

PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **28.01.2000**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **29.07.1999**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/364902**
(33) Země priority: **US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.06.2002**
(Věstník č. 6/2002)
(86) PCT číslo: **PCT/US00/02167**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/09390**

(21) Číslo dokumentu:

2002 - 365

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 Q 1/68
C 12 P 19/34
C 07 H 21/02
C 07 H 21/04

(71) Přihlašovatel:
GILEAD SCIENCES, INC., Foster City, CA, US;

(72) Původce:
Hicke Brian, Boulder, CO, US;
Warren Stephen, Boulder, CO, US;
Parma David, Boulder, CO, US;
Gold Larry, Boulder, CO, US;

(74) Zástupce:
Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
Nukleové kyseliny jako ligandy tenascinu-C

(57) Anotace:

Předkládané řešení se týká nukleových kyselin, které působí s vysokou afinitou jako ligandy tenascinu-C. Dále se řešení týká způsobu identifikace a přípravy vysokoafinitních ligandových nukleových kyselin k tenascinu-C. Dále se řešení týká ligandových nukleových kyselin k tenascinu-C s vysokou afinitou, RNA ligandů k tenascinu-C a oligonukleotidů obsahujících deriváty chemicky modifikované v poloze 2' purinů a pyrimidinů. Dále se řešení týká RNA ligandů k tenascinu-C, které obsahují modifikace skupinami 2'-F a 2'-OMe. Dále se řešení týká způsobů detekce nemoci v biologické tkáni, kde je exprimován tenascin-C.

29.01.02

PV 2002 - 365

4494

180 266/HK

- 1 -

Nukleové kyseliny jako ligandy tenascinu-C

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká nukleových kyselin, které působí s vysokou afinitou jako ligandy tenascinu-C. Dále se vynález týká způsobů identifikace a způsobů přípravy vysokoafinitních ligandových nukleových kyselin k tenascinu-C. Pro identifikaci takových nukleových kyselin byl použit způsob SELEX, což je akronym z termínu "Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment". Dále se vynález týká ligandových nukleových kyselin k tenascinu-C s vysokou afinitou, RNA ligandů k tenascinu-C a oligonukleotidů obsahujících deriváty chemicky modifikované v poloze 2' purinů a pyrimidinů. Dále se vynález týká RNA ligandů k tenascinu-C, které obsahují modifikace skupinami 2'-F a 2'-OMe. Oligonukleotidy podle vynálezu jsou užitečné jako diagnostická a/nebo terapeutická činidla.

Dosavadní stav techniky

Tenascin-C je hexamerní glykoprotein velikosti 1,1 až $1,5 \times 10^6$ (Da), lokalizovaný primárně v extracelulární matrix. Tenascin-C je exprimován během embryogenese, hojení poranění, a neoplázie, což vede k představě o tom, že tento protein hraje roli při přestavbě (remodelingu) tkání (Erickson and Bourdon (1989) Annu Rev Cell Biol 5:71-92). Proces neoplázie zahrnuje také přestavbu tkání, a tenascin-C je nadměrně exprimován v mnoha typech nádorů vč. např. karcinomu plic, prsu, prostaty, tlustého střeva, astrocytomů, glioblastomů,

melanomů a sarkomů (Soini et al. (1993) Am J Clin Pathol 100 (2):145-50; Koukoulis et al. (1991) Hum Pathol 22(7):636-43; Borsi et al. (1992) Int J Cancer 52(5):688-92; Koukoulis et al. (1993) J Submicrosc Cytol Pathol 25(2):285-95; Ibrahim et al. (1993) Hum Pathol 24(9):982-9; Riedl et al. (1998) Dis Colon Rectum 41(1):86-92; Tuominen and Kallioinen (1994) J Cutan Pathol 21(5):424-9; Natali et al. (1990) Int J Cancer 46(4):586-90; Zagzag et al. (1995) Cancer Res 55(4):907-14; Iiasegawa et al. (1997) Acta Neuropathol (Berl) 93(5):431-7; Saxon et al. (1997) Pediatr Pathol Lab Med 17(2):259-66; Hasegawa et al. (1995) Hum Pathol 26(8):38-45). Kromě toho je tenascin-C nadměrně exprimován při hyperproliferativních onemocněních kůže jak je např. psoriáza (lupénka) (Schalkwijk et al. (1991) Br J Dermatol 124(1):13-20) a v aterosklerotických lézích (Fukumoto et al. (1998) J Atheroscler Thromb 5(1):29-35; Wallner et al. (1999) Circulation 99(10):1284-9). Radioaktivně značené protilátky, které se váží na tenascin-C, jsou užívány pro zobrazování a terapii nádorů v klinické praxi (Paganelli et al. (1999) Eur J Nucl Med 26(4):348-57; Paganelli et al. (1994) Eur J Nucl Med 21(4):314-21; Bigner et al. (1998) J Clin Oncol 16(6):2202-12; Merlo et al. (1997) Int J Cancer 71(5):810-6).

Aptamery proti tenascin-C jsou potenciálně užitečné pro diagnostiku a terapii nádorů, aterosklerózy a psoriázy. Ve srovnání s protilátkami jsou aptamery malé molekuly, 7000 až 20000 (Da), clearance z krve je velmi rychlá, a lze je připravit chemickou syntézou. Velmi rychlá clearance z krve je důležitá pro in vivo diagnostické zobrazovací metody, kde hladiny v krvi jsou primárním faktorem určujícím pozadí rušící kvalitu zobrazení. Rychlá clearance z krve je důležitá i pro terapii, a sice tam, kde hladina v krvi přispívá k toxicitě.

Technologie SELEX dovoluje rychlou izolaci aptameru a chemická syntéza dovoluje snadnou a místně-specifickou konjugaci aptamerů s celou řadou inertních a bioaktivních molekul. Aptamer k tenascinu-C by proto byl užitečný pro terapii nádorů nebo pro in vivo a ex vivo diagnostické zobrazování a/nebo pro přenos různých terapeuticky účinných činidel v komplexu s ligandovou nukleovou kyselinou tenascinu-C pro léčení nemocí, při kterých je tenascin-C exprimován. Po mnoho let se udržovalo dogma, že nukleová kyselina má primárně informační roli. Metodou známou pod označením SELEX (systematický vývoj ligandů exponenciálním obohacováním, "Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) se objasnilo, že nukleové kyseliny mají diverzitu trojrozměrné struktury ne nepodobnou proteinům. Metoda SELEX je metoda pro in vitro vývoj molekul nukleové kyseliny, které se vysoce specificky váží na cílové molekuly, a byla popsána v patentové přihlášce USA č. 07/536.428. podané 11. června 1990, nazvané "Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment," nyní opuštěna, v patentu USA č. 5,475,096 nazvaném "Nucleic Acid Ligands," a patentu USA č. 5,270,163 (viz také WO 91/19813) nazvaném "Methods for Identifying Nucleic Acid Ligands," kteréžto dokumenty jsou vloženy formou odkazu. Každý z těchto patentových dokumentů, souhrnně zde nazývaných "patentové dokumenty SELEX" popisuje zásadně novu metodu přípravy nukleových kyselin jakožto ligandů pro požadované cílové molekuly. Metoda SELEX poskytuje třídu produktů, které jsou nazývány ligandové nukleové kyseliny neboli aptamery, z nichž každý má jedinečnou sekvenci a má vlastnost specificky se vázat na požadovanou cílovou sloučeninu nebo molekulu. Každá z ligandových nukleových kyselin identifikovaných metodou SELEX je specifickým ligandem požadované cílové sloučeniny nebo molekuly.

Metoda SELEX je založena na jedinečné myšlence, a sice, že nukleové kyseliny mají dostatečnou schopnost vytvářet různé dvoj- a trojrozměrné struktury a dostatečnou proměnlivost v rámci jejich monomerů k tomu, aby mohly působit jako ligandy (tj. vytvářet specifické vazebné páry) prakticky s jakoukoliv chemickou sloučeninou, monomerní nebo polymerní. Při metodě SELEX jsou cílové molekuly jakékoliv velikosti a jakéhokoliv složení. Metoda SELEX pro vysokoafinitní vazbu zahrnuje selekci ze směsi kandidátních oligonukleotidů a postupné opakování navázání, oddělení a amplifikace podle stejného obecného schématu, aby bylo dosaženo téměř jakéhokoliv požadovaného kritéria na afinitu a selektivitu vazby. Metoda SELEX vychází ze směsi nukleových kyselin, která výhodně obsahuje segment randomizované sekvence, a zahrnuje kroky, kdy se směs přivede do kontaktu s cílovou molekulou v podmínkách výhodných pro vazbu, nenavázané nukleové kyseliny se oddělí od nukleových kyselin, které se specificky navázaly na cílovou molekulu, komplexy cílová molekula-nukleová kyselina se disociují a nukleové kyseliny disociované z komplexů se amplifikují, čímž se vytvoří ligandy obohacená směs nukleových kyselin, a pak se opakují kroky navázání, oddělení, disociace a amplifikace v tolika cyklech, kolik jich je potřeba k získání vysoce specifické ligandové nukleové kyseliny vázající se na cílovou molekulu s vysokou afinitou.

Původci předkládaného vynálezu uznávají, že metoda SELEX ukázala, že nukleové kyseliny jakožto chemické sloučeniny mohou vytvářet velké spektrum tvarů, velikostí a konfigurací, a jsou schopné mnohem většího repertoáru vazeb a dalších funkcí, než jsou ty vazby a funkce, které projevují nukleové kyseliny v biologických systémech.

Základní metoda SELEX byla modifikována pro řadu specifických cílů. Tak např. patentová přihláška USA

č. 07/960,093, podaná 14. října 1992, nyní opuštěna, a patent USA č. 5,707,796, oba dokumenty s názvem "Method for Selecting Nucleic Acids on the Basis of Structure" popisují použití metody SELEX ve spojení s gelovou elektroforézou pro selekci molekul nukleové kyseliny se specifickými strukturními vlastnostmi, jako je např. "zahnutá" DNA.

Patentová přihláška USA č. 08/123,935, podaná 17. Září 1993, nazvaná "Photoselection of Nucleic Acid Ligands" nyní opuštěna, Patent USA č. 5,763,177, nazvaný "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Photoselection of Nucleic Acid Ligands and Solution SELEX" a patentová přihláška USA č. 09/093.293, podaná 8. června 1998, nazvaná "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Photoselection of Nucleic Acid Ligands and Solution SELEX" popisují metodu založenou na postupu SELEX pro selekci ligandových nukleových kyselin obsahujících fotoreaktivní skupiny schopné vazby a/nebo fotozesítní na a/nebo fotoinaktivaci cílové molekuly. Patent USA č. 5,580,737, nazvaný "High-Affinity Nucleic Acid Ligands That Discriminate Between Theophylline and Caffeine" popisuje způsob identifikace vysoce specifických ligandových nukleových kyselin schopných rozlišit mezi blízce příbuznými molekulami, které mohou být jiné než peptidové povahy, a tato metoda byla nazvána Counter-SELEX. Patent USA č. 5,567,588, nazvaný "Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment: Solution SELEX" popisuje metodu založenou na SELEX, která dosahuje vysoce účinného rozdělení oligonukleotidů majících vysokou a nízkou afinitu k cílové molekule.

