiny (například akridinyl, dansyl, fluoresceinyl) nebo chemiluminescenční skupiny, jako například akridiniumesterové skupiny.

15

Oligonukleotidové konjugáty, které nukleové kyseliny vážou a/nebo štěpí, obsahují akridin (N. Thuong et al., *Tetrahedron Lett.* 29, str. 5905, (1988), psoraleny (U. Peiles et al., *Nucleic Acid Res.* sv. 17, str. 285, 1989) nebo chlorethylaminoarylové konjugáty (*Oligodeoxynucleotides, Antisense Inhibitors of Gene Expression*, J. S. Cohen, ed. Mc Millou Press, 1989, str. 173 ff).

20

Charakteristická strukturní modifikace oligonukleotidů podle vynálezu spočívá v tom, že internukleotidové vazby na obou koncích řetězce jsou změněné, tj. jsou místo biologických 3'-5'- vazeb vazby 3'-3'- popřípadě 5'-5'-. Překvapivě bylo nalezeno, že tato minimální strukturní modifikace stačí, aby se tyto sloučeniny stabilizovaly proti nukleázovému odbourání.

25

Jak se popisuje dále, způsobuje tato pouze malá strukturní modifikace hybridizační chování, které se téměř rovná chování biologických oligonukleotidů. Z toho také vyplývá obecná použitelnost těchto sloučenin jako inhibitorů exprese genů v buněčných kulturách.

30

Z literatury není dosud známa žádná zmínka o výrobě analogů oligonukleotidů s 3'-3' a 5'-5' internukleosidovými vazbami na obou koncích řetězce a jejich nasazení jako protisměrných oligonukleotidů. Analogy dinukleosidfosfátů, které obsahují 3'-3'- nebo 5'-5'-vazby, byly získány a zkoušeny již před mnoha léty jako hlavní produkty (A. Myles, W. Hutzenlaub, G. Reits a W. Pfeleiderer, *Chem. Ber.* 108, 2857-2871 (1975); H. Rokos, A. Myles, W. Hutzenlaub a W. Pfeleiderer, *Chem. Ber.* 2872-2877 (1975); J. Tomasz, *Nucl. Nucl.* 2(1), 51-61 (1983); M. Nemer, N. Theriault, A. Schifmann a K. K. Ogilvie, VIth International Round Table, *Nucleosides, Nucleotides and their biological Applications*, La Grande Motte, ed. J. L. Imbach, 94-96 (1984)), popřípadě jako vedlejší produkty (R. Letsinger, K. K. Ogilvie, *J. Amer. Soc.* 89, 4801-4802 (1967)). Tyto dimery však na základě příliš nízké teploty tání zásadně nejsou způsobitelné ke stabilní hybridizaci buněčnými nukleovými kyselinami. Oligonukleotidy, které mají 5'-5'-vazbu pouze na jednom konci, byly připraveny, aby se zavedlo přichytné místo pro značící skupiny při genetických sondách (S. Agrawal, C. Christodoulou, M. J. Gait, *Nucleic Acids Res.* 14, 6227-6245 (1986)). Nebyly však dosud zkoušené na své hybridizační chování. Pro biofyzikální zkoušky se připravily samokomplementární oligonukleotidy, které uprostřed molekuly mají jednotlivou 3'-3'- popřípadě 5'-5'-vazbu (J. H. van de Sande, N. B. Ramsin, M. W. German, W. Elhorst, B. W. Kalisch, E. V. Kitzing, R. T. Pon, R.c. Clegg, T. M. Jovin, *Science* 241, 551-557 (1988)).

45

Příprava oligonukleotidů s terminálně invertovanou 3'-3'- a 5'-5'- vazbou se provádí stejným způsobem jako syntéza biologických oligonukleotidů v roztoku nebo v pevné fázi, popřípadě za pomoci automatického syntézního přístroje.

50

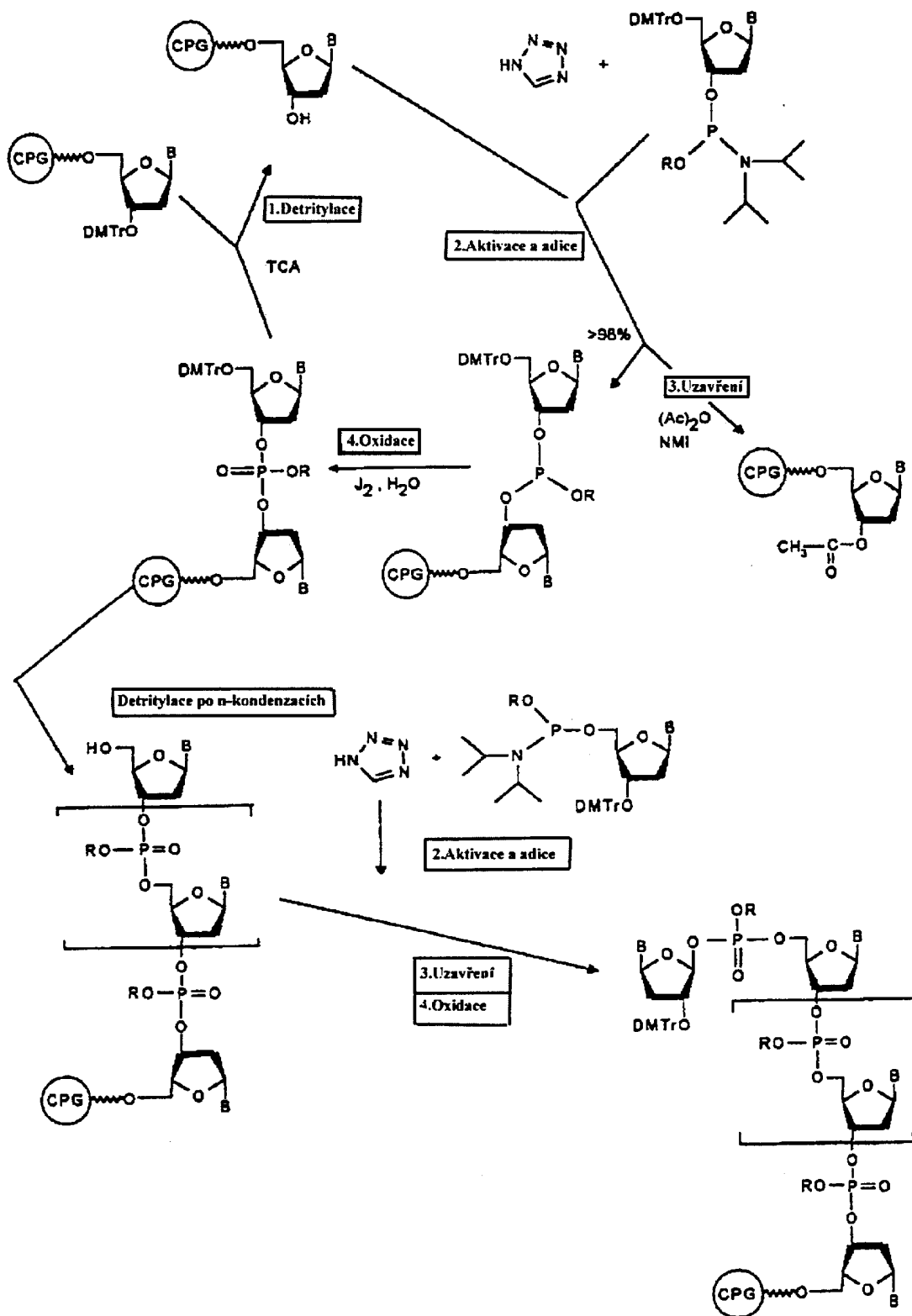
Předmětem vynálezu je tedy dále způsob výroby oligonukleotidů vzorce I, který spočívá v tom, že se

a) nukleotidová jednotka s 3'– popřípadě 5'–terminálními skupinami fosforu(III) nebo fosforu(V) nebo její aktivovaný derivát nechá reagovat s další nukleotidovou jednotkou s 3'– popřípadě 5'–terminálně volnou hydroxyskupinou,

5 nebo

b) oligonukleotid připraví z fragmentů stejným způsobem, v oligonukleotidech získaných podle (a) nebo (b) se popřípadě jedna nebo několik ochranných skupin zavedených dočasně k ochraně ostatních funkcí odštěpí a takto získané oligonukleotidy vzorce I se popřípadě převedou ve svou fyziologicky snášenlivou sůl.

Jako výchozí komponenta k výrobě oligonukleotidů s terminálně invertovanou 3'–3'–vazbou se pro syntézu v pevné fázi nasadí nosná pryskyřice, na které je přes 5'–OH skupinu vázán první nukleosidový monomer. K výrobě této komponenty se použije nosná pryskyřice vyrobená metodami známými z literatury (T. Atkinson, M. Smith v *Oligonucleotide Syntézis*, M. J. Geit (ed), 35 – 49 (1984)), zejména silikagel nebo regulované porovité sklo, které je funkcionalisováno aminoskupinami. Nechá se reagovat s nukleosidovým derivátem chráněným na nukleobázi a na 3'–OH skupině, který byl napřed přeměněn v 5'–p–nitro–fenylsukcinát. Jako bazické ochranné skupiny se používají zejména acylové skupiny, například benzoyl, isobutyryl nebo fenoxycetyl. Poloha 3' se výhodně chrání dimethoxytritylovou ochrannou skupinou, která se může zavádět podle M. D. Matteucci, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Letters* 21 (1980), str. 3243–3246. Další skladba oligonukleotidového řetězce až k předposlednímu řetězcovému členu se provádí metodami známými z literatury, výhodně za použití na 5'–OH skupině dimethoxytritylovými skupinami chráněných esteramidů kyseliny nukleosid–3–fosforité nebo nukleosid–3'–H–fosfonátů. Jako poslední člen řetězce se opět nasadí na 3'–OH skupině, výhodně dimethoxytritylem chráněný esteramid kyseliny nukleosid–5'–fosforité, popřípadě nukleosid–H–fosfonát. Příprava takového oligonukleotidového řetězce s terminálně převrácenými internukleotidovými vazbami je dále znázorněna schematicky (fosforamiditcykl k přípravě oligonukleotidů s 3'–3'– a 5'–5'– vazbami na koncích). Příprava oligonukleotidů s 3'–3'– nebo 5'–5'– vazbami se provádí odpovídajícím způsobem.



5 Strukturní a řetězcová analýza se provádí tím způsobem, že se oligonukleotid s 3'-3'- a 5'-5'-konci nejdříve terminálně označuje. To se provede radioaktivním značkováním, výhodně pomocí 5'- γ - ^{32}P -ATP/polynukleotidkinasy. Toto radioaktivní značkování se provede na volné 5'-OH-skupině, tj. proti oligonukleotidu s pouze biologickou 3'-5'-vazbou na opačném konci nukleotidového řetězce. Řetězcová analýza se pak provede postupem známým z literatury,

výhodně pro báze specifickým, statistickým štěpením, jak popsáno (A. M. Maxam and W. Gilbert, *Methods in Enzymology* 65, 499–560 (1980)).