Metoda SELEX zahrnuje identifikaci vysokoafinitních ligandových nukleových kyselin obsahujících modifikované nukleotidy, které poskytují např. zlepšenou stabilitu in vivo nebo zlepšené vlastnosti pro podávání. K příkladům takových

modifikací patří chemická substituce v poloze ribózy a/nebo fosfátu a/nebo báze. Ligandové nukleové kyseliny obsahující modifikované báze, které byly identifikovány metodou SELEX byly popsány v Patentu USA č. 5,660,985, nazvaném "High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides," kde jsou popsány oligonukleotidy obsahující nukleotidové deriváty chemicky modifikované v poloze 5- a 2'-pyrimidinů. Patent USA č. 5,580,737 zmíněný výše popisuje vysoce specifické ligandové nukleové kyseliny obsahující jeden nebo více nukleotidů modifikovaných 2'-aminoskupinou (2'-NH₂), 2'-fluoroskupinou (2'-F) a/nebo 2'-O-methylovou skupinou (2'-OMe). Patentová přihláška USA č. 08/264,029, podaná 22. června 1994, nazvaná "Novel Method of Preparation of Known and Novel 2' Modified Nucleosides by Intramolecular Nucleophilic Displacement," nyní opuštěna, popisuje oligonukleotidy obsahující různé 2'-modifikované pyrimidiny.

Metoda SELEX zahrnuje také kombinování vybraných oligonukleotidů s jinými vybranými oligonukleotidy a jinými než oligonukleotidovými funkčními skupinami, což bylo popsáno v Patentu USA č. 5,637,459, nazvaném "Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment: Chimeric SELEX," a Patentu USA č. 5,683,867, nazvaném "Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment: Blended SELEX,". Tyto metody umožňují kombinace širokého spektra tvarů a dalších vlastností, a účinných amplifikačních a replikačních vlastností oligonukleotidů s požadovanými vlastnostmi jiných molekul.

Metoda SELEX dále zahrnuje kombinaci vybraných ligandových nukleových kyselin s lipofilními sloučeninami nebo s neimunogenními vysokomolekulárními sloučeninami do diagnostických nebo terapeutických komplexů, jak bylo popsáno v patentové přihlášce USA č. 08/434,465, podané 4. května 1995, nazvané "Nucleic Acid Ligand Complexes".

Každý z výše zmíněných patentových dokumentů je v předkládané přihlášce celý zahrnut formou odkazu.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález popisuje způsob izolace ligandových nukleových kyselin, které se vysoce specificky váží na tenascin-C. Vynález dále popisuje ligandové nukleové kyseliny, tj. nukleové kyseliny působící jako ligandy, k tenascinu-C. Vynález dále popisuje vysokoafinitní RNA ligandy k tenascinu-C. Dále vynález popisuje RNA ligandy k tenascinu-C obsahující pyrimidiny modifikované 2'-fluoroskupinou (2'-F) a puriny modifikované 2'-O-methylovou skupinou (2'-OMe). Způsob užitý ve vynálezu pro identifikaci nukleových kyselin působících jako ligandy (ligandových nukleových kyselin) je zván SELEX, což je akronym ze "Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment" (Systematický vývoj ligandů exponenciálním obohacováním). Vynález zahrnuje také ligandy uvedené v tabulkách 3 a 4 a na obrázku 10.

Předkládaný vynález se dále týká způsobu detekce nemoci, při které je v biologické tkáni exprimován tenascin-C. Dále se týká způsobu detekce nádoru, který exprimuje tenascin-C, v biologické tkáni. Dále se vynález týká komplexů pro použití pro *in vivo* a *in vitro* diagnostiku. Dále se vynález týká komplexu pro použití k podávání léčivého přípravku k profylaxi nebo léčení nemocné tkáně exprimující tenascin-C.

Popis obrázků

Obr. 1 ukazuje vazbu SELEX RNA poolů na buňky U251.

Obr. 2 ukazuje předpokládanou sekundární strukturu aptamerů TTA1 a TTA1.NB. Na obrázku je znázorněna konjugace aptamerů s chelatačním činidlem Tc-99m. Všechny A byly 2'OMe-modifikované, všechny G, až na uvedené výjimky, byly 2'OMe-modifikované a všechny C a U byly 2'F-modifikované.

Obr. 3 ukazuje zobrazení xenotransplantátů nádorů U251 u myší získaných Tc-99m-značeným TTA1 a TTA1.NB, 3 hodiny po injekci.

Obr. 4 ukazuje fluorescenční mikroskopii řezu glioblastomu U251 3 hodiny po i.v. injekci Rhodamin-Red-X-značeného TTA1.

Obr. 5 ukazuje způsob, jakým je Tc-99m a linker navázán prostřednictvím 5'G TTA 1.

Obr. 6 popisuje příjem TTA1/GS7641 xenotransplantáty humánních nádorů u myší po 3 hodinách ve srovnání a příjmem kontrolního aptameru, který se neváže. ID/g = injikovaná dávka na gram.

Obr. 7 ukazuje biodistribuci In-111-značeného TTA1/GS7641 užitím buďto DOTA nebo DTPA jako chelatačního činidla radioaktivního kovu, 3 hodiny po injekci. ID/g = injikovaná dávka na gram.

Obr. 8 ukazuje konjugaci aptameru s DTPA. ¹¹¹In je ukázáno jako chelatované DTPA.

Obr. 9 ukazuje konjugaci aptameru s DOTA. ¹¹¹In je ukázáno jako chelatované DTPA.

Obr. 10 ukazuje předpokládanou sekundární strukturu aptameru TTA1. Na obrázku je také konjugace aptameru s chelatačním činidlem Tc-99m. Aptamer je ukázán ve formě Tc-99m-značeného aptameru. Všechny A byly 2'OMe-modifikované, všechny G, až na uvedené výjimky, byly 2'OMe-modifikované a všechny C a U byly 2'F-modifikované.

Popis výhodných provedení vynálezu

Základní metodou použitou pro identifikaci nukleových kyselin působících jako ligandy k tenascinu-C (ligandových nukleových kyselin) byla metoda SELEX ("Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment"), která zahrnuje kroky, kdy: (a) kandidátní směs nukleových kyselin se přivede do kontaktu s tenascinem-C (b) členy kandidátní směsi se rozdělí na základě afinity k tenascinu-C, a c) selektované molekuly se amplifikují, čímž vznikne směs obohacená sekvencemi nukleových kyselin s relativně vysokou afinitou vazby k tenascinu-C.

Vynález zahrnuje také ligandové RNA (tj. RNA působící jako ligandy) k tenascinu-C. Vynález zahrnuje také specifické ligandy uvedené v tabulkách 3 a 4 a na obrázku 10.

Předkládaný vynález zahrnuje také sekvence nukleových kyselin, které jsou v podstatě homologní s a taktéž mají v podstatě stejnou schopnost vázat tenascin-C jako specifické ligandové nukleové kyseliny uvedené v tabulkách 3 a 4 a na obr. 10. Termínem v podstatě homologní se míní míra homologie primární sekvence vyšší než 70 %, výhodněji vyšší než 80 %, a nejvýhodněji vyšší než 90 %, 95 % nebo 99 %. Procenta homologie zde uváděná jsou vypočtena jako procenta nukleotidů nalezených v kratší ze dvou sekvencí shodujících se s odpovídajícím nukleotidem srovnávané sekvence, přičemž 1

mezera může být vnesena na délku 10 nukleotidů, aby se napomohlo přiřazení sekvencí. V podstatě stejná schopnost vázat tenascin-C znamená, že afinita je v rámci 1 až dvou řádů shodná s afinitou ligandů zde uvedených. Je zcela v kompetenci odborníka určit, zda dané sekvence, která je v podstatě homologní se sekvencemi zde popsanými, má také stejnou schopnost vázat tenascin-C.

Přehled sekvenčních homologií ligandových nukleových kyselin uvedených v tab. 3 a 4 a na obr. 10 ukazuje, že sekvence s malou nebo žádnou primární homologií mohou mít v podstatě stejnou schopnost vázat tenascin-C. Z tohoto důvodu předkládaný vynález zahrnuje také ligandové nukleové kyseliny, které mají v podstatě stejné předpokládané struktury nebo strukturní motivy a schopnost vázat tenascin-C jako ligandové nukleové kyseliny uvedené v tab. 3 a 4 a na obr. 10. V podstatě stejné předpokládané struktury nebo strukturní motivy lze postulovat na základě přiřazení sekvencí ("sequence alignment") pomocí programu Zukerfold (viz Zuker (1989) Science 244:48-52). Jak je odborníkům dostatečně známo, také jiné počítačové programy mohou být použity k predikci sekundární struktury a strukturních motivů. V podstatě stejná struktura nebo strukturní motivy ligandových nukleových kyselin v roztoku nebo jako vázaných struktur může být postulována pomocí NMR nebo i jiné metody, což je odborníkům známo.

Dále se předkládaný vynález týká způsobu detekce nemoci, při které je exprimován tenascin-C v biologické tkáni, která může tenascin-C obsahovat, kdy se a) identifikuje ligandová nukleová kyselina z kandidátní směsi nukleových kyselin, přičemž nukleová kyselina je ligandem tenascinu-C, a sice způsobem, kdy i) kandidátní směs nukleových kyselin se přivede do kontaktu s tenascinem-C, přičemž nukleová kyselina mající

zvýšenou afinitu k tenascinu-C ve srovnání se zbytkem kandidátní směsi může být oddělena od zbytku kandidátní směsi, II) nukleové kyseliny se zvýšenou afinitou se oddělí od zbytku kandidátní směsi, III) nukleové kyseliny se zvýšenou afinitou se amplifikují, čímž se připraví směs nukleových kyselin s relativně vysokou afinitou a specifitou k tenascinu-C, čímž je identifikována ligandová nukleová kyselina k tenascinu-C, b) na ligandovou nukleovou kyselinu identifikovanou v kroku III se naváže marker, který se může použít pro in vivo nebo ex vivo diagnostiku, c) tkáň, která by mohla obsahovat nemoc, se vystaví působení komplexu ligandové nukleové kyseliny s markerem a d) detekuje se přítomnost komplexu ligandové nukleové kyseliny s markerem ve tkáni, čímž se identifikuje nemoc exprimující tenascin-C.

Předkládaný vynález dále poskytuje komplex pro použití pro in vivo nebo ex vivo diagnostiku, který obsahuje jednu nebo více nukleových kyselin působících jako ligand k tenascinu-C (ligandových nukleových kyselin) a jeden nebo více markerů.

Dále se vynález týká způsobu podávání terapeutických činidel k profylaxi nebo léčení nemocí, při kterých je exprimován tenascin-C.

Definice

Předkládaný vynález je popisován pomocí různých specifických termínů. Aby bylo usnadněno porozumění popisu, termíny jsou definovány následovně:

Termín "ligandová nukleová kyselina" je nukleová kyselina, která se nevyskytuje v přírodě a která působí požadovaným účinkem na cílovou molekulu. Ligandové nukleové kyseliny se označují jako "aptamery". Cílovou molekulou je

podle předkládaného vynálezu tenascin-C, což vyjadřuje termín ligandová nukleová kyselina tenascinu-C. Požadovaný účinkem se, kromě jiného, rozumí vazba s cílovou molekulou, katalytické působení na cílovou molekulu, reakce s cílovou molekulou způsobem, který modifikuje/mění cílovou molekulu nebo její funkční aktivity, kovalentní navázání na cílovou molekulu jako je tomu např. u "sebevražedných" inhibitorů, a nebo usnadnění reakce cílové molekuly s jinou molekulou. Ve výhodném provedení vynálezu je požadovaným účinkem specifická vazebná afinita k cílové molekule, kdy cílová molekula je trojrozměrná chemická struktura jiná než polynukleotid, která se váže na ligandovou nukleovou kyselinu mechanismem, který je zejména závislý na Watson/Crickově principu párování bází nebo na trojšroubovicové vazbě, přičemž ligandová nukleová kyselina není nukleová kyselina, jejíž známá fyziologická funkce by byla vázat se na cílovou molekulu. Ligandová nukleová kyselina je identifikována z kandidátní směsi nukleových kyselin, přičemž působí jako ligand tenascinu-C, následujícím způsobem: a) kandidátní směs nukleových kyselin se přivede do kontaktu s tenascinem-C, přičemž nukleové kyseliny mající zvýšenou afinitu k tenascinu-C mohou být odděleny od zbytku kandidátní směsi, b) nukleové kyseliny mající zvýšenou afinitu k tenascinu-C se oddělí od zbytku kandidátní směsi a c) selektované molekuly nukleové kyseliny se amplifikují, čímž vznikne směs obohacená ligandovými nukleovými kyselinami (viz patentová přihláška USA č. 081434,425, podaná 3. května 1995, nyní Patent USA č. 5.789,157, zahrnut formou odkazu).

Termín "kandidátní směs" označuje směs nukleových kyselin s různými sekvencemi, ze kterých se vybírá ligand (tj. ligandová nukleová kyselina). Zdrojem kandidátní směsi mohou být přirozeně se vyskytující nukleové kyseliny nebo jejich fragmenty, chemicky syntetizované nukleové kyseliny

nebo nukleové kyseliny připravené kombinací uvedených způsobů. Ve výhodném provedení má každá nukleová kyselina fixní sekvenci obklopenou randomizovaným úsekem pro usnadnění amplifikace.

Termín "nukleová kyselina" znamená DNA, RNA, a to jednořetězcové nebo dvojřetězcové formy, a jakékoliv jejich modifikace. K modifikacím patří kromě jiného modifikace, které poskytují další chemické skupiny nesoucí dodatečný náboj, polarizovatelnost, vodíkové vazby, elektrostatické interakce a fluxionalitu bází ligandové nukleové kyseliny nebo celé ligandové nukleové kyseliny. K modifikacím patří, aniž by výčet byl omezující, modifikace sacharidu v poloze 2', modifikace pyrimidinu v poloze 5, modifikace purinu v poloze 8, modifikace exocylických aminových skupin, substituce 4-thiouridinu, substituce 5-brom- nebo joduracilu, modifikace kostry, methylace, neobvyklé kombinace párování bází jako např. isobáze isocytidin a isoguanidin apod. K modifikacím patří také modifikace 3'- a 5'- konců jako je např. opatření čepičkou ("capping").

Metoda "SELEX" je postup zahrnující kombinaci selekce ligandových nukleových kyselin, které interagují požadovaným způsobem s cílovou molekulou, např. vazbou na protein, s amplifikací takto vybraných molekul. Případné opakované cykly těchto kroků selekce/amplifikace umožňují vybrat z původního poolu (souboru) obsahujícího velký počet nukleových kyselin nakonec jednu nebo jen malý počet molekul, které interagují s cílovou molekulou velmi silně. Opakování cyklů selekce/amplifikace pokračuje do té doby, dokud není dosaženo požadovaného cíle. V předkládaném vynálezu se metoda SELEX užila k získání ligandové nukleové kyseliny k tenascinu-C.

Metoda SELEX je podrobně popsána ve výše uvedených patentových dokumentech SELEX.

Termín "SELEX cíl" nebo "cíl" znamená jakoukoliv sloučeninu nebo molekulu, pro kterou je požadován ligand. Cílem může být protein, peptid, sacharid, polysacharid, glykoprotein, hormon, receptor, antigen, protilátka, virus, substrát, metabolit, analog v přechodném stavu, kofaktor, inhibitor, léčivo, barvivo, živina, růstový faktor apod., bez jakéhokoliv omezení. V předkládané přihlášce vynález je cílem, resp. cílovou molekulou tenascin-C.

Termín "komplex" označuje molekulární entitu vytvořenou kovalentními vazbami jedné nebo několika ligandových nukleových kyselin tenascin-C s jedním nebo několika markery. V některých provedeních předkládaného vynálezu je komplex znázorněn jako A-B-Y, kde A je marker, B je volitelná část, např. linker a Y je ligandová nukleová kyselina tenascin-C.

Termín "marker" označuje molekulární entitu, které je-li komplexována s ligandovou nukleovou kyselinou tenascin-C, buďto přímo nebo nepřímo prostřednictvím linkeru (linkerů) nebo spaceru (spacerů) umožňuje detekci komplexu v podmínkách in vivo nebo ex vivo vizuálně nebo chemickými prostředky. K příkladům markerů patří, avšak výčet není omezující, radionuklidy jako je Tc-99m, Re-188, Cu-64, Cu-67, F-18, ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{32}P , ^{186}Re , všechny fluorofory jako je fluorescein, rhodamin, Texas červen, deriváty fluoroforů jako je např. Rhodamin-červen-X, magnetické sloučeniny, a také biotin.

"Linker" je molekulární entita, která spojuje dvě (nebo více) jiné molekulární entity prostřednictvím kovalentních vazeb nebo nekovalentních interakcí, a může umožnit prostorové oddělení molekulárních entit takovým způsobem, který zachovává funkční vlastnosti jedné nebo obou molekulárních entit. Linker je někdy označován termínem spacer. K neomezujícím

příkladem linkerů patří $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_6$ a hexylaminové struktury ukázané na obr. 2.

"Therapeutický" se v popisu vynálezu užívá ve smyslu léčivý a/nebo profylaktický. Tento termín se užívá ve vztahu k člověku nebo zvířatům.

Termín "kovalentní vazba" označuje chemickou vazbu vytvořenou sdílenými elektrony.

"Nekovalentní interakce" označují to, že molekulární entity jsou drženy pohromadě interakcemi jinými než jsou kovalentní vazby, např. iontovými interakcemi nebo vodíkovými vazbami.

Ve výhodném provedení vynálezu je ligandová nukleová kyselina podle předkládaného vynálezu získána metodou SELEX, která byla popsána v patentové přihlášce USA č. 07/536,428 podané 11. června 1990, nazvané "Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment," nyní opuštěna, v patentu USA č. 5,475,096 nazvaném "Nucleic Acid Ligands," a patentu USA č. 5,270,163 (viz také WO 91/19813) nazvaném "Methods for Identifying Nucleic Acid Ligands". Tyto dokumenty jsou vloženy formou odkazu souhrnně jsou zde označovány jako "patentové dokumenty SELEX".

Metoda SELEX poskytuje třídu produktů, které jsou ligandové nukleové kyseliny, z nichž každá má jedinečnou sekvenci a má vlastnost specificky se vázat na požadovanou cílovou sloučeninu nebo molekulu. Cílové molekuly jsou výhodně proteiny, ale mohou to být sacharidy, peptidoglykany a různé malé molekuly, přičemž tento výčet není omezující. Metodu SELEX lze užít také k zacílení na biologické struktury jako je buněčný povrch nebo virus, a to prostřednictvím specifické interakce s molekulou, která je integrální součástí takové biologické struktury.

V nejzákladnější podobě je metoda SELEX definována následujícími kroky:

- 1) připraví se kandidátní směs nukleových kyselin různých sekvencí. Kandidátní směs obecně obsahuje úseky fixních sekvencí (tj. každý člen kandidátní směsi obsahuje stejné sekvence na stejném místě) a úseky randomizovaných (náhodných) sekvencí. Úseky fixních sekvencí jsou vybrány proto, aby se a) buďto napomohlo amplifikačním krokům popsaným výše nebo b) napodobila sekvence, o které je známo, že se váže na cíl, nebo c) aby se zvýšila koncentrace daného strukturního uspořádání nukleových kyselin v kandidátní směsi. Randomizovaná sekvence mohou být buďto plně randomizované (tj. pravděpodobnost nalezení báze v jakékoliv poloze je $1/4$) nebo částečně randomizovaná (tj. pravděpodobnost nalezení báze v jakékoliv poloze může být vybrána z jakékoliv hladiny mezi 0 a 100 %).
- 2) Kandidátní směs se přivede do kontaktu s vybraným cílem v podmínkách, které jsou výhodné pro vazbu cíle a členů kandidátní směsi. Za těchto podmínek spočívá interakce mezi cílem a nukleovými kyselinami kandidátní směsi ve vytváření párů nukleová kyselina - cíl mezi cílovou molekulou a těmi nukleovými kyselinami, které mají nejvyšší afinitu k cílové molekule.
- 3) Nukleová kyselina s nejvyšší afinitou pro cíl je oddělena od nukleových kyselin s menší afinitou. Jelikož v kandidátní směsi existuje jen mimořádně malý počet sekvencí (případně jen jediná molekula nukleové kyseliny) odpovídajících molekule s nejvyšší afinitou, je obecně potřebné stanovit selekční kritéria, tak aby významné množství (přibližně 5 - 50 %) nukleových kyselin zůstalo zachyceno v průběhu oddělování.