5 Na základě radioaktivního značkování na „opačném“ konci molekuly se nyní provede také odečtení řetězce, srovnáním s oligonukleotidem s biologickou 3'–5'– vazbou v opačném směru. Proveditelný popis testu je uveden v příkladu 6.

10 Oligonukleotidy vzorců I se používají pro hybridizačně–chemické, na adici nukleových kyselin s dvojitým nebo jedním řetězcem spočívající postupy regulace nebo potlačování biologické funkce nukleových kyselin, k selektivnímu potlačování exprese virálních funkcí genomu a k profylaxi a terapii virových funkcí, k potlačování nádorových funkcí a k terapii rakovinných onemocnění.

15 Jako míra stability in vivo se může pokládat chování v krevním séru rozpuštěného, podle vynálezu stavěného oligonukleotidu vzorce I. Obecný test je popsán v příkladu 7; odpovídající test in vitro s roztokem fosfodiesterázy hadího jedu v příkladu 8. Oligonukleotidy podle vynálezu se v protikladu k 3'–5'–oligonukleotidům odbourávají mnohem pomaleji.

20 Příklad 11 demonstruje sérovou stabilitu oligonukleotidů s terminálně invertovanou 3'–3'– vazbou.

25 Hybridizační chování vyplývá z modelových pokusů, jak popsáno v příkladu 9, ve kterých řada SV–40–specifických řetězců, které podle vynálezu byly připraveny vždy s 3'–3'– a 5'–5'– koncem, v hybridizaci s odpovídajícím řetězcem proti smyslu kódu SV40–DNA ukazují teplotu tání, která leží nepodstatně níže než teplota tání, která se měří při hybridizaci s odpovídajícím řetězcem, který nebyl stavěn podle vynálezu, tj. bez 3'–3'– a 5'–5'– konců.

30 Účinnost oligonukleotidů opatřených podle vynálezu terminálními 3'–3'– popřípadě 5'–5'– vazbami, jako inhibitorů exprese genů vyplývá z potlačování růstu viru SV40 (příklad 10) jakož i z inhibice in vitro exprese nádorového produktu p53 (příklad 12).

Příklady provedení vynálezu

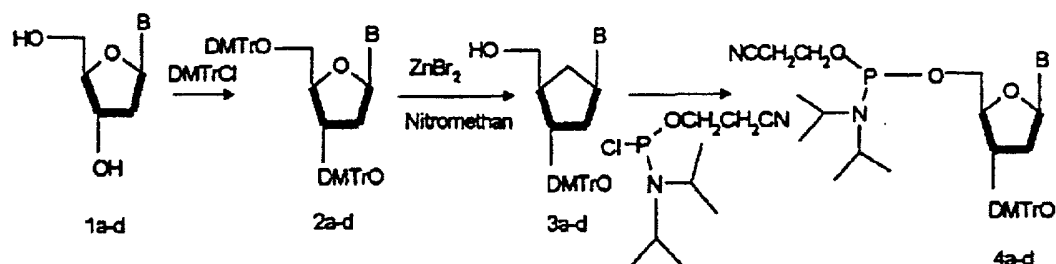
35

Příklad 1

40 Syntéza esteramidu kyseliny 3'–O–DMTr–desoxyribonukleosid–5'–(N,N–bis–diisopropyl–amino–β–kyanethoxy)–fosforité

40

Reakční schéma vycházející z bázemi chráněných nukleosidů je znázorněno následně:



a: B = Thymin
 b: B = N⁶-Benzoyladenin
 c: B = N⁴-Benzoylcytosin
 d: B = N²-Isobutyrylguanin

DMTr = 4,4'-Dimethoxytrityl

A) Příprava 3,5-O-bis-DMTr-desoxyribonukleosidu 2

5	Násada	6 mmol	dT, dA ^{bz} , dC ^{bz} nebo dG ^{lbu}
		14,4 mmol	DMTr-Cl
		14,9 mmol	TEA abs.

10 Desoxyribonukleosid 1 se rozpustí v 50 ml absolutního pyridinu a při 0 °C se přidá triethylamin a dimethoxytritylchlorid. Potom se 24 h míchá při teplotě místnosti, přičemž se reakce sleduje chromatografií na tenké vrstvě (rozpuštědlo: CH₂Cl₂/MeOH 9:1). Reakce se ukončí přidáním methanolu, rozpuštědlo se odtáhne a zbytek se vyjme do dichlormethanu. Organická fáze se několikrát promyje 1 M roztokem (NH₄)HCO₃ a vodou, suší se Na₂SO₄ a odstředí se.

15 3',5'-ditritylovaný produkt 2 se může čistit od přebytečného tritanolu popřípadě 5'-DMTr-dN sloupcovou chromatografií (sloupcový materiál: silikagel 60H, eluční prostředek: CH₂Cl₂ se stoupajícím obsahem methanolu, přičemž se při 1–1,5% MeOH elují ditritylované desoxy-nukleosidy).

20 Výtěžek: 73–85 % teorie.

B) Specifické odštěpení 5'-dimethoxytritylové skupiny

Literatura: M. D. Mateucci a M. H. Caruthers, Tetrahedron Lett. 21, 3243–3246 (1980)

25

Násada:	3 mmol	3',5'-O-bis-DMTr-dN 2
	15 mmol	ZnBr ₂
	200 ml	absolutního nitromethanu

30 Roztok 3',5'-O-bis-DMTr-dN 2 ve 100 ml nitromethanu se při 0 °C dá k suspensi bromidu zinečnatého v dalších 100 ml nitromethanu. V případě chráněného desoxyadenosinu byla reakce dále vedena za chlazení, aby se zamezilo depurinizaci. Přesto je u tohoto nukleosidu odštěpení úplné již po 60 min, jak je možno zjistit chromatografií na tenké vrstvě. U thymidinu a desoxyguanosinu je rovněž reakce ukončena při teplotě místnosti po 60 min, zatím co 5'-detritylace bis-DMTr-desoxycytidinu probíhá jen neúplně. Zde se reakce přerušila po 3
 35 hodinách, aby se zabránilo odštěpení také 3'-dimethoxy-tritylové skupiny.

Přerušeni reakce se provede přidáním 200 ml 1 M roztoku NH_4Ac ; produkt 3 se extrahuje 200 ml CH_2Cl_2 , organická fáze se ještě promyje nasyceným roztokem NaCl a vodou, suší se Na_2SO_4 a rozpouštědlo se oddestiluje ve vakuu.

- 5 Hlavní množství tritanolu se může oddělit vysrážením surového produktu v cca 500 ml *n*-hexanu při -15°C . Čištění se provede chromatograficky přes sloupec silikagelu 60H dichlormethanem se stoupajícím obsahem methanolu jako elučním prostředkem.

10 Hodnoty R_f 3'-DMTr-desoxyribonukleosidů se liší od odpovídajících 5'-tritylovaných monomerů následovně (rozpuštědlo: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeH}$ 24:1):

	3'-DMTr-dN	5'-DMTr-dN
dT	0,28	0,21
Da ^{bz}	0,55	0,29
15 dC ^{bz}	0,53	0,31
dG ^{ibu}	0,32	0,14

Výtěžky: 48–65 % teorie.

- 20 C) Příprava esteramidu kyseliny 3'-O-DMTr-desoxyribonukleosid-5'-O-(*N,N*-diisopropylamino- β -kyanoethoxy-)fosforité 4,

Literatura: H. Köster, *Nucleic Acids Res.* 12, 4539–4557 (1984)

- 25 Násada: 1 mmol 3'-O-DMTr-desoxyribonukleosidu 3
 1,5 mmol chloro-*N,N*-diisopropylamino- β -kyanoethoxyfosfinu
 4 mmol diisopropylaminu

30 Fosfitylační reakce byly provedeny analogicky metodě popsané Kösterem et al. k výrobě esteramidu kyseliny 5'-O-DMTr-desoxyribonukleosid-3'-O-fosforité. K rozpuštění chráněných nukleosidů v absolutním CH_2Cl_2 byl pod argonem přidán diisopropylamin, potom fosforylační prostředek. Po 30 min byla reakce ukončena přidáním 30 ml ethylacetátu, roztok 3x extrahován nasyceným roztokem NaCl , organická fáze sušena Na_2SO_4 a rozpouštědlo oddestilováno ve vakuu. Surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií (sloupcový materiál: silikagel 60H, eluační prostředek: petrolether/dichlormethan/triethylamin 45:45:10)

35

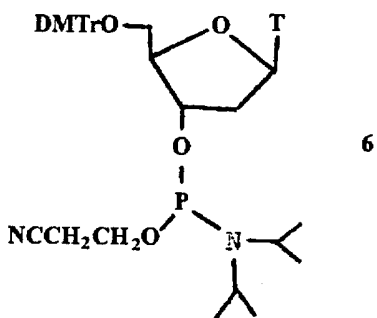
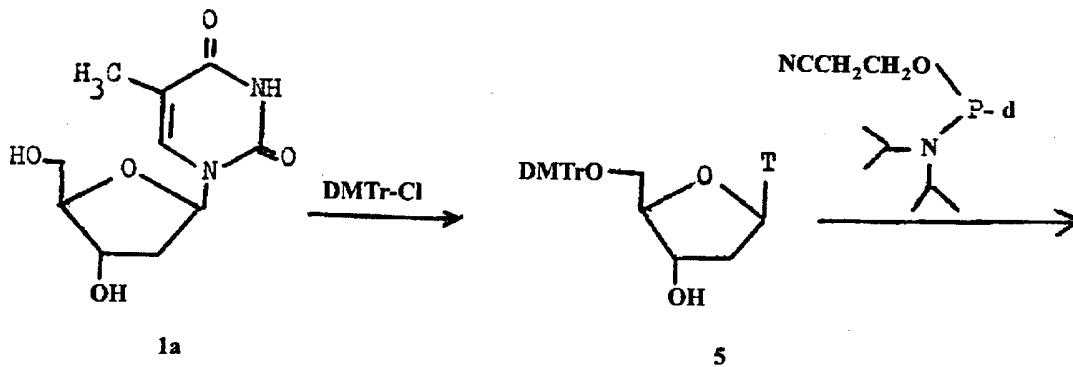
Výtěžek 4a: 93 % teorie.