- 4) Nukleové kyseliny vybrané v průběhu oddělování pro relativně vysokou afinitu k cíli jsou pak amplifikována, čímž se vytvoří nová kandidátní směs, která je obohacena o nukleové kyseliny mající relativně vysokou afinitu k cíli.
- 5) Opakováním kroků oddělení a amplifikace výše popsaných nově vytvořená kandidátní směs obsahuje stále méně a méně jedinečných sekvencí a průměrná afinita nukleové kyseliny k cíli obecně roste. V extrémním případě by nakonec metoda SELEX poskytla kandidátní směs, obsahovala jednu nebo jen velmi malý počet jedinečných sekvencí, které představují sekvenční nukleových kyselin z původní kandidátní směsi, které mají nejvyšší afinitu k cílové molekule.

Základní metoda SELEX byla modifikována pro dosažení řady specifických cílů. Tak např. patentová přihláška USA č. 07/960,093, podaná 14. října 1992, nyní opuštěna, a patent USA č. 5,707,796, oba dokumenty s názvem "Method for Selecting Nucleic Acids on the Basis of Structure" popisují použití metody SELEX ve spojení s gelovou elektroforézou pro selekci molekul nukleové kyseliny se specifickými strukturními vlastnostmi, jako je např. "zahnutá" DNA. Patentová přihláška USA č. 08/123,935, podaná 17. Září 1993, nazvaná "Photoselection of Nucleic Acid Ligands" nyní opuštěna, Patent USA č. 5,763,177, nazvaný "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Photoselection of Nucleic Acid Ligands and Solution SELEX" a patentová přihláška USA č. 09/093,293, podaná 8. června 1998, nazvaná "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Photoselection of Nucleic Acid Ligands and Solution SELEX" popisují metodu založenou na postupu SELEX pro selekci ligandových nukleových kyselin obsahujících fotoreaktivní skupiny schopné vazby a/nebo zesíťení účinkem světla ("photocrosslinking") na a/nebo fotoinaktivaci cílové molekuly. Patent USA č. 5,580,737,

nazvaný "High-Affinity Nucleic Acid Ligands That Discriminate Between Theophylline and Caffeine" popisuje způsob identifikace vysoce specifických ligandových nukleových kyselin schopných rozlišit mezi blízce příbuznými molekulami, které mohou být jiné než peptidové povahy, a tato metoda byla nazvána Counter-SELEX. Patent USA č. 5,567,588, nazvaný "Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment: Solution SELEX," popisuje metodu založenou na SELEX, která dosahuje vysoce účinného rozdělení oligonukleotidů majících vysokou a nízkou afinitu k cílové molekule. Patent USA č. 5,496,938, nazvaný "Nucleic Acid Ligands to HIV-RT and HIV-1 Rev," popisuje metodu získání zlepšených ligandových nukleových kyselin po provedení metody SELEX. Patent USA č. 5,705,337 nazvaný "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Chemi-SELEX" popisuje metodu kovalentního navázání ligandu na cíl.

Metoda SELEX zahrnuje identifikaci vysokoafinitních ligandových nukleových kyselin obsahujících modifikované nukleotidy, které poskytují zlepšené vlastnosti ligandu, např. zlepšenou stabilitu in vivo nebo zlepšené vlastnosti pro podávání. K příkladům takových modifikací patří chemická substituce v poloze ribózy a/nebo fosfátu a/nebo báze. Ligandové nukleové kyseliny obsahující modifikované nukleotidy, které byly identifikovány metodou SELEX, byly popsány v Patentu USA č. 5,660,985, nazvaném "High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides", kde jsou popsány oligonukleotidy obsahující nukleotidové deriváty chemicky modifikované v poloze 5- a 2'- pyrimidinů. Patent USA č. 5,580,737 zmíněný výše popisuje vysoce specifické ligandové nukleové kyseliny obsahující jeden nebo více nukleotidů modifikovaných 2'-aminoskupinou (2'-NH₂), 2'-fluoroskupinou (2'-F) a/nebo 2'-O-methylovou skupinou (2'-OMe). Patentová

příhláška USA č. 08/264,029, podaná 22. června 1994, nazvaná "Novel Method of Preparation of Known and Novel 2' Modified Nucleosides by Intramolecular Nucleophilic Displacement", nyní opuštěna, popisuje oligonukleotidy obsahující různé 2'-modifikované pyrimidiny.

Metoda SELEX zahrnuje také kombinování vybraných oligonukleotidů s jinými vybranými oligonukleotidy a jinými funkčními skupinami, které nejsou oligonukleotidy, což bylo popsáno v Patentu USA č. 5,637,459, nazvaném "Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment: Chimeric SELEX" a Patentu USA č. 5,683,867, nazvaném "Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment: Blended SELEX". Tyto metody umožňují kombinace širokého spektra tvarů a dalších vlastností, a účinných amplifikačních a replikačních vlastností oligonukleotidů s požadovanými vlastnostmi jiných molekul.

V Patentu USA č. 5,496,938 je popsána metoda získání zlepšených ligandových nukleových kyselin po té, co byl proveden postup SELEX. Tento patent nazvaný "Nucleic Acid Ligands to HIV-RT and HIV-1 Rev," je specificky zahrnut formou odkazu.

Patentová příhláška USA č. 08/434,425, nazvaná "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Tissue SELEX," podaná 3. Května 1995, nyní již Patent USA č. 5,789,157, popisuje metodu identifikace ligandových nukleových kyselin pro makromolekulární komponenty tkání, včetně nádorových buněk, a také tímto způsobem identifikované ligandy. Tento patent je specificky zahrnut formou odkazu.

Jedním potenciálním problémem při terapeutickém nebo diagnostickém využití nukleových kyselin je to, že oligonukleotidy v jejich fosfodiesterové formě mohou být snadno degradovány v tělních tekutinách působením

intracelulárních a extracelulárních jako jsou např. endonukleázy a exonukleázy, ještě před tím, než se projeví požadovaný účinek. Určité chemické modifikace ligandových nukleových kyselin lze realizovat s cílem, aby se zvýšila *in vivo* stabilita nukleových kyselin nebo aby se zlepšil či zprostředkoval přenos ligandové nukleové kyseliny do organismu (viz např. patentová přihláška USA č. 08/117,991, podaná 8. září 1993, nyní opuštěna, a Patent USA č. 5,660,985, oba dokumenty s názvem "High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides", zahrnuté formou odkazu).

K modifikacím ligandových nukleových kyselin podle vynálezu patří, aniž by výčet byl omezující, takové modifikace, které poskytují další chemické skupiny nesoucí dodatečný náboj, polarizovatelnost, vodíkové vazby, elektrostatické interakce a fluxionalitu bází ligandové nukleové kyseliny nebo celé ligandové nukleové kyseliny. K modifikacím patří, aniž by výčet byl omezující, modifikace sacharidu v poloze 2', modifikace pyrimidinu v poloze 5, modifikace purinu v poloze 8, modifikace exocylických aminových skupin, substituce 4-thiouridinu, substituce 5-brom- nebo joduracilu, modifikace kostry, methylace, neobvyklé kombinace párování bází jako např. isobáze isocytidin a isoguanidin apod. K modifikacím patří také modifikace 3'- a 5'-konců jako je např. opatření čepičkou ("capping"). Ve výhodném provedení vynálezu jsou ligandové nukleové kyseliny molekuly RNA, které jsou modifikované 2'-fluoroskupinou (2'F) na sacharidové části pyrimidinového zbytku.

Modifikace mohou být provedeny buďto před (pre-SELEX) nebo po provedení postupu SELEX (post-SELEX). Pre-SELEX modifikace poskytují ligandové nukleové kyseliny jak se specifitou pro cíl tak zlepšenou *in vivo* stabilitou. Post-SELEX modifikace provedené na 2'-OH ligandové nukleové kyseliny vedou ke

zlepšené in vivo stability ani by uškodily vazebné schopnosti ligandové nukleové kyseliny.

Další typy modifikací jsou odborníkům známy. Takové modifikace mohou být provedeny jako post-SELEX modifikace (modifikace dříve identifikovaného ligandu) nebo v průběhu procesu SELEX.

Ligandy podle předkládaného vynálezu byly připraveny metodou SELEX, která je podrobně popsána ve výše citovaných patentových dokumentech SELEX.

Tenascin-C aptamery podle předkládaného vynálezu se váží na heparinové vazebné místo COOH konce tenascinu-C.

V některých provedeních vynálezu jsou ligandové nukleové kyseliny k tenascinu-C užitečné pro diagnostické účely ke zobrazování patologických stavů (např. zobrazovací metody při diagnostice nádorů). Kromě toho ligandové nukleové kyseliny k tenascinu-C mohou být užitečné pro prognózy a monitorování nemocí, při kterých je exprimován tenascin-C.

Diagnostická činidla musí dovolit identifikovat přítomnost daného cíle v konkrétním místě nebo určité koncentraci. Jednoduše schopnost vytvářet vazebné páry s cílem může být dostatečná pro vznik pozitivního signálu vhodného pro diagnostické účely. Odborník je snadno schopen adaptovat jakoukoliv ligandovou nukleovou kyselinu pro tenascin-C pomocí markeru tak, aby byl schopen sledovat přítomnost ligandové nukleové kyseliny. Takové marker aby se mohly využít v celé řadě diagnostických aplikací, např. pro detekci primárních nádorů a metastáz nebo pro detekci aterosklerotických lézí. K příkladům značících markerů patří Tc-99m a ^{111}In , ale lze užít i řadu jiných markerů jako např. další radionuklidy, magnetické sloučeniny, fluorofory nebo biotin, které mohou být konjugovány s ligandovou nukleovou kyselinou tenascinu-C pro využití při zobrazování v podmínkách in vivo nebo ex vivo při

diagnostice nemocí, kdy je exprimován tenascin-C (např. rakovina, ateroskleróza nebo psoriáza). Marker může být kovalentně vázán v různých polohách ligandové nukleové kyseliny tenascinu-C, např. na exocyklickou aminoskupinu báze, v 5-pozici pyrimidinového nukleotidu, v 8-pozici purinového nukleotidu, na hydroxylovou skupinu fosfátu nebo hydroxylovou skupinu nebo jiné skupiny na 5'- nebo 3'-konci ligandové nukleové kyseliny tenascinu-C.