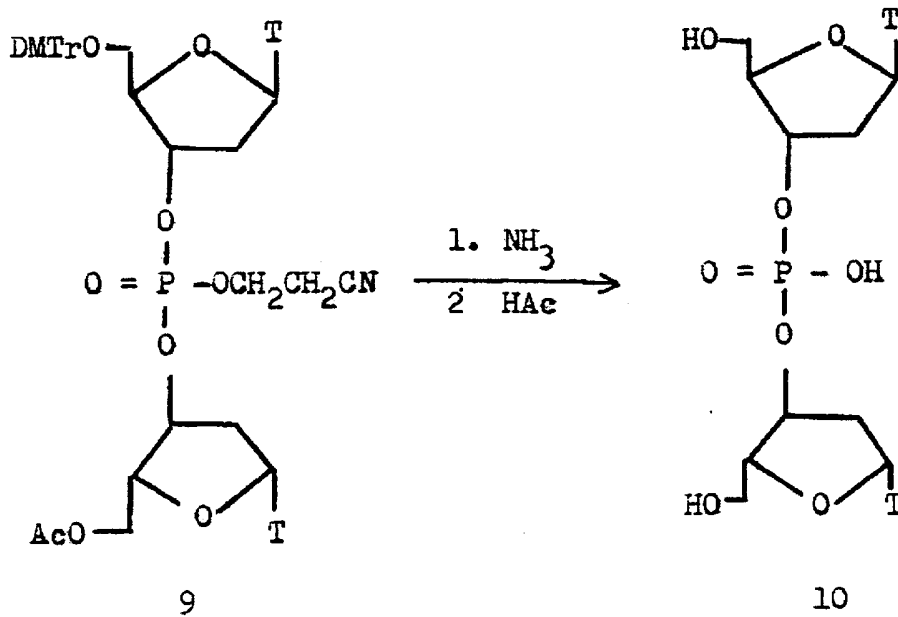
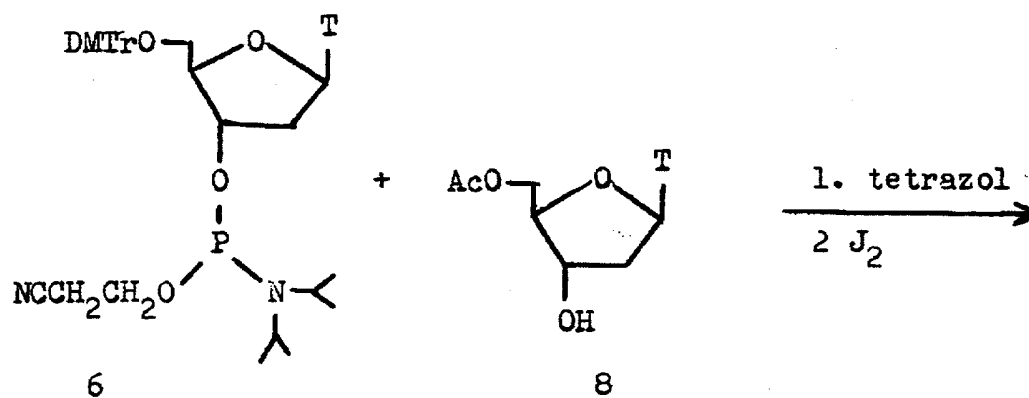
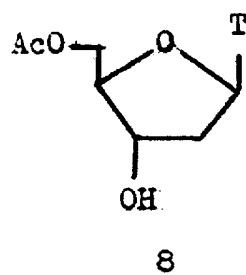
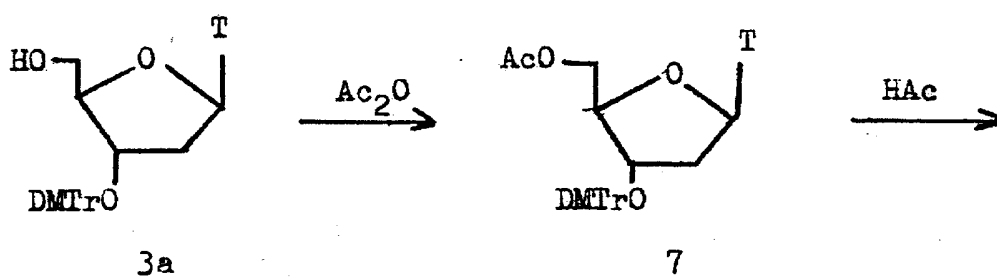
- 40 Příklad 2

Příprava thymidyl-thymidinu s 3'-3'-fosfodiesterovou vazbou

Dále je uveden průběh reakce k přípravě dimerního bloku

5





A) Příprava 5'-O-dimethoxytritylthymidinu 5

5	Násada:	20 mmol	thymidinu (4,84 g)
		24 mmol	4,4'-dimethoxytritylchloridu (8,2 g)
		1 mmol	dimethylaminopyridinu (122 mg)
		28 mmol	abs. triethylaminu (3,8 ml)

Příprava se provede metodou R. A. Jonese (G. S. Ti, B. L. Gaffney and R. A. Jones, H. Amer. Chem. Soc. 104, 1316–1319 (1982)) Thymidin se suší 3 násobným odpařením vždy s 50 ml absolutního pyridinu, vyjme se do 100 ml pyridinu a za chlazení ledem se přidá 4,4'-DMTr-Cl a DMAP jako katalyzátor. Reakce se kontroluje chromatografií na tenké vrstvě (rozpuštědlo CH₂Cl₂/MeOH 9:1); Po 4 hodinách je možné reakci přerušit přidáním 100 ml vody. Roztok se 3x extrahuje etherem, organická fáze se suší a odstředí a zbytek se čistí překrystalováním z benzenu. Výtěžek: 9,68 g DMTr-dT (89 %)

15

B) Příprava esteramidu kyseliny 5'-O-dimethoxytritylthymidin-3'-O-(N,N-diisopropylamino-β-cyanoethoxy)-fosforité 6

Příprava a čištění 6 se provádí přiměřeně syntéze esteru kyseliny 3'-O-DMTr-5'-O-fosforité 4 (příklad 1, C).

20

C) Příprava 5'-O-acetylthymidinu 8

25	Násada:	2,0 mmol	3'-O-DMTr-dT 3a (1,1 g)
		0,2 mmol	dimethylaminopyridinu (12,2 mg)
		4 ml	acetanhydridu

Literatura: A. M. Michelson and A. R. Todd, J. Org. Chem. 1955, 2632–2638 (modifikováno)

K roztoku 3'-O-DMTr-dT a DMAP ve 20 ml absolutního pyridinu se za chlazení ledem přikape Ac₂O. Po 3 hodinách reakční doby je reakce úplná (kontrola chromatograficky, rozpuštědlo CH₂Cl₂/MeOH 24:1). Produkt se vysráží 400 ml ledové vody, bílá sraženina se odsaje, promyje ledovou vodou a suší se.

30

Výtěžek: 1,02 g 3'-O-DMTr-5'-O-Ac-dT (88 %)

35

K odstěpení 4,4'-dimethoxytritylové skupiny se 7 při teplotě místnosti míchá v 10 ml 80% kyseliny octové. Přidáním 100 ml ledové vody se reakce po 3 hodinách ukončí; při tom 4,4'-dimethoxytritanol vypadne jako bílá sraženina. Odsaje se a vodný filtrát se odstředí. Olejovitý zbytek se vyjme do malého množství CH₂Cl₂ a při -15 °C se vysráží ve 200 ml n-hexanu.

40

Výtěžek: 455 mg 5'-O-acetylthymidinu (94 %).

D) Příprava a thymidilyl-(3'-3')thymidinu 10

45

50	Násada:	1,0 mmol	esteramidu kyseliny 5'-O-DMTr-thymidin-3'-O-(N,N-diisopropylamino-β-cyanoethoxy)-fosforité 6 (705,8 mg)
		0,9 mmol	5'-O-acetylthymidinu 8 (253 mg)
		2,6 mmol	tetrazolu (182 mg)
		9,0 mmol	J ₂ (1,14 g)

Syntéza dimerového bloku 10 se může provést metodou popsanou Kösterem (H. Köster, *Nucleic Acids Res.* 12, 4539–4557 (1984)) k výrobě 3'–5'–nukleosiddimerů. Směs 5'–O–acetylthymidinu a tetrazolu se rozpustí v 30 ml absolutního CH_3CN a pod argonem se dá k esteramidu kyseliny fosforité. Přidá se 9 mmol J_2 v 30 ml směsi acetonitril/pyridin/voda (24:5:1) a po dalších 15 minutách se přebytečný jod redukuje 5 ml 40% roztoku H_2SO_3 . Roztok se pak zahustí, zbytek se vyjme do CH_2Cl_2 , 2x se promyje nasyceným roztokem NaHCO_3 a rozpouštědlo se oddestiluje. Surový produkt se může čistit na sloupcové chromatografii (sloupcový materiál: silikagel 60H, eluační prostředek: ethylacetát/dichlormethan 50:50).

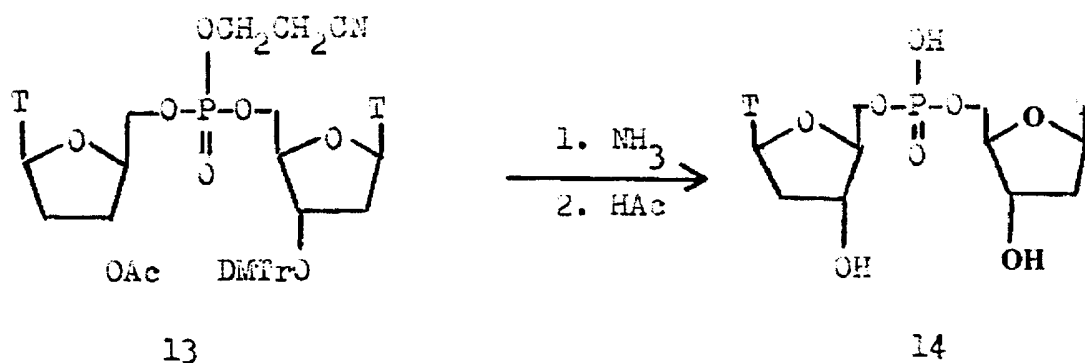
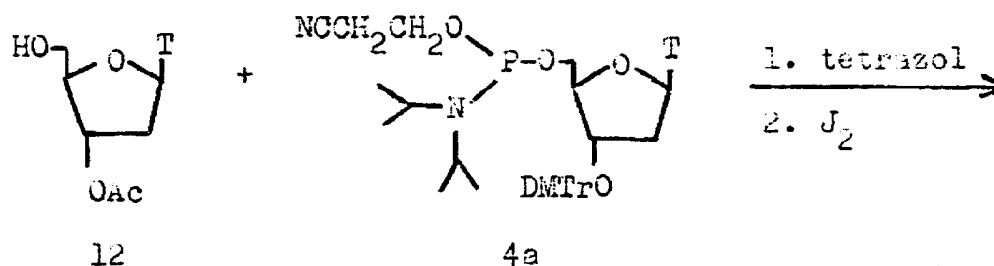
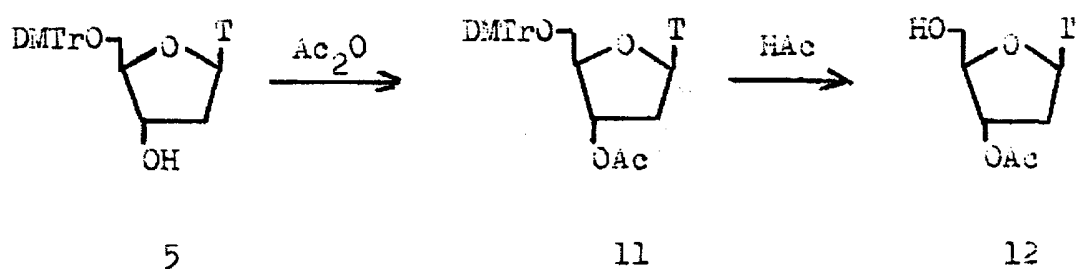
Výtěžek: 665 mg (75 %).

K odštěpení acetylové a β -kyanoethylové skupiny se na dimer 1 hodinu působí 5 ml koncentrovaného NH_3 při teplotě místnosti; 4,4'–dimethoxytritylová skupina se může odstranit 80% kyselinou octovou.

Příklad 3

Příprava thymidilyl–thymidinu s 5'–5–fosfodiesterovou vazbou 14

Následující schéma ukazuje přípravu 14



Jednotlivé reakční kroky k syntéze mezistupňů se provádějí metodami odpovídajícími metodám popsaným v příkladu 2.

5 Struktura obou dimerových bloků se může prokázat FAB–hmotovou spektrometrií a spektroskopii ¹H–jaderné resonance.

Příklad 4

10 Uchycení 3'–O–dimethoxytrityl–desoxyribonukleosid–5'–O–sukcinátu na nosném materiálu CPG 10–1400

Funkcionalizace CPG–nosiče 3–aminopropyllovými řetězci se provádí podle předpisu Atkinsona a Smitha (T. Atkinson, M. Smith v *Oligonucleotide Syntézis*, M. J. Gait (ed), 35–49 (1984)).

15

A) Příprava 3'–O–DMTr–desoxyribonukleosid–5'–O–sukcinátu 15

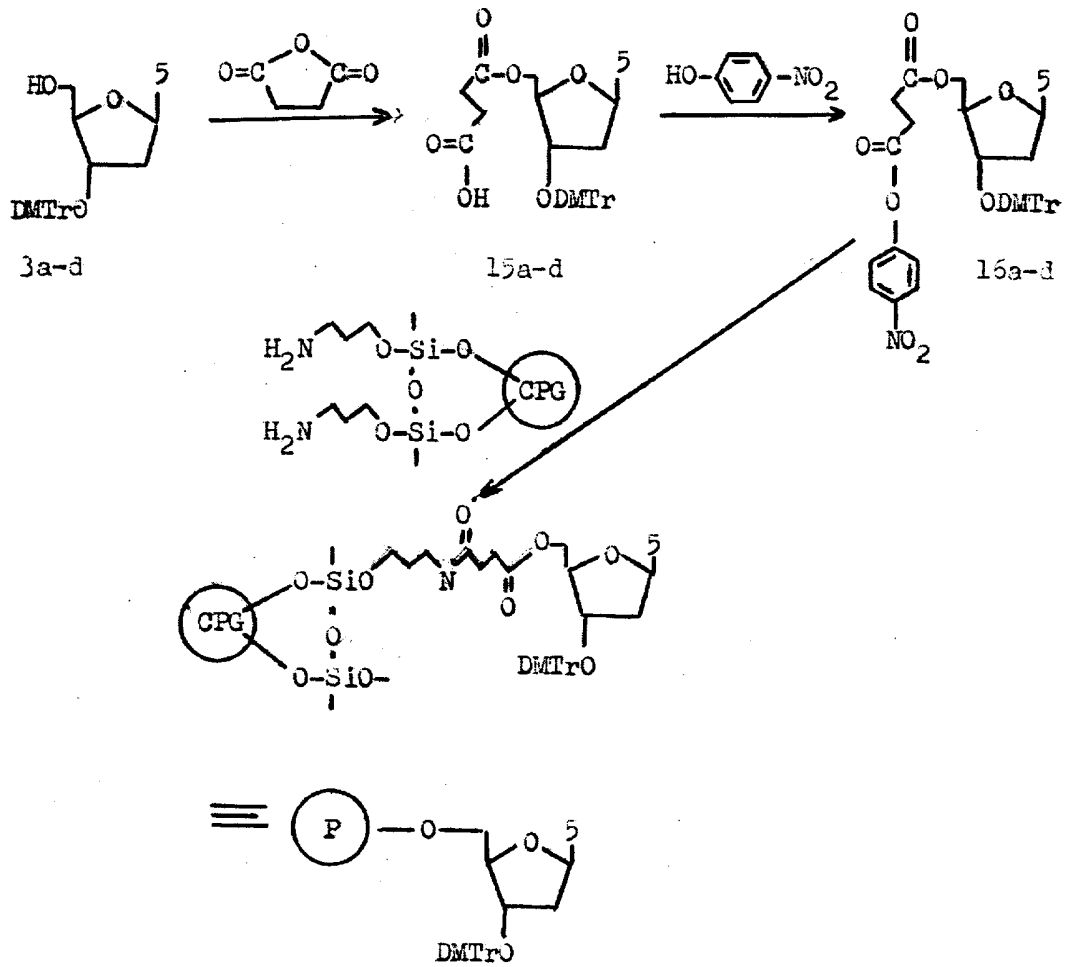
Násada:	1,0 mmol	3'–O–DMTr–dN 3
	0,8 mmol	anhydridu kyseliny jantarové (80 mg)
20	0,5 mmol	dimethylaminopyridinu (61 mg)

25 Reakce anhydridu kyseliny jantarové s 5'–OH skupinou desoxyribonukleosidu se provádí přes noc při teplotě místnosti vždy v 5 ml absolutního pyridinu s DMAP jako katalysátorem. Po dokončení reakce se roztok zahustí a pyridin se odstraní 3násobnou azeotropní destilací s toluenem. Zbytek se vyjme do dichlormethanu, promyje se ledově studeným roztokem kyseliny citronové (10%) a H₂O a organické fáze se odstředí ve vakuu. Surový produkt se rozpustí v cca 3 ml toluenu a vysráží se v 200 ml hexanu.

Výtěžek: 79–84 %

30

B) Příprava 3'–O–DMTr–desoxyribonukleosid–5'–O–sukcinyl–p–nitrofenylesteru 16 a zachycení na nosiči (viz následné schéma)



5	Násada:	0,8 mmol	3'-O-DMTr-dN-5'-O-sukcinátu 15
		0,8 mmol	p-nitrofenolu (112 mg)
		2,0 mmol	dicyklohexylkarbodiimidu (412 mg)
		3 g	funkcionalizovaného CPG 10-1400

10

Chráněný sukcinylovaný desoxyribonukleosid se dá k roztoku p-nitrofenolu v 5 ml absolutního dioxanu a 0,2 ml pyridínu a potom se přidá DCCl jako kondenzační prostředek. Po krátké době vypadá dicyklohexylmočovina a po 3 hodinách ukazuje chromatografie na tenké vrstvě (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) úplné zreagování. Sraženina se pod argonem odsaje a filtrát se přímo dá k suspenzi funkcionalizovaného nosného materiálu v 15 ml absolutního DMF. Přidá se 0,8 ml triethylaminu a násada se třepě přes noc. Zatížený nosič se pak odsaje, promyje methanolem a etherem a v exsikátoru se suší.

15

Zatížení nosiče se stanoví spektrometricky. Působením 10 ml 0,1 N roztoku kyseliny p-toluensulfonové v acetonitrilu na vzorek nosiče (ca. 2 mg) se 4,4'-dimethoxytritylkation odštěpí a měřením absorpce roztoku při 498 nm se podle vzorce

OD₄₉₈/ml x 10 ml x 14,3 (konst.)
mg nosiče

5 nechá vypočítat zatížení nosiče v $\mu\text{mol/g}$.

Výsledky: 3'-DMTr-dT-nosič: 23 $\mu\text{mol/g}$
 3'-DMTr-dG^{ibu}-nosič: 21 $\mu\text{mol/g}$
 3'-DMTr-dA^{bz}-nosič: 21 $\mu\text{mol/g}$
 10 3'-DMTr-dC^{bz}-nosič: 15 $\mu\text{mol/g}$

K blokování nezreagovaných aminoskupin se zatížený nosič 1 hodinu při teplotě místnosti třepa s roztokem 1 ml anhydridu kyseliny octové a 50 mg dimethylaminopyridinu v 15 ml absolutního pyridinu, potom se odsaje, promyje methanolem a etherem a suší se.

15

Příklad 5

20 a) Syntéza oligonukleotidů s terminální 3'-3'- a 5'-5'-vazbou

Syntézy se provádějí v DNA -syntetizátoru firmy Applied Biosystems, Forster City, USA, Modell 381A, za použití 0,2 μmol standardního programu pro kondenzační kroky. Syntezní cykl je ukázán dříve (str. 11). Jako nosný materiál slouží CPG 10-1400 popsany v příkladu 4. Kondensace se provádějí s obvyklými estery kyseliny nukleosid-3-fosforité; pouze v posledním
 25 reakčním cyklu se nasadí v příkladu 1 popsané esteramidy kyseliny 3'-O-DMTr-nukleosid-5'-O-(N,N-diisopropylamino- β -kyano-ethoxy-)fosforité. Po odštěpení oligonukleotidu z nosiče konc. NH_3 a odstranění všech fosfátových a bazických ochranných skupin zahříváním amoniakálního roztoku na 60 °C přes noc se vzorek odsolí vysrážením v ethanolu a cílový řetězec se elektroforesou na polyakrylamidovém gelu čistí od kratších fragmentů.

30

Pro pokusy se syntetizoval eicosathymidylat s pouze 3'-5'-vazbami jakož i s terminálními 3'-3'- a 5'-5'- vazbami. Mimo to se volily řetězce z SV40 - genomu. Byly syntetizovány následující oligonukleotidy:

35 dT₂₀;

dT₂₀(3'-3', 5'-5');

SV40TS17: 17-mer, řetězec ve smyslu kódu z SV40-genomu na polohách 5159-5176;
 5'-AGT TTT GCA AAG ATG GA-3'

40 SV40TAS17: 17-mer, řetězec proti smyslu kódu k SV40TS17;
 5'-TCC ATC TTT GCA AAG CT-3'

SV40TA17 (3'-3',5'-5'): 17-mer, řetězec proti smyslu kódu k SV40TS17 s 3'-3'- popřípadě 5'-
 5'-vazbou na koncích;
 45 3'-T(5'-5')CC ATC TTT GCA AAG C(3'-3')T-5'

SV40TS35: 35-mer, řetězec ve smyslu kódu z SV40-genomu na polohách 5142-5176;
 5'-AGC TTT GCA AAG ATG GAT AAA GTT TTA AAC AGA AG-3'

50 SV40AS35: 35-mer, řetězec proti smyslu kódu k SV40TS35;
 5'-TCT CTG TTT AAA ACT TTA TCC ATC TTT GCA AAG CT-3'

SV40TAS35(3'-3',5'-5'): 35-mer, řetězec proti smyslu kódu k SV40TS35 s 3'-3'- popřípadě
5'-5'- vazbou na koncích;
3'-T(5'-5')CT CTG TTT AAA ACT TTA TCC ATC TTT GCA
5 AAGC(3'-3')T-5'

b) Syntéza oligonukleotidů s terminální 3'-3'-vazbou

10 Jako nosný materiál slouží CPG 10-1400 popsany v příkladu 4. Kondensace se provede s obvyklými estery kyseliny nukleosid-3'-fosforité.