V provedeních vynálezu, kde marker je technecium-99m nebo ^{111}In , je marker vázán na 5'- nebo 3'-hydroxylovou skupinu fosfátu nebo v 5-poloze modifikovaného pyrimidinu. V nejvýhodnějším provedení je marker vázán na 5'-hydroxylovou skupinu fosfátové skupiny ligandové nukleové kyseliny s linkerem nebo bez linkeru. V jiném provedení vynálezu je marker konjugován s ligandovou nukleovou kyselinou tím, že je do nukleové kyseliny inkorporován pyrimidin obsahující primární amin v poloze 5 a tento amin je pak využit pro konjugaci markeru. Navázání markeru může být provedeno přímo nebo pomocí linkeru. V provedeních vynálezu, kde je užito jako marker technecium-99m nebo ^{111}In , je výhodný hexylaminový linkerem, jak je ukázáno na obr. 10.

V dalších provedeních vynálezu jsou ligandové nukleové kyseliny tenascinu-C užitečné k podávání terapeutických sloučenin (např. cytotoxických sloučenin, látek zvyšujících imunitu, terapeutických radionuklidů, avšak tento výčet není omezující) do tkání nebo orgánů exprimujících tenascin-C. K nemocem, při kterých je exprimován tenascin-C, patří (avšak výčet není omezující) rakovina, ateroskleróza a psoriáza (lupénka). Odborník snadno adaptuje jakoukoliv ligandovou nukleovou kyselinu známým postupem tak, aby vytvořila komplex s terapeutickým činidlem. Terapeutická sloučenina může být kovalentně vázána v různých polohách ligandové nukleové

kyseliny tenascinu-C, např. na exocyklickou aminoskupinu báze, v 5-pozici pyrimidinového nukleotidu, v 8-pozici purinového nukleotidu, na hydroxylovou skupinu fosfátu nebo hydroxylovou skupinu nebo jiné skupiny na 5'- nebo 3'-konci ligandové nukleové kyseliny tenascinu-C. Ve výhodném provedení vynálezu je terapeutické činidlo vázáno na 5'-aminoskupinu ligandové nukleové kyseliny. Navázání terapeutického činidla může být přímé nebo prostřednictvím linkeru. V provedeních vynálezu, kde cílovou nemocí je rakovina, lze inkorporovat 5-fluordeoxyuracil nebo jiný nukleotidový analog známý jako účinné protinádorové činidlo, interně do existujících U v ligandové nukleové kyselině tenascinu-C nebo může být přidán interně nebo konjugován s kterýmkoliv z konců nukleové kyseliny buďto přímo nebo prostřednictvím linkeru. Kromě toho mohou být inkorporovány jak pyrimidinový analog 2'2'-difluorcytidin tak i purinový analog deoxycoformycin. Patentová přihláška USA č. 08/993,765 podaná 18.prosince 1997, zahrnutá formou odkazu, popisuje kromě jiného předléčiva založená na nukleotidech obsahující ligandové nukleové kyseliny namířené proti nádorům, např. proti tenascinu-C, pro přesnou lokalizaci látek užívaných pro zvýšení vnímavosti k chemoradioterapii, radioaterapii nebo lokalizaci radionuklidových léčivých přípravků v nádoru.

Podle vynálezu může být asociován s ligandovou nukleovou kyselinou jak marker tak i terapeutické činidlo, takže podávání terapeutického činidla i detekce jsou uskutečněny společně pomocí jednoho aptameru nebo pomocí směsi dvou nebo více modifikovaných verzí téhož aptameru. Ve smyslu vynálezu také může být marker a/nebo terapeutické činidlo asociovány s neimunogenní vysokomolekulární sloučeninou nebo lipofilní sloučeninou jako je např. Liposom. Metody pro konjugaci ligandových nukleových kyselin s liposomy a vytváření

diagnostických nebo terapeutický komplexů bylo popsáno v patentové přihlášce USA č. 08/434,465, podané 4. května 1995, nazvané "Nucleic Acid Ligand Complexes", která je zahrnuta formou odkazu.

Terapeutické nebo diagnostické přípravky podle předkládaného vynálezu mohou být podávány parenterálně injekcí (např. intravenózní, subkutánní, intradermální nebo do léze), i když jsou možné i jiné formy podávání jako je např. intraartikulární injekce, inhalace mlhy, orálně účinné přípravky, transdermální iontoforéza nebo čípky. Přípravky podle vynálezu mohou být také podávány lokálně přímou injekcí nebo uvolňováním z terapeutického systému, jako jsou implantované stenty nebo katetry, nebo podáván přímo na místo infúzní pumpou. Výhodným farmaceutickým nosičem je solný roztok, resp. fyziologický roztok, avšak ve smyslu vynálezu lze užít i jiné známé farmaceuticky přijatelné nosiče. V jednom provedení vynálezu tvoří komplex nosiče a ligandové nukleové kyseliny tenascinu-C fyziologicky kompatibilní formu s pomalým uvolňováním léčiva. Primární rozpouštědlo v takovém nosiči je vodné nebo nevodné povahy. Navíc nosič může obsahovat ještě další farmakologicky přijatelně excipienty, které udržují nebo modifikují pH, osmolaritu, viskozitu, průzračnost, barvu, sterilitu, stabilitu, rychlost rozpouštění nebo vůni přípravku. Nosič může obsahovat ještě další farmaceuticky přijatelné excipienty modifikující nebo udržující stabilitu, rychlost rozpouštění, rychlost uvolňování nebo absorpci ligandové nukleové kyseliny tenascinu-C. k těmto excipientům patří látky běžně využívané pro formulaci léků pro parenterální podávání v jednotkové nebo násobné lékové formě.

Jakmile byl přípravek formulován, může být skladován ve sterilních nádobkách jako roztok, suspenze, gel, emulze, pevná látka nebo dehydrovaný nebo lyofilizovaný prášek. Takové

přípravky lze skladovat ve formě připravené k použití nebo ve formě, která vyžaduje rekonstituci bezprostředně před použitím. Způsob podávání přípravku obsahující ligandovou nukleovou kyselinu tenascinu-C určeného pro systémové podávání je např. subkutánní, intramuskulární, intravenózní, intraarteriální nebo intranazální nebo formou vaginálních nebo rektálních čípků.

Následující příklady slouží k vysvětlení a ilustraci předkládaného vynálezu a rozsah vynálezu nijak neomezuje. Příklad 1 popisuje materiály a experimentální postupy použité v příkladu 2 pro přípravu RNA ligandů k tenascinu-C. příklad 2 popisuje RNA ligandy tenascinu-C a predikovanou sekundární strukturu selektovaných ligandových nukleových kyselin. Příklad 3 popisuje stanovení minimální velikosti nezbytné pro vysokoafinitní vazbu selektovaných ligandových nukleových kyselin a substituci 2'-OH purinů 2'-OMe puriny. Příklad 4 popisuje biodistribuci Tc-99m-značených ligandových nukleových kyselin tenascinu-C u myší s nádory. Příklad 5 popisuje použití fluorescenčně značených ligandových nukleových kyselin tenascinu-C pro lokalizaci tenascinu-C ve tkáni nádorů. Příklad 6 popisuje detekci nádorů in vivo pomocí aptameru TTA1 (znám také pod označením GS7641). Příklad 7 popisuje alternativní značení pomocí ^{111}In .

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Užití metody SELEX k získání ligandových nukleových kyselin tenascinu-C a glioblastomových buněk U251

Materiály a metody

Tenascin-C byl zakoupen od firmy Chemicon (Temecula, CA). Jednořetězcové DNA primery a templáty byly syntetizovány firmou Operon Technologies Inc. (Alameda, CA).

Metoda SELEX byla podrobně popsána v patentové dokumentaci SELEX uvedené v předchozí části přihlášky.

Ve stručnosti: dvojřetězcové transkripční templáty byly připraveny extenzí užitím Klenowova fragmentu ssDNA 40N7a:

5'-TCGCGCGAGTCGTCTG{40N}CCGCATCGTCCTCCC-3' (SEKVENCE ID. Č. 1)
užitím primeru SN7:

5'-TAATACGACTCACTATAGGGGAGGACGATGCGG-3' (SEKVENCE ID. Č. 2),
který obsahuje promotor T7 polymerázy (podtržen). RNA byla připravena pomocí T7 RNA polymerázy postupem, který popsali Fitzwater a Polisky (1996) Methods Enzymol. 267: 275-301 (publikace je zahrnuta formou odkazu). Všechny transkripční reakce byly provedeny za přítomnosti pyrimidinového nukleotidu, který měl sacharidovou část modifikovanou 2'-fluoroskupinou (2'-F). Tato substituce vedla ke zvýšení rezistence k ribonukleázám, které užívají 2'-hydroxylovou skupinu ke štěpení fosfodiesterové vazby. Specificky transkripční reakční směs obsahovala 3,3mM 2'-FUTP a 3,3mM 2'-FCTP společně s 1mM GTP a ATP.

Počáteční randomizovaná RNA knihovna poskytla 3×10^{14} molekul. Afinity jednotlivých ligandových nukleových kyselin tenascinu-C byly určeny standardním postupem dělení na nitrocelulózovém filtru (Tuerk and Gold (1990) Science 249 496:505-10).

Pro každý cyklus SELEX byly destičky Lumino (LabSystems, Needham Heights, MA) potaženy 2 hodiny při teplotě místnosti užitím 200 μ l Dulbeccova PBS obsahujícího tenascin-C v koncentraci uvedené v tab. 1. Po potažení byly jamky destičky blokovány užitím pufru HBSMC+ [20 mM Hepes, pH 7,4,

137 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ a 1 g/l humánní sérový albumin (Sigma, frakce V) pro opakování cyklů 1 až 6, zatímco pro cykly 7 a 8 byly jamky blokovány pufrem HBSMC+ obsahujícím 1 g/l kaseinu (I-block; Tropix). Vazebný a promývací pufr byl pufr HBSMC+ obsahující 0,05% Tween 20. Pro každý cyklus SELEX byla RNA naředěna do 100 µl vazebného pufru a ponechána inkubovat 2 hodiny při 37°C v jamkách potažených proteinem, které byl předem promyty vazebným pufrem. Po navázání bylo provedeno 6 promytí vždy po 200 µl. Po promytí byly suché destičky umístěny na 5 minut na ohřívací blok s teplotou 95 °C. Standardní reakce s AMV reverzní transkriptázou (50 µl) byla provedena při 48 °C přímo v jamkách a reakční produkty pak byly užity pro standardní PCR a transkripční reakci. V těchto krocích reverzní transkripce a amplifikace templátu byly užity dva syntetické primery SN7 (viz výše) a 3N7a: 5'-TCGCGCGAGTCGTCTG-3' (SEKVENCE ID. Č.3)

Pro postup SELEX s buňkami byly humánní glioblastomové buňky U251 (Hum. Hered. (1971) 21:238) kultivovány do konfluence v médiu DMEM ("Dulbecco's Modified Eagle's Medium") s 10% fetálním telecím sérem (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) na šestijamkových miskách pro kultivaci tkání (Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ) a třikrát opláchnuty Dulbeccovým PBS s CaCl₂ (DPBS, GIBCO BRL). RNA značená vnitřně při transkripci (Fitzwater (1996) supra) byla inkubována s buňkami 1 hodinu při 37°C. Značená RNA pak byla odstraněna a buňky byly promyty šestkrát DPBS po 10 minutách ve 37°C. Pak se přidalo DPBS obsahující 5mM EDTA a buňky se dále 30 minut inkubovaly, aby se eluovala navázaná RNA, která zůstala po promytí. Tato RNA byla kvantifikována standardním scintilačním postupem a pak amplifikována metodou RT-PCR.