Po odštěpení oligonukleotidu z nosiče konc. NH₃ a odstranění všech fosfátových a basických ochranných skupin zahříváním amoniakálního roztoku na 60 °C přes noc se vzorek odsolí
15 vysrážením v ethanolu a cílový řetězec se elektroforesou na polyakrylamidovém gelu čistí od krátkých fragmentů.

SV40TAS17(3'-3'): 17-mer, řetězec proti smyslu kódu k SV40TS17 s 3'-3'- vazbou na konci
3'-TCC ATC TTT GCA AAG C(3'-3')T-5'

20 c) Syntéza oligonukleotidů s terminální 5'-vazbou a 2-terminálními thiofosfátovými zbytky
Jako nosný materiál slouží komerční CPG-materiál s 5'-O-dimethoxytritylthymidinem vázaným
přes 3'-hydroxyskupinu. Kondensace se provede s obvyklými estery kyseliny nukleosid-3'-
fosforité; pouze v posledním reakčním cyklu se nasadí esteramidy kyseliny 3'-O-DMTr-
25 nukleosid-5'-O-(N,N-diisopropylamino-β-kyano-ethoxy)-fosforité popsané v příkladu 1.

U prvních dvou reakčních cyklů se místo obvyklé oxidace jodem provede oxidace elementární
sírou (W. Stec et al. J.A.C.S. 106, str. 6077, 1984).

Po odštěpení oligonukleotidu od nosiče konc. NH₃ a odstranění všech fosfátových a basických
30 ochranných skupin zahříváním amoniakálního roztoku na 60 °C přes noc se vzorek odsolí
vysrážením v ethanolu a cílový řetězec se čistí od kratších fragmentů elektroforesou na
polyakrylamidovém gelu.

Syntetizuje se následující oligonukleotid:

35 SV40TAS17(5'-5'): 17-mer, řetězec proti smyslu kódu k SV40TS17 s 5'-5'- vazbou na 5'-
konci a dvěma thiofosfatinternukleotidovými vazbami na 3'- konci 3'-T(5'-5')CC ATC TTT
GCA AAG(P_s)C(P_s)T-3'

40 Příklad 6

Analýza struktury a řetězce oligonukleotidu s terminální 3'-3'- a 5'-5'- vazbou

45 Analýza řetězce oligonukleotidu se provádí metodou Maxama a Gilberta (A. M. Maxam a W.
Gilbert, Methods in Enzymology 65, 499-560 (1980)). Vždy 100 pmol vzorku se v přítomnosti
(γ-³²P)-ATP/T4- polynukleotidkinázy na 5'-OH-skupině radioaktivně značí a potom se
provedou následující bazicky specifické reakce:

50 (A+G) – reakce: protonace bází kyselinou mravenčí
G – reakce: reakce s dimethylsulfátem
(T+C) – reakce: hydrazinolýza
C – reakce: reakce s hydrazinem v přítomnosti 5 M NaCl

Působením 1 M piperidinu při 95 °C se oligonukleotidové řetězce štěpí na modifikovaných místech; zlomky se mohou elektroforezovou na polyakrylamidovém gelu oddělit (20 % akrylamidu, 7 M močoviny) a autoradiografií detekovat. Obr. 1 ukazuje autoradiogram analýsy řetězce SV40TS17, SV40TAS17 a SV40TAS17(3'-3',5'-5') (popis oligonukleotidů viz příklad 5). Poněvadž jsou řetězce na 5'-OH skupině značené, může se sled bází u pouze 3'-5'-vazeb odečítat ve směru 3'-5'-směru. V důsledku 3'-3'- konce má však oligonukleotid SV40TAS17(3'-3',5'-5') radioaktivně značenou 5'-OH skupinu na své koncové části; směr odečítání řetězce se tím otáčí (obr. 1). To je také důkazem pro 5'-5'-fosfodiesterovou vazbu na 5'- koncové části řetězce s volnou 3'-OH skupinou, která se enzymem polynukleotidkinázou nemůže fosforylovat.

Příklad 7

Zkouška stability oligonukleotidu s 3'-3' a 5'-5' konci v testu krevního séra

A) Kinasace eicosathymidylatu s 3'-3'- a 5'-5'- konci

Literatura: T. Mizuno, M. Y. Chou a M. Inouya, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1966-1970 (1984)

Násada: 1 µl oligonukleotid (0,01 OD₂₆₀)
 1 µl 10 x kináza – pufr
 1 µl T4-polynukleotidkinasa
 1 µl γ-³²P-dATP (spec. aktivita: 6000 Ci/mmol)
 6 µl H₂O

Násada se 30 min inkubuje při 37 °C, potom se přidáním 90 µl H₂O ukončí a frakcionuje se přes sloupec [®]Sephadex G 50. Produkční frakce se spojí a lyofilizují se.

B) Test krevního séra

Literatura: S. M. Heywood, Nucleic Acids Res. 14, 6771-6772 (1986)

Násada: 0,01 OD₂₆₀ radioaktivně fosforylovaného oligonukleotidu pro kontrolní vzorek, 0,01 OD₂₆₀ T₂₀ pro zkoušku 0,01 OD₂₆₀T₂₀ s 3'-3'- a 5'-5'- koncovými vazbami
 50 µl čerstvého lidského sera

Sérum se dá ke vzorku a krátce se ručně třepe. Potom se ihned pro 0-hodnotu odpipetují 3 µl a dají se do 3 µl pufru s formamidem, aby se přerušila aktivita enzymu. Potom se vzorek inkubuje při 37 °C.

Pro kinetinu se po určitých časových úsecích odeberou 3 µl a přeruší se jak popsáno shora.

Kontrolní vzorek: 5 min, 8 min, 11 min, 15 min, 30 min.
 Zkouška: 5 min, 8 min, 11 min, 15 min, 30 min, 90 min.

Vzorky se dají na 20% polyakrylamidová gel, dělí se elektroforesou na gelu a potom se autoradiografují.

Autoradiogram štěpení s čerstvým lidským sérem zleva (viz. obr. 2):

Kontrolní vzorek: 0–hodnota, 5 min, 8 min, 11 min, 15 min, 30 min.
 Zkouška: 0–hodnota, 5 min, 8 min, 11 min, 15 min, 30 min, 90 min.

5 Již po 5 minutách se ukazuje, že začalo odbourávání přírodního oligonukleotidu. Štěpení se zvyšuje s přibývajícím časem. Modifikovaný oligonukleotid zůstává i po 90 minutách inkubace prakticky nezměněn. Slabé pásy, které jsou vidět při všech hodnotách kinetiky, resultují z aktivity endonukleáz, které jsou přítomné v séru. Toto štěpení je důležité pro terapeutické použití těchto oligonukleotidů, poněvadž zaručuje pomalé odbourávání účinné substance a nemůže tím dojít k akumulaci těchto substancí v těle.

10

Příklad 8

15 Zkouška chování oligonukleotidů s terminální 3'–3'– a 5'–5'– vazbou proti fosfodiesteráze z hadího jedu

A) Kinazace eikosathymidylatu s 3'–3'– a 5'–5'– konci

20 Jak popsáno v příkladu 7

B) Hydrolysa eikosathymidylatu s 3'–3'– a 5'–5'– konci pomocí fosfodiesterázy z hadího jedu

Literatura: A. Hirashima, S. Sawaki, Y. Inokuchi a M. Inouye, PNAS USA 83, 7726–7730 (1986)

25

Násada: 5 μ l RNA–nosiče
 50 μ l SQ – pufru
 1 μ l SVpdE (1,5 u/ μ l)

30 Radioaktivně fosforylovaný vzorek (standart: T₂₀, zkouška: T₂₀ s terminální 3'–3'– a 5'–5'– vazbou) se lyofilizuje, k tomu se dá RNA – nosič a SQ – pufr. Od této směsi se pro 0–hodnotu odpipetuje 5 μ l, ke zbytku roztoku se přidá enzym a při 37 °C se inkubuje. Pro kinetiku standartu se odebere po 5 min, po 15 min a po 30 min po 5 μ l, pro kinetiku eikosathymidylatu s 3'–3'– a 5'–5'– konci se po 5 min, 30 min, 45 min, 60 min a 90 min odebere po 5 μ l. K deaktivaci enzymu se vzorky přímo po odběru zahřívají na vodní lázni 2 min na 95 °C. Vzorky se lyofilizují a nanosou se na analytický 20% polyakrylamidový gel. Po gelelektrolytickém dělení se autoradiografuje.

35

Autoradiogram SVpdE – štěpení (viz obr. 3)

40 zleva: T₂₀ (standart), T₂₀ s terminálními 3'–3'– a 5'–5'–vazbami,

kinetika zkoušky: po 5 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min, mix z 0 min/15 min, mix z 0 min/30 min, kinetika standartu: po 5 min, 15 min, 30 min, 45 min.

45 Vazba 5'–5' se, jak již popsáno, ihned štěpí. Že další štěpení ve srovnání se standartem pokračuje ještě jen velmi pomalu, je značný strukturní průkaz. Po štěpení 5'–5'– fosfordiesterové vazby vznikne molekula, která na místě štěpení nese 5'–hydroxylovou funkci. Na druhé koncové části je molekula 5'–fosforylovaná. Obě koncové části jsou pro fosfodiesterázu z hadího jedu nenapadnutelné. Pomalé, ale velmi značné další odbourávání je pravděpodobně, podle výrobce popsaných přísad (J. G. Izant a H. Weintraub, Cell 36, 1007–1015(1984)), možné odvozovat od jednořetězcově specifické endonukleázy, které PM2 DNA mění v otevřené formy. Krásně je možné odečíst délku řetězce. Je však možné odečíst pouze 19 páků, poněvadž při první hodnotě kinetiky, po 5 min, je 5'–5'–fosfodiesterová vazba již odštěpena.

50

Příklad 9

Zkoušky hybridizačního chování oligonukleotidů opatřených terminálními 3'-3'- a 5'-5'- konci

- 5 Ke zkouškám hybridizačního chování se zaznamenávají křivky tavení vždy ekvimolárního množství (5,23 nmol) SV40TS17 a SV40TAS17(3'-3',5'-5') (popis oligonukleotidů viz příklad 5), rozpustí se v 1 ml 10 nM Na-kakodylátu/100 mM NaCl-pufru, pH 7,0, zahřeje se na 70 °C a průběh renaturace se zjišťuje při pomalém ochlazování (1 stupeň/min) měřením absorpce roztoku. K záznamu křivky standartu se použijí stejná množství SV40TAS17. Analogicky se
10 v pufru mísí vždy 4,75 nmol SV40TS35 a SV40TAS35 popřípadě SV40TS35 a SV40TAS35(3'-3',5'-5'), zahřeje se na 90 °C a absorpce se měří při ochlazování. Byly zjištěny křivky tavení, které poskytují následující hodnoty T_m

	SV40TS17 . SV40TAS17	54,1 °C
15	SV40TS17 . SV40TAS17(3'-3',5'-5')	53,3 °C
	SV40TS35 . SV40TAS35	65,5 °C
	SV40TS35 . SV40TAS35(3'-3',5'-5')	64,2 °C

- 20 Teploty tavení se tedy abiologickými vazbami snižují jen o 0,6 °C u 17meru popřípadě o 1,3 °C u 35meru.

Příklad 10

- 25 Inhibice biosyntézy SV40 T-antigenu oligonukleotidy s terminální 3'-3'- a 5'-5'- vazbou

A) Buněčná kultura

- 30 Buňky COS1 se v Eaglově prostředí v Dulbeccově modifikaci (DMEM) kultivují s 10 % fetálního telecího séra. Misky pro tkáňové kultury se inkubují při 37 °C a 7,5 % CO₂.

B) Radioaktivní značení a rozrušení buněk

- 35 Asi 4×10^4 buněk se jako monolayer dá do misek pro tkáňové kultury. Buňky se třikrát promyjí DMEM bez methioninu a potom se značí 100 μ Ci ³⁵S-methioninu. Pro zkoušky modulace proti smyslu kódu se buňky současně 30 min při 37 °C inkubují s oligonukleotidem SV40TAS17(3'-3',5'-5') a radioaktivním methioninem. Potom se buňky dvakrát promyjí DMEM obsahujícím 10 % fetálního telecího séra a neznačený methionin a v tomto prostředí se nechají dalších 30 min. K rozrušení se na buňky působí ledově studeným fosfátem pufrovaným fyziologickým
40 roztokem NaCl (PBS), od misek se odškrábnou a 2 min se při 400 g odstředí. Usazenina buněk se pak 45 min na ledě lysuje 0,4 ml rozrušovacího pufru (0,5 % nonidetu P40, 100 mM tris-HCl, pH 9,0, 0,1 M NaCl) pro 3×10^6 buněk. K zamezení proteolysy se k rozrušovacímu pufru přidá 1 % trasyolu a fenylmethylsulfonylfluorid až do konečné koncentrace 0,25 mg/ml. Lysát se pak
45 se obsah proteinu metodou Lowryho. K imunoprecipitaci se nasadí stejná množství celkového proteinu.

C) Imunoprecipitace

- 50 Jak pro imunoprecipitaci SV 40 T-antigenu, tak také mutant T-antigenu lokalizovaných v cytoplasmě se použije monoklonální protilátka PAb108. Protilátka se chromatografií na proteinu Asefaroze čistí od přebytku hybridomu. Buněčný extrakt se předběžně přes noc při 4 °C sráží 100 μ l 10% suspenze teplem inaktivovaných a formaldehydem fixovaných bakterií kmene

Staphylococcus aureus (Cowan 1). Bakterie se pak odstředí, zbytek se alespoň 2 hodiny při 4 °C inkubuje s monoklonální protilátkou a přidáním *S. aureus* se tvoří vysocspecifické imunokomplexy. Tento postup se 3 x opakuje, aby se zajistila úplná precipitace.

5 Potom se imunoprecipitáty promývají: třikrát 50 mM tris-HCl, pH 8,0, 500 mM LiCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 % trasylolu; dvakrát 50 mM tris-HCl, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 5 mM EDTA, 1 % nonidetu P40 a jednou 50 mM NH₄HCO₃. Potom se 45 min při 4 °C eluuje 200 µl elučního pufru (50 mM NH₄HCO₃, 1 % SDS, 1 % β-merkaptioethanolu), lyofylizuje se, 10 minutovým varem se rozpustí ve 20 µl pufru (65 mM tris-HCl, pH 6,8, 5% β-merkaptioethanolu, 1 % glycerinu, 0,01 % bromfenolové modře) a uloží se na 3% polyakrylamiový gel (10 % SDS).
10 Proteiny se rozdělí diskontinuální elektroforesou na gelu; pásy se mohou lokalizovat fluorografií na rentgenovém filmu (Kodak X-AR).

S oligonukleotidy připravenými podle vynálezu tak, že prodlouží začátek translace pro T-antigen, bylo při použití extrabuněčné koncentrace 30 µ-molární registrována 70% inhibice virového růstu. To je protikladem k účinnosti odpovídajících řetězců, které nebyly stavěny podle vynálezu, tj. řetězců bez 3'-3'- a 5'-5'-vazeb. Zde při použití stejné koncentrace nebyla zjištěna žádná inhibice.

20 Obr. 4 ukazuje zřejmou inhibici T-Ag-biosyntézy při ošetření buněk 30 µM SV40TAS17(3'-3',5'-5').

Příklad 11

25 Srovnání sérové stability oligonukleotidů, které jsou modifikované pouze na 3'-konci popřípadě pouze na 5'-konci invertovanými fosfodiesterovými vazbami

Oligonukleotidy se nukleázou odbourávají od své 3'-koncové části (J. P. Shaw, K. Kent, J. Bird, J. Fishback, B. Froehler, *Nucleic Acids Res.* 19, 747-750 (1991)). Mělo by se proto zkusit, zda sama terminální 3'-3'-fosfodiesterová vazba stačí ke stabilizaci oligonukleotidu v krevním séru. Poněvadž 32p značený fosfátový zbytek, zejména při delším působení sérem na vzorek, se fosfatázami odštěpuje, bylo k detekci oligonukleotidů použito fluoresceinu.

35 Syntetizovány byly následující řetězce z genomu *Xenopus levis*:

Xelev 1: 3'-A(5'-5')GC CTC AAA C*AT GTG TGA CG-3'

Xalev 2: 5'-AGC CTC AAA C*AT TGT TGA C(3'-3')G-5'

40 Syntézy se provádějí jak popsáno v příkladu 5, přičemž se pro 10. kondensaci nasadí esteramid kyseliny cytidin-fosforité C*, který umožňuje dodatečnou kovalentní vazbu s fluoresceinem. Vestavba fluoresceinu se provádí podle návodu firmy Pharmacia (Pharmacia LKB Biotechnology Auto Primer™ Syntézis Kit Instructions (XY-023-00-01)). Modifikované oligonukleotidy se čistí elektroforesou na polyakrylamidovém gelu.

45 Sérový test: 10 pmol oligonukleotidu
140 µl čerstvého lidského séra

50 Vzorky se inkubují při 37 °C. Po 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 8 hodinách a 72 hodinách se odebere vždy 20 µl, 2 x se extrahuje směsí fenol/chloroform/isoamylalkohol 25:24:1 a oligonukleotidy se srazí ethanolom. Produkty štěpení se dělí a detekují na 16% polyakrylamidovém gelu v automatickém sekvenátoru A.L.F. (Pharmacia, Freiburg). Jak ukazuje obr. 5, vykazují pouze řetězec opatřený na 5'-konci invertovanou internukleotidovou vazbou již

po 15 min působení séra produkty odbourání a po 60 min, je již téměř úplně odbourán. Oligonukleotid „chráněný“ na 3'-konci 3'-3'-vazbou je sám proti tomu po 72 hodinách teprve částečně odbourán.

5

Příklad 12

Inhibice exprese genů v in vitro–expresním systému

10 Aby se kvantifikovala exprese genů INV–oligonukleotidy, byl zkoušen účinek odpovídajících oligonukleotidů s řetězcem proti smyslu kódu na expresi p53 v systému in vitro, aby p53 obsahoval mRNA (E. Reihnsaus, M. Kohler, S. Kraiss, M. Oren, M. Montenarli, *Oncogene* 5, 137–144 (1990)).

15 Byly syntetizované řetězce proti smyslu kódu

$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6\text{pTAA TCA GTC GTT GGT CCA CAC CTT}(3'-3')\text{T}$

a jako srovnávací vzorek odpovídající řetězec ve smyslu kódu

20

$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6\text{pAAA GGT GTG GAC CAA CGA CTG ATT}(3'-3')\text{A}$

Oligonukleotid s řetězcem proti smyslu kódu je řízen proti počátku translace onkoproteinu p53
Zkoušeny byly exprese proteinu

25

1. bez přidání oligonukleotidu
2. při přidání 30 μM řetězce proti smyslu kódu
3. při přidání 1 μM řetězce proti smyslu kódu
4. při přidání 10 μM řetězce proti smyslu kódu

30

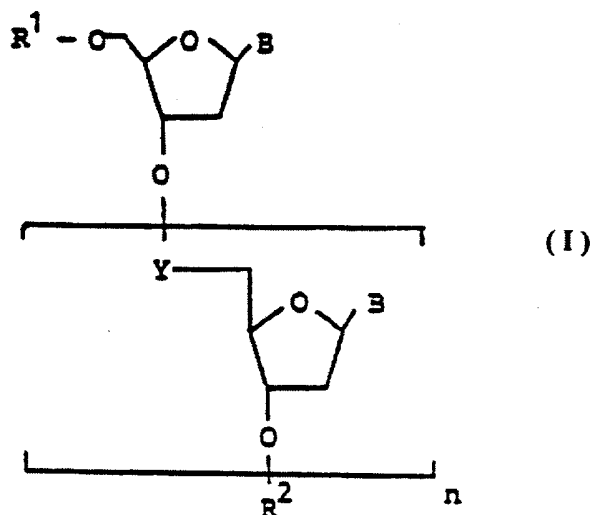
Ke kvantifikaci bylo stanoveno černé zbarvení proteinových pásů densitometricky (E. Reihnsaus, M. Kohler, S. Kraiss, M. Oren, M. Montenarli, *Oncogene* 5, 137–144 (1990)).

35 Obr. 6 ukazuje, že přídavek 10 μM oligonukleotidu s řetězcem proti smyslu kódu k systému exprese působí cca 70% inhibici. Při snížení koncentrace na 1 μM není více možné zjistit téměř žádnou inhibici, rovněž při přídávku řetězce ve smyslu kódu, který neváže na mRNA.