Vazebný test buněk U251

Vnitřně značená RNA byla inkubována se zvětšující se koncentrací konfluentních buněk U251 v šestijamkových kultivačních miskách (Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ) 60 minut ve 37°C. nenavázaná RNA byla odmyta ve třech promytích po 10 minutách s DPBS+ CaCl₂ při 37°C, a vázaná byla odebrána tak, že buňky byly rozrušeny Trizolem (Gibco BRL-Gaithersburg; MD). Navázaná RNA byla kvantifikována standardním měřením scintilace.

Klonování a sekvencování

Amplifikované afinitně obohacené oligonukleotidové pooly byly purifikovány na 8% polyakrylamidovém gelu, reverzní transkripcí převedeny na ssDNA a tato DNA pak byla amplifikována v polymerázové řetězové reakci (PCR) užitím primerů obsahujících místa pro BamHI a HindIII restriční endonukleázy. PCR fragmenty byly klonovány, plazmidy byly izolovány a DNA byla sekvencována standardními postupy, které jsou odborníkům známy (viz Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. 3 vols., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor).

Příklad 2

RNA ligandy tenascinu-C

Ligandové nukleové kyseliny k buňkám U251 byly získány metodou SELEX, která byla popsána v patentové přihlášce USA č. 08/434,425, nazvané "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Tissue SELEX," podané 3. Května 1995,

nyní Patent USA č. 5,789,157. Následně bylo určeno, že získané ligandy jsou ligandové nukleové kyseliny tenascinu-C.

Pro získání ligandových nukleových kyselin k humánnímu tenascinu-C bylo provedeno 8 cyklů SELEX s randomizovanou nukleotidovou knihovnou jak bylo popsáno v části Materiály a metody. RNA a protein, které sloužily jako vstupní materiál v každém cyklu jsou uvedeny v tab. 1. Po 8 cyklech SELEX byla afinita oligonukleotidového poolu k tenascinu-C 10 nM, a již se dále nezvyšovala v dalších cyklech SELEX.

Pro získání ligandů ke glioblastomovým buňkám U251 bylo provedeno 9 cyklů SELEX s randomizovanou nukleotidovou knihovnou. Po 9 cyklech vazby na buňky U251 a eluci EDTA byly produkty ze 3., 5. a 9. Cyklu testovány na jejich schopnost vázat buňky U251. Obr. 1 ukazuje, že s rostoucím počtem cyklů SELEX roste také množství navázané RNA při konkrétní koncentraci. Vzhledem ke složitosti cíle nebylo možné stanovit afinitu oligonukleotidového poolu k neznámé cílové molekule na těchto buňkách.

Pool oligonukleotidů E9 (9 cyklů navázání a EDTA eluce z buněk U251) byl pak užit jako výchozí materiál pro další SELEX proti purifikovanému tenascinu-C. Dva cykly SELEX s purifikovaným tenascinem-C byly provedeny stejně, jak bylo popsáno výše. Proteiny a RNA koncentrace ve dvou cyklech SELEX (E9P1 a E9P2) jsou uvedeny v tab. 2.

Celkem byly provedeny tři různě experimenty SELEX: SELEX experiment, kde cílem byl purifikovaný tenascin-C, druhý experiment, kde cílem byly glioblastomové buňky U251 a třetí experiment, kde pool z experimentu s glioblastomovými buňkami U251 byl použit jako výchozí materiál v experimentu s purifikovaným tenascinem-C jakožto cílem.

Všechny tři uvedené experimenty byly analyzovány klonováním a sekvencováním získaných ligandů z 8 cyklů SELEX

proti purifikovanému tenascinu-C (sekvence "TN"), z 9 cyklů SELEX proti buňkám U251 (sekvence "E9"), a ze dvou cyklů hybridní U251/tenascin-C SELEX (sekvence "E9P2"). Sekvence jedinečných klonů jsou ukázány v tab. 3 a jsou rozděleny do dvou hlavních skupin: ligandy tenascinu-C (sekvence "TN" a "E9P2") a ligandy buněk U251 (ligandy "E9"). Mezi ligandy tenascinu-C většina klonů (celkem 65) představuje jednu ze dvou odlišných tříd sekvencí označených jako rodina I a rodina II (viz obr. 1).

Vyšetření variabilních úseků 12 klonů z rodiny I ukázalo 7 jedinečných sekvencí, které jsou příbuzné prostřednictvím kanonické sekvence GACNYLJUCCNGCYAC (SEKVENCE ID. Č. 12). Vyšetření variabilních úseků 18 klonů z rodiny II odhalilo sdílenou kanonickou sekvenci CGUCGCC (Tab. 3). Sekvence E9 mohou být seskupeny podle konzervativních úseků GAY a CAU ve variabilních úsecích. Zbývající sekvence nejsou s ostatními sekvencemi nijak příbuzné a byly označeny jako "sirotci". Tři sekvence převládají, s E9P2-1, E9P2-2, a TN9 byly reprezentovány 14x, 16x a 10x. V kategorii "sirotků" je jedna sekvence, a sice TN18, zastoupena 2x. celkově lze shrnout, že tyto údaje ukazují na vysoce obohacený pool sekvencí.

Většina jedinců vykazovala nízkou nanomolární disociační konstantu, přičemž nejčastější sekvence TN9, E9P2-1 a E9P2-2 měly nejvyšší afinity, a sice 5 nM, 2nM a 8 nM (viz tabulka 3). Tyto výsledky ukazují, že metoda SELEX s buňkami U251 je dobrým zdrojem aptamerů k tenascinu-C, přičemž pouhé dva cykly SELEX byly potřebné k izolaci ligandů specifických pro tenascin-C z celého poolu SELEX oligonukleotidů. Podobně mohou být izolovány oligonukleotidové ligandy k jiným proteinům z poolu E9 pomocí purifikovaného proteinového cíle.

Příklad 3

Stanovení minimální velikosti TN9 a substituce
2'-OH purinů 2'-OMe puriny: Syntéza aptameru TTA1

Byl užit standardní postup syntézy oligonukleotidů, který je odborníkům znám (Green et al. (1995) Chem Biol 2 10 :683-95). 2'-fluorpyrimidininfosforamiditové monomery byly získány od firmy JBL Scientific (San Luis Obispo, CA); 2'-OMe-purinové, 2'-OH-purinové, hexylaminové a $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_6$ monomery, a také dT-polystyrenový pevný nosič, byly získány od firmy Glen Research (Sterling, VA). Afinity aptamerů byly stanoveny pomocí dělení na nitrocelulózovém filtru (Green et al., supra).

TN9 byl vybrán pro další analýzu na základě jeho vysoké afinity k tenascinu-C. nejdříve byla zkoumána minimální sekvence nezbytná pro vysokoafinitní vazbu. Standardním postupem (Green et al, supra) bylo zjištěno, že 55 nukleotidů 3'-konce bylo nutných k vazbě na tenascin-C, zatímco žádné nukleotidy nemohly být odstraněny z 5'-konce bez ztráty afinity. Kvůli zjištění, zda lze TN9 ještě z délky 55 nukleotidů zkrátit a přitom zachovat vysokou afinitu vazby, byly provedeny pokusy s vnitřními delecemi v TN9. Prvních 55 nukleotidů TN9 společně s prvními 55 nukleotidy ligandů TN7, TN21 a TN41 rodiny II bylo analyzováno počítačovým programem z hlediska možného uspořádání sekundární struktury RNA (mfold 3.0, dostupný na adrese <http://www.ibc.wustl.edu/hzucker/> (viz také M. Zuker, D.H. Mathews & D.H. Turner. Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide. In: RNA Biochemistry and Biotechnology, J. Barciszewski & B.F.C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, (1999)). Kromě mnoha potenciálních sestav

RNA predikovaných pomocí užitého algoritmu byla nalezena struktura společná každému oligonukleotidu. Tato struktura je představována oligonukleotidem TTA1 uvedeným na obr. 2, a obsahuje 3 stonky setkávající se v jednom bodě, tzv. třístonkový uzel. Při tomto uspořádání jsou nejkonzervativnější nukleotidy z oligonukleotidů rodiny II lokalizovány v oblasti uzlu. Při srovnání TN9, TN7, TN21 a TN41 se ukázalo, že druhý stonek má proměnlivou délku a sekvenci, což vedlo k předpokladu, že extenze 2. Stonku není nutná k vazbě na tenascin-C. Při testování této hypotézy se zjistilo, že nukleotidy 10 až 26 mohou být nahrazeny ethyleneglykolovým linkerem $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_6$. Tento linker slouží jako náhradní smyčka a snižuje velikost aptameru. Navíc čtyřnukleotidové smyčky (CACU nebo GAGA), které nahradí nukleotidy 10 až 26, vytvoří sekvenci s vysokou afinitou k tenascinu-C. Odborník snadno stanoví další nukleotidové smyčky nebo jiné spacers, které by mohly nahradit nukleotidy 10 až 26, aby vznikly sekvence s vysokou afinitou k tenascinu-C.

Kvůli zvýšení ochrany proti nukleázám byla vyhledány polohy purinů, kde by mohly být provedeny substituce odpovídajícími 2'-OMe-purinovými nukleotidy. Oligonukleotidy byly libovolně rozděleny do pěti sektorů a všechny puriny v jednom sektoru byly nahrazeny odpovídajícími 2'-OMe-purinovými nukleotidy, celkem 5 oligonukleotidů (tabulka 4, fáze I syntézy). Afinita každého oligonukleotidu k tenascinu-C byla určena a bylo zjištěno, že všechny puriny v sektorech 1, 3 a 5 mohou být nahrazeny, aniž by došlo k viditelné ztrátě afinity. V sektorech 2 a 4 byly pak substituovány jednotlivé puriny 2'-OMe puriny a výsledný účinek byl měřen (tabulka 4, fáze III syntézy). Z těchto experimentů se dalo soudit, že substituce nukleotidů G9, G28,

G31 a G34 2'OMeG vedla ke ztrátě afinity k tenascinu-C. Takže tyto nukleotidy byly v aptameru TTA 1 ponechány jako 2'-OH puriny.