PATENTOVÉ NÁROKY

5

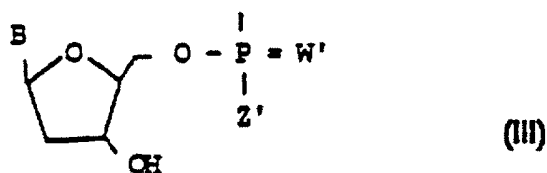
1. Analogy oligonukleotidů s terminálními 3'-3', popřípadě 5'-5'-internukleotidovými vazbami obecného vzorce I



10

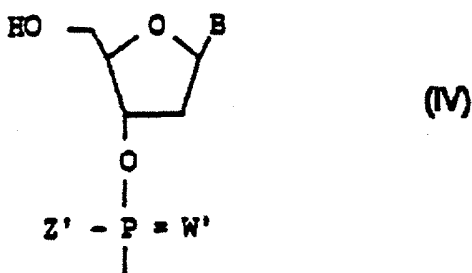
kde

R^1 značí vodík nebo zbytek vzorce III



15

R^2 značí vodík nebo zbytek vzorce IV



20

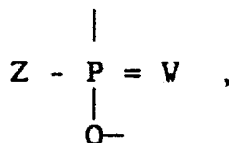
příčemž však alespoň jeden ze zbytků R^1 nebo R^2 představuje zbytek vzorce III nebo IV,

B představuje bázi, vybranou ze skupiny zahrnující adenin, cytosin, guanin nebo nepřirodní báze purin, 2,6-diaminopurin, 7-deazaadenin, 7-deazaguanin, N^4 -ethanocytosin popřípadě jejich prekurzorové formy

25

Y značí zbytek z řady $O-Si(R)_2$, OCH_2 , $C(O)NR$ nebo $OCH_2-C(O)$, kde R představuje alkyl s 1 až 6 atomy uhlíku, fenylovou skupinu, fenylovou skupinu, substituovanou jednou až

tříkrát alkylovou skupinou s 1 až 6 uhlíkovými atomy, alkoxykupinou s 1 až 6 uhlíkovými atomy a/nebo atomem halogenu, cykloalkylovou skupinu s 5 nebo 6 uhlíkovými atomy nebo skupinu



5

W a W' nezávisle na sobě značí kyslík nebo síru,

Z a Z' nezávisle na sobě značí O⁻; S⁻; alkoxykupinu s 1 až 18 atomy uhlíku; alkyl s 1 až 18 atomy uhlíku; skupinu NHR³ s R³ znamenajícím alkyl s 1 až 18 atomy uhlíku, nebo alkoxy-
 10 alkyl s 1 až 4 atomy uhlíku v alkoxyzbytku a s 1 až 6 atomy uhlíku v alkylovém zbytku; skupinu NR³R⁴, kde R³ má shora uvedený význam a R⁴ značí alkyl s 1 až 18 atomy uhlíku, nebo kde R³ a R⁴ spolu s nosným atomem dusíku značí 5 až 6 členný heterocyklický kruh, který může navíc obsahovat další heteroatom z řady O, S, N a

15 n znamená celé číslo 5 až 60,

jakož i jejich fyziologicky snášenlivé sole a tyto sloučeniny, substituované skupinami, podporujícími intrabuněčnou absorpci, skupinami, které slouží jako značící skupiny in vitro nebo in vivo, chemiluminiscenčními skupinami a/nebo skupinami, které při hybridizaci
 20 oligonukleotidu na biologické DNA nebo RNA napadají tyto DNA- nebo RNA- molekuly za vazby nebo štěpení.

2. Analogy oligonukleotidů podle nároku 1, vzorce I, kde R² představuje zbytek vzorce IV a R¹ značí vodík; R¹ popřípadě R² představují zbytek vzorců III popřípadě IV; nebo R² značí vodík a R¹ znamená zbytek vzorce III, přičemž buď W nebo Z v posledním případě neznamenaají kyslík.
 25

3. Analogy oligonukleotidů podle nároků 1 nebo 2, vzorce I, kde W představuje kyslík, nebo Z a W oba znamenají kyslík.
 30

4. Analogy oligonukleotidů podle nároků 1 až 3, vzorce I, kde R² představuje zbytek vzorce IV a R¹ značí vodík.

5. Analogy oligonukleotidů podle nároků 1 až 4, vzorce I, kde Z a Z' nezávisle na sobě značí
 35 výhodně alkoxykupinu s 1 až 8 uhlíkovými atomy, obzvláště 1 až 3 uhlíkovými atomy, zejména methoxykupinu; alkylovou skupinu s 1 až 8 uhlíkovými atomy, obzvláště alkylovou skupinu s 1 až 3 uhlíkovými atomy, zejména methylovou skupinu; R³ výhodně značí alkylovou skupinu s 1 až 8 uhlíkovými atomy, zejména alkylovou skupinu s 1 až 4 uhlíkovými atomy, nebo také methoxyethylou skupinu; R⁴ značí výhodně alkylovou skupinu s 1 až 8 uhlíkovými atomy,
 40 zejména alkylovou skupinu s 1 až 4 uhlíkovými atomy nebo R³ a R⁴ spolu výhodně tvoří morfolinovou skupinu a n značí výhodně celé číslo 10 až 40, obzvláště 15 až 25.

6. Analogy oligonukleotidů podle nároků 1 až 5, vzorce I, substituované skupinami, podporujícími intrabuněčnou absorpci, zvolenými ze skupiny alkylových zbytků s až 18
 45 uhlíkovými atomy, cholesterylu, kyselin žlučových a peptidů, vázajících se na receptory, které hrají roli při receptory zprostředkované endocytose; skupinami, které slouží jako značící skupiny in vitro nebo in vivo ze skupiny obsahující akridinylovou skupinu, dansylovou skupinu nebo fluoresceinylovou skupinu; nebo chemiluminiscenčními skupinami ze skupiny obsahující akridiniumesterové skupiny; a/nebo skupinami, které při hybridizaci oligonukleotidu na

biologické DNA nebo RNA napadají tyto DNA– nebo RNA–molekuly za vazby nebo štěpení, ze skupiny obsahující akridin, psoraleny a chlorethylaminoarylové konjugáty.

7. Způsob výroby analogů oligonukleotidů vzorce I, podle nároků 1 až 6,

5

vyznačující se tím, že se

10 a) odpovídající nukleotidová jednotka s 3'– popřípadě 5'–terminálními skupinami fosforu(III) nebo fosforu(V) nebo její aktivovaný derivát nechá reagovat s další odpovídající nukleotidovou jednotkou s 3'–, popřípadě 5'–terminální volnou hydroxyskupinou, nebo se

15 b) odpovídající oligonukleotid zkonstruuje z fragmentů stejným způsobem, v oligonukleotidech získaných podle (a) nebo (b) se popřípadě jedna nebo několika ochranných skupin zavedených dočasně k ochraně ostatních funkcí odštěpí a takto získané oligonukleotidy vzorce I se popřípadě převedou na svoje fyziologicky snášenlivé soli.

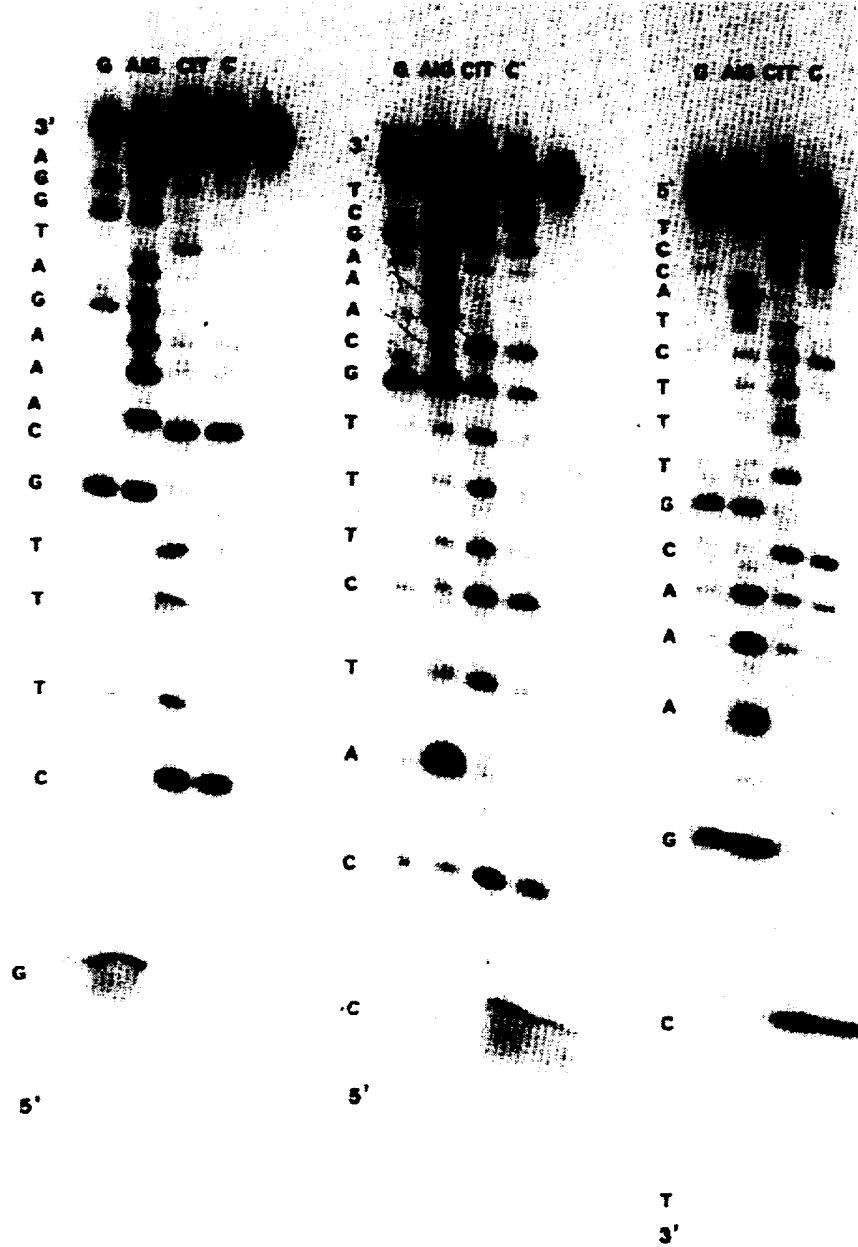
20 8. Analogy oligonukleotidů vzorce I, podle nároků 1 až 6 k použití pro hybridizačně chemický, na adici na nukleové kyseliny s dvojitým nebo jednoduchým řetězcem spočívající postup regulace nebo potlačování biologických funkcí nukleových kyselin, jakož i k selektivnímu potlačování exprese funkcí virového genomu a k profylaxi a terapii virových funkcí, k potlačování nádorové funkce a k terapii rakovinných onemocnění.