Aptamer TTA1 (Tab. 4) byl pak syntetizován s linkerem $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_6$ (Spacer 18), a 3'-3' dT čepičkou pro ochranu proti exonukleázám, 5' hexylaminem (Tab. 4) a všemi puriny ve formě 2'-OMe, s výjimkou 5 G uvedených v tab. 4. Nevázající se kontrolní aptamer TTA1.NB byl připraven delecí 5 nukleotidů na 3'-konci. TTA1 se váže na tenascin-C s rovnovážnou disociační konstantou (K_d) 5 nM, zatímco TTA1.NB má pro tenascin-C $K_d > 5$ pM.

Nukleotidy 10 až 26 mohou být nahrazeny nenukleotidovým ethylenglykolovým linkerem. Je tedy pravděpodobné, že TTA1 může být syntetizován ve dvou oddělených částech, přičemž přerušení je v pozici ethylenglykolového linkeru a jsou vneseny nové 5'- a 3'-konce. Po syntéze se tyto dvě molekuly společně inkubují tak, aby byl umožněn vznik hybridu. Tato metoda umožňuje vnesení dalších aminových skupin a také dalších nukleotidů na nové 5'- a 3'-konce. Pro biokonjugaci mohou být užity nové funkční skupiny. Navíc takováto syntéza ve dvou částech vede k vyššímu výtěžku, neboť se syntetizují kratší molekuly.

Příklad 4

Biodistribuce Tc-99m-značených aptamerů u myši s nádory

Biodistribuce aptamerů byla testována pomocí konjugace chelatačního činidla pro Tc-99m (Hi_{15} : Hilger et al. (1998) Tet Lett 39:9403-9406) na 5'-konec oligonukleotidu, jak je ukázáno na obr. 2, a značením aptameru Tc-99m. Aptamer ve formě

značené Tc-99m je ukázán na obr. 10. TTA1 a TTA1.NB byly konjugovány s Hi_{15} při koncentraci 50 mg/ml aptameru ve 30% dimethylformamidu s 5 molárními ekvivalenty Hi_{15} -N-hydroxysukcinimidu, pufováno 100 mM boritanem sodným, pH 9,3, 30 minut při teplotě místnosti. Po přečištění pomocí HPLC s reverzní fází byly získány Hi_{15} -TTA1 a Hi_{15} -TTA1.NB. Oligonucleotidy pak byly značeny Tc-99m následujícím způsobem: k 1 nmol Hi_{15} -aptameru bylo přidáno 200 μl 100 mM fosfátového pufru pH 8,5, s 23 mg/ml tartrátu sodného a 50 μl Tc-99m pertechnetátu (5,0 mCi) eluovaného z kolony Mo-99 (Syncor, Denver) během 12 hodin. Značicí reakce byla zahájena přidáním 10 μl SnCl_2 . Reakční směs byla inkubována 15 minut při 90 °C. Reakce pak byla oddělena od nezreagovaného Tc-99m rotační dialýzou přes membránu s prahem molekulové hmotnosti ("cut-off") 30 000 (Centrex, Schleicher & Scheull) se dvěma promytími po 300 μl . Tento značicí postup vedl k inkorporaci 30 až 50 % přidaného Tc-99m a specifické aktivitě 2-3 mCi/nmol RNA. Tc-99m je vázáno prostřednictvím 5'G jak je ukázáno na obr. 5.

Pro pokusy s biodistribucí byly xenotransplantáty nádoru U251 připraveny následovně: buňky U251 byly kultivovány v médiu DMEM ("Dulbeccos' Modified Eagle's Medium") s 10% (objem/objem) telecím fetálním sérem (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). Athymické myši, tj. myši bez brzlíku (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN) dostaly subkutánní injekcí 1×10^6 buněk U251. Když nádory dosáhly velikosti 200-300 mg (za 1 až 2 týdny), Tc-99m-značené aptamery byly injikovány intravenózně v dávce 3,25 mg/kg. V určených časech byla zvířata podrobena anestezii isofluranem (Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA), byla jim odebrána krev srdeční punkcí a zvířata pak byla utracena a byly z nich odebrány tkáně. Hladina Tc-99m byla měřena gama-počítačem (Wallac Oy, Turku, Finland). Příjem

aptameru do tkání byl měřen jako % of injikované dávky na gram tkáně (%ID/g).

Snímky myší byly získány gama-kamerou. Myši byly pod anestezí (isofluran) umístěny do kamery (Siemens, LEM+). Data byla sbírána (30 vteřin až 10 minut) a analyzována pomocí programového vybavení Nuclear MAC verze 3.22.2 (Scientific Imaging, CA) na počítači Power MAC G3 (Apple Computer, CA).

Biodistribuční experimenty (tab. 5) ukázaly rychlý a specifický příjem aptameru do tkání nádoru, nevázející se aptamer nebyl zadržen v nádoru. Hladina Tc-99m v krvi klesala velmi rychle. Po třech hodinách hladina Tc-99m vnesená do nádoru užitím Hi_{15} -TTA1 měla velmi dlouhý poločas (>18 hodin). To ukazuje, že jakmile jednou aptamer pronikne do nádoru, radioaktivní značka jím nesená zůstává v nádoru o dlouhou dobu. To by ukazovalo, že také cytotoxická činidla, včetně radionuklidů nebo neradioaktivních činidel, konjugovaná s aptamery, by zůstávala v nádoru s dlouhým poločasem.

Tc-99m radioaktivita se objevila i v jiných tkáních, zejména v tenkém a tlustém střevu. Profil hepatobiliární clearance, který byl zde pozorován, může být odborníkem snadno změněn, např. tím, že se změní hydrofilnost chelatačního činidla pro Tc-99m, změní se chelatační činidlo nebo se změní současně radioaktivní značka i chelatační činidlo.

Celotělové snímky zvířat byly získány užitím Tc-99m-značeného Hi_{15} -TTA1 3 hodiny po injekci: Snímky z myší injikovaných Hi_{15} -TTA1 jasně zobrazují nádory, zatímco snímky z myší injikovaných Hi_{15} -TTA1.NB nikoliv (obr. 3). Další radioaktivita je patrná v gastrointestinálním traktu, jak bylo predikováno v biodistribučním experimentu.

Příklad 5

Užití fluorescenčně značeného TTA1 k lokalizaci tenascin-C v nádorové tkáni

Materiály a metody

TTA1 a TTA1.NB byly syntetizovány jak již bylo popsáno výše. Fluorescenční barvivo sukcinimdylrhodamin-Red-X (Molecular Probes, Eugene, OR) bylo konjugováno na 5'-aminovou skupinu aptameru, jak bylo popsáno výše pro Hi₁₅-NHS konjugáty. Rhodamin-Red-X-konjugované aptamery, TTA1-Red a TTA1.NB-Red, byly purifikovány HPLC s reverzní fází. Buněčné kultury U251 a růst nádorů u "nahých" (athymických) myší byly taktéž popsány výše. 5 nmol TTA1-Red nebo TTA1.NB-Red bylo injikováno intravenózně do myši a v požadovaném čase bylo zvíře podrobno anestezii a perfundováno 0,9% NaCl a utraceno. Nádor byl vyoperován a vložen do formalínu. Po 24 hodinách ve formalínu byly připraveny 10 μ m řezy a Rhodamin-Red-X byla detekována fluorescenční mikroskopií (Eclipse E800, Nikon, Japan).

Výsledky

TTA1-Red měl stejnou afinitu k tenascin-C jako nekonjugovaný původní aptamer, TTA 1, a sice 5 nM. Byla srovnána hladina fluorescence v nádoru pro TTA1-Red a TTA1.NB-Red 10 minut po injekci. Vázající se aptamer TTA1-Red silně obarvil nádor, ale nikoliv okolní tkáň (obr. 4). Naproti tomu při použití TTA1.NB-Red byla detekována pouze vlastní fluorescence tkání. Tyto výsledky ukazují užitečnost aptamerů podle vynálezu pro fluorescenční detekci tenascin-C in vivo.

Příklad 6

Detekce nádorů in vivo pomocí aptameru TTA1 (GS7641): další typy nádorů

Značení aptameru, biodistribuce a xenotransplantace nádorů na "nahé" myši byly shodné s příkladem 4.

Je známo, že mnohé typy humánních nádorů exprimují tenascin-C. Pro vyhodnocení schopnosti TTA1/GS7641 zaměřit i jiné typy nádorů než glioblastomy, byly kultivovány buněčné linie humánních nádorů jakožto nádory na "nahých" myších. Nádorové tkáně pak byly testovány na expresi humánního tenascinu-C, a pak nádory exprimující humánní tenascin-C byly testovány na příjem aptameru.

Obr. 6 ukazuje příjem aptameru u několika nádorů, jako např. glioblastomu, nádoru prsu, kolorektálního nádoru a rhabdomyosarkomu. Specifický příjem do nádoru byl demonstrován na základě srovnání vázajícího se (TTA1/GS7641) a nevázajícího se aptameru (TTA1.NB). Zajímavé bylo, že KB, xenotransplantát, který exprimuje myší a nikoliv humánní TN-C, nejevil žádný příjem do nádoru. Tento experiment rozšiřuje pozorování příjmu aptameru do glioblastomu o další typy karcinomů a sarkomů, a prokazuje, že všechny nádory exprimující humánní tenascin-C vykazují příjem TTA1/GS7641.

Příklad 7

Alternativní značení pomocí In-111

Xenotransplantáty nádorů a biodistribuční studie byly provedeny shodně s příkladem 4. Pro navázání DTPA a DOTA na

TTA1/GS7641, byl cyklický anhydrid každého z nich inkubován s TTA1/GS7641 obsahujícím amin v podmínkách neutrálního pH standardním způsobem. Struktura DTPA a příslušného konjugátu je uvedena na obr. 8 a 9, kde jsou značeny In-111. DOTA-konjugát má identické linkery jako DTPA. DOTA- a DTPA-konjugát byly značeny In-111 inkubací 30 minut v 95°C v 0,5M NaOAc, pH 5,5. P odstranění neinkorporované radioaktivní značky odstředovací dialýzou přes membránu s limitem propustnosti 30K byl radioaktivně značený aptamer přenesen do fosfátem pufovaného solného roztoku, aby mohlo být injikován myším nosícím nádory.