25 9. Farmaceutické prostředky potlačující funkci nukleových kyselin, **vyznačující se tím, že jako účinnou látku obsahují jeden nebo několik analogů oligonukleotidů podle nároku 1 až 6, popřípadě spolu s fyziologicky snášenlivými pomocnými a/nebo nosnými látkami, zejména pro intravenosní nebo topickou aplikaci.**

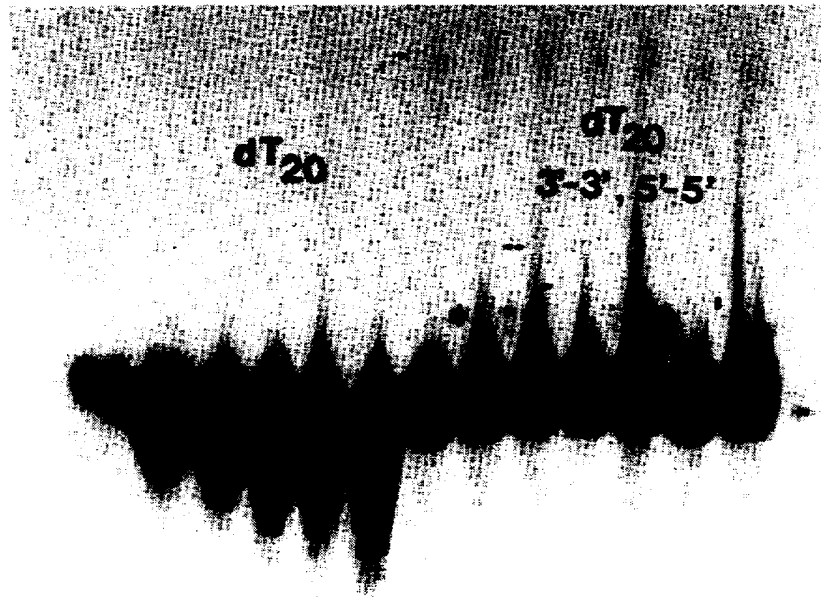
30

6 výkresů

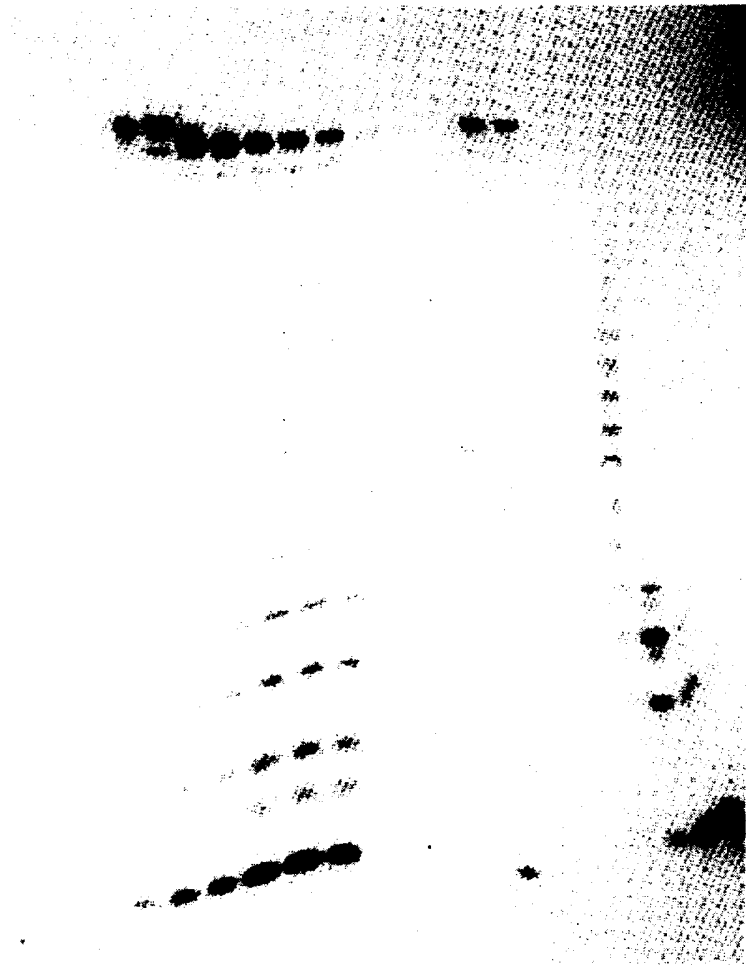
Obr.1



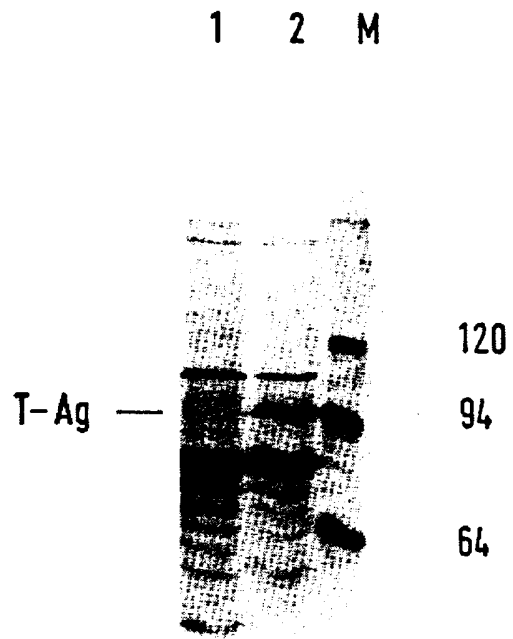
Obr. 2



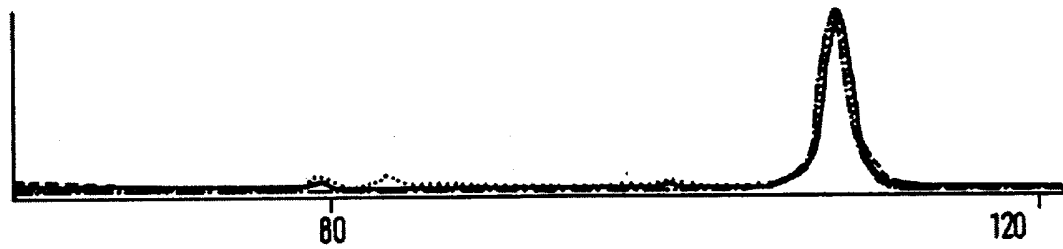
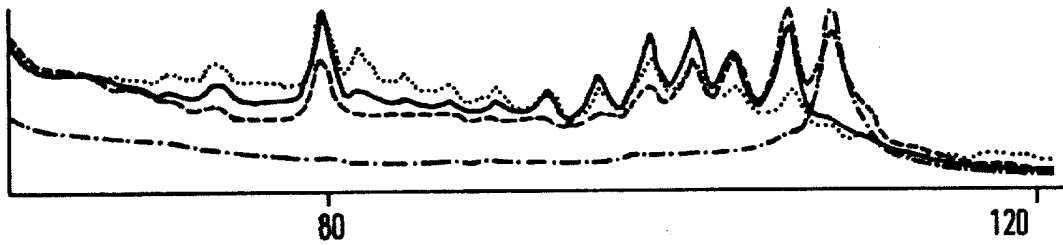
Obr.3

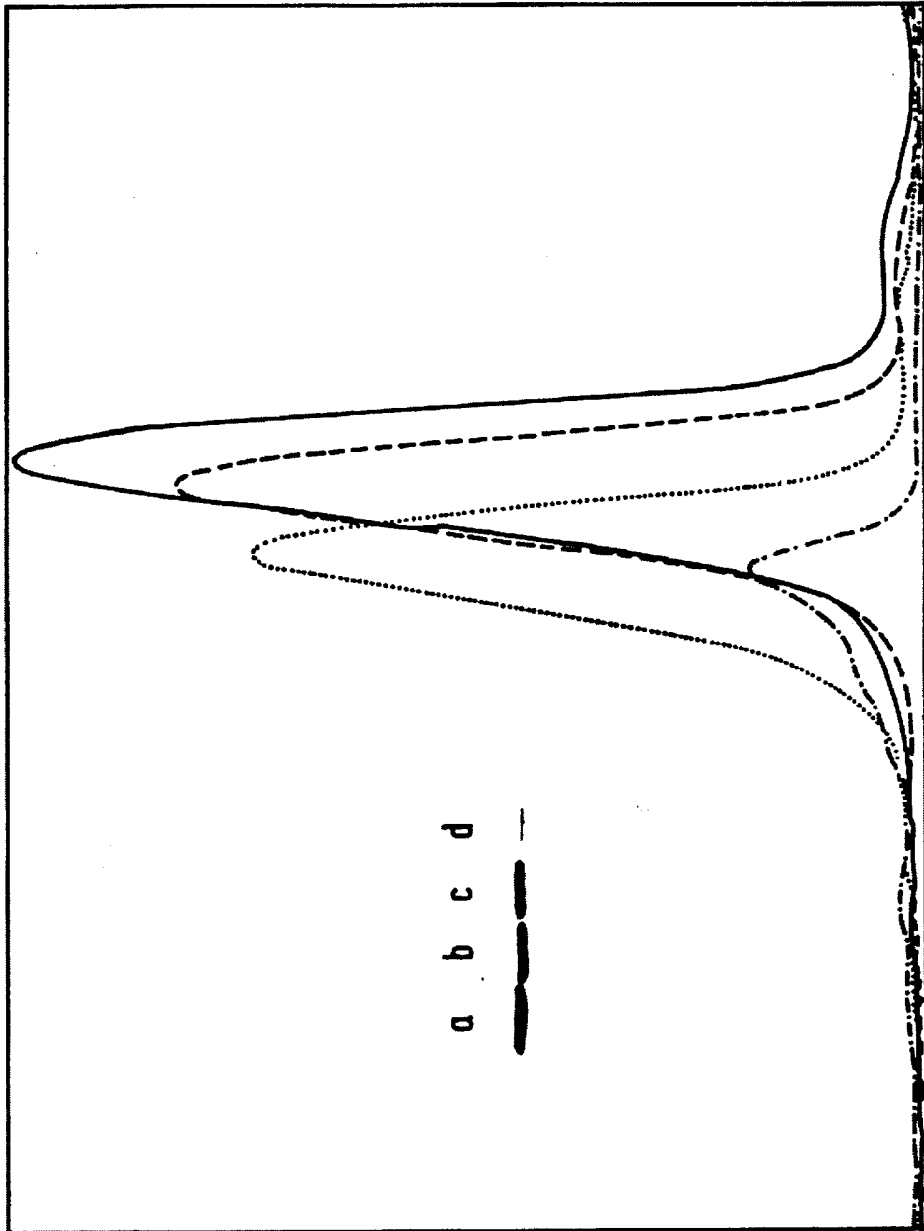


Obr.4



Obr.5





Obr.6

Konec dokumentu