Biodistribuce aptameru značeného In-111 byla výrazně odlišná od přípravků značených Tc popsaných v příkladu 4. Obr. 7 ukazuje, že ve srovnání se TTA1/GS7641 značeným Tc-99m je radioaktivita z TTA1/GS7641 značeného In-111 v intestinálním traktu značně snížena a současně je zvýšen příjem do jater a ledvin. Tento experiment ukazuje, že chemické vlastnosti chelatačního činidla mají významný vliv na distribuci radioaktivní značky TTA1/GS7641 v živém zvířeti. Biodistribuční profily odlišné od profilů Hi15-TTA1/GS7641 mohou být užitečné pro zacílení nádorů za určitých klinických stavů, kdy hepatobiliární clearance není žádoucí. K takovým klinickým stavům patří, aniž by výčet byl omezující, radioaterapeutické aplikace a zobrazování intestinálního traktu, prostaty a dalších abdominálních oblastí.

Tabulka 1

Tenascin-C SELEX RNA a vstupní protein

Cyklus	Tenascin-C (pmol/jamka)	RNA (pmol/jamka)
1	12	200
2	12	200
3	12	200
4	12	200
5	2	33
6	2	33
7	2	33
8	0,2	3,3

Tabulka 2

Tenascin-C SELEX RNA a vstupní protein v buněčném SELEX

Cyklus	Tenascin-C (pmol/jamka)	RNA (pmol/jamka)
E9P1	2	33
E9P2	2	33

Tabulka 3: sekvence tenascinu-C: purifikované metodou SELEX (TN sekvence) a purifikované metodou buněčné SELEX z buněk U251 (sekvence E9P2)

Rodina I		Rodina II		Sirotdci	
ID. č.		ID. č.			
TN11	4	gGAGgAcGauGcgg	gGAGgAcGauGcgg	gGAGgAcGauGcgg	gGAGgAcGauGcgg
TN45	5	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg
TN4	6	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg
TN22	7	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg
TN32 (2)	8	gggAggAcGauGcgg	gggAggAcGauGcgg	gggAggAcGauGcgg	gggAggAcGauGcgg
TN14	9	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg
TN44 (3)	10	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg
TN29 (2)	11	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg
Kanonická	12				
Sekvence					
E9P2-4 (5)	13	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg
E9P2-1 (14)	14	gggAggacgaugcgg	gggAggacgaugcgg	gggAggacgaugcgg	gggAggacgaugcgg
E9P2-2 (16)	15	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg
TN7 (3)	16	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg
TN21 (4)	17	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg
TN9 (10)	18	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg
TN41	19	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg
Kanonická					
Sekvence					
E9P2-17	20	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg
E9P2-48	21	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg
E9P2-14	22	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg
E9P2-17	23	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg
E9P2-22	24	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg
E9P2-40	25	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg
E9P2-41	26	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg
TN18	27	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg	gggaggacgaugcgg

CAAUCAAACACGUAU UCCCC UCAUCUAUUAGCUUCCCC cagacgacucgccccg
 CAAUCUCGAAAGACUCUCCU GCAUCCUCACCCCC cagacgacucgccccg
 CAACCUc GAAAGACUUUCCCC GCAUCACUGUGUACUCCCC cagacgacucgccccg
 CAACCUc GAUAGACUUUCCCC GCAUCACUGUGUACUCCCC cagacgacucgccccg
 CAaCCUcAA UCuGACAUUUCCCC GcACCUAAAUUG CCCC cagacgacucgccccg
 CAAACGAUC ACU UACCUUUCCU GCAUCUGCUAGC CUCCCC cagacgacucgccccg
 ACGCCAGCAUUGACCCUCGCUUCCACUAUUCCAUCUCCCC cagacgacucgccccg
 CCAACCUCAUUUUGACACUUGCGCGCACCUAAAUUGCCCC cagacgacucgccccg
 GACNYUCCN GCAYC

AACCCUAU ACGCGA ACCGACCAACAUGCCUCCCGUGCCCC cagacgacucgccccg
 UGCCCCUAG AAGCGU GCCGUAUUGCUAAGCCCCUCCCC cagacgacucgccccg
 UGCCCCU AUGCGU GCCGAAACAUUUCCCCCUACCC cagacgacucgccccg
 AACAUUUCCCCAUGCGUGCC AUACC GGAUUAUUGCUCC cagacgacucgccccg
 ACUGGACCAACCGUGCGCGAUACCGGAUACUUUGCUCC cagacgacucgccccg
 AACAAUGCACUGCGCGGUAU GGAUGUUUUGCUCCUG cagacgacucgccccg
 UUAAGUCUGGUAU GCGCAUCCC AGAUCCCCUGACC cagacgacucgccccg
 GCGUCGCGC

AUGGCAAGUCGAACCAUCCCCCAGCUUUCUCCUGUCCCC cagacgacucgccccg
 GAAGUUUUCUGCCUUGUUUUGAUUGCGCCUCCCCC cagacgacucgccccg
 UCGAGCGGUCGACCGUCAACAAGAAUAAAGCGUGUCCUG cagacgacucgccccg
 AUGGCAAGUCGAACCAUCCCCCAGCUUUCUCCUGUCCCC cagacgacucgccccg
 ACUAGACCGCGAGUCCAUUACAUCUUGCCCAAAACcUCCCC cagacgacucgccccg
 GAGAUACAUAUCCUAGUUUGUUCACACCUACACCCC cagacgacucgccccg
 ACGAGCGUCUCAUGACACAUUUUGGUCUCAGUGUGCA cagacgacucgccccg
 UCGACCUUGAAUGACUCCACCACUAUCUAACAUCUCCCCC cagacgacucgccccg

Tabulka 3 (pokračování)

TN20	28	gggaggacgaugcgg	UCGACCUCGAAUGACUCUCCACCUAUUCUAAACAGCCUUC	cagacgacucgccccga	>10 uM
TN51	29	gggaggacgaugcgg	AGAAUCUAUCCUAACCGCUCUAACAAAUUUUGCCGACCG	cagacgacucgccccga	110 nM
TN8	30	gggaggacgaugcgg	AUAAUUGACACCAACAGGUCCCGGAAAUCAUCCUCUG	cagacgacucgccccga	
TN27	31	gggaggacgaugcgg	AAACCAACCGUUGACAC CUUUUCGUUUCCGAAAGUCCC	cagacgacucgccccga	
TN39	32	gggaggacgaugcgg	AAGCCAACCCUAGUCAGCCUUUUCGUUUCCACGCCACC	cagacgacucgccccga	10 nM
TN24	33	gggaggacgaugcgg	gACCAACUAAACUGUUCGAAAGCUGGAAACAUGUCCUGACGC	cagacgacucgccccga	
TN5	34	gggaggacgaugcgg	ACCAACUAAACUGUUCGAAAGCUGGAAACACGUCUCCAGCGC	cagacgacucgccccga	
TN36	35	gggaggacgaugcgg	ACCAACUAAACUGUUCGAAAGCUGGAAACACGUCUCCAGCGC	cagacgacucgccccga	
TN6	36	gggaggacgaugcgg	ACCAACUAAACUGUUCGAAAGCUGGAAACACGUCUCCAGCGC	cagacgacucgccccga	
TN10	37	gggaggacgaugcgg	ACCAACUAAACUGUUCGAAAGCUGGAAACACGUCUCCAGCGC	cagacgacucgccccga	
TN1	38	gggaggacgaugcgg	AAGUUUA GuGCUCAGUUCGACACUCCUcUACUCAGCCC	cagacgacucgccccga	>10 uM
TN109	39	gggaggacgaugcgg	AgCCAGAGCCUcUcAGUUCUaCAGAAcUuACCCcACUGG	cagacgacucgccccga	
TN110	40	gggaggacgaugcgg	ACCUAAACUCAAUCAGGAACCAACCUAGCACUCUCAUGGC	cagacgacucgccccga	

U251 SELEX aptamery, eluce EDTA (E9)

E9-8 (3)	41	gggaggacgaugcgg	GAGAUCAACAUAUCCUCUAGUUUGGUUCCAACCUACACCCC	cagacgacucgccccga
E9-15	42	gggaggacgaugcgg	AUCUCGAUCCUUCAGCACUUAUUAUCCUUUcUGCCC	cagacgacucgccccga
E9-6	43	gggaggacgaugcgg	ACGAUCCUUUCCUUA CAUUAUCAUUAUCCUUGUGCCC	cagacgacucgccccga
E9-5(2)	44	gggaggacgaugcgg	UGACGACAACUCGACUG CAUAUCUCACAACUCCUGUGCCC	cagacgacucgccccga
E9-3 (6)	45	gggaggacgaugcgg	ACUAGACCGCGAGUC CAUUAACUUGCCCCAAAACCUCCCC	cagacgacucgccccga
E9-9	46	gggaggacgaugcgg	GGCAUCGAGCAACAUCUCCGAUUCGGAUUCUCCACUCCCC	cagacgacu gccccga



Tabulka 4: 2'-OMe substitute, vnitřní delece, TTA1 a TTA1.NB

Fáze I: 2'-OMe. Afinita.

SEKVENCE	ID.Č.	Kd.
TN9.3	47	>10 uM
TN9.4	48	2 nM
TN9.4M1	49	6 nM
TN9.4M2	50	20 nM
TN9.4M3	51	7 nM
TN9.4M4	52	nb
TN9.4M5	53	4 nM
TN9.4Me	54	10 nM

6=mG; 7=mA; 5=3'-3' Čepička, 1 = hexylamin

Fáze III. 2'-OMe. Afinita.

TN9.4M1235	55	16667667C67U6C6677C77U6C7CUCGUCGCCGU77U667U6UUU6CUCCCU65	16.5 nM
TN9.4M135G6	56	1666766ACGAUGCG677C77U6C7CUCGUCGCCGU77U667U6UUU6CUCCCU65	2.2 nM
TN9.4M135A7	57	166676GZCGAUGCG677C77U6C7CUCGUCGCCGU77U667U6UUU6CUCCCU65	1.7 nM
TN9.4M135G9	58	166676GACGAGUGCG677C77U6C7CUCGUCGCCGU77U667U6UUU6CUCCCU65	7.7 nM
TN9.4M135A10	59	166676GACGZUGCG677C77U6C7CUCGUCGCCGU77U667U6UUU6CUCCCU65	1.3 nM
TN9.4M135G12G14	60	166676GACGAU6C677C77U6C7CUCGUCGCCGU77U667U6UUU6CUCCCU65	2.5 nM
TN9.4M135G28	61	166676GACGAUGCG677C77U6C7CUCGUCGCCGU77U667U6UUU6CUCCCU65	37 nM
TN9.4M135G31	62	166676GACGAUGCG677C77U6C7CUCGUCGCCGU77U667U6UUU6CUCCCU65	55 nM
TN9.4M135G34	63	166676GACGAUGCG677C77U6C7CUCGUCGCCGU77U667U6UUU6CUCCCU65	7 nM

TTA1: 5' - 1G667667CG - (CH₂CH₂O) - CGUCGCCGU77U667U6UUU6CUCCCU65 5 nM

TTA1.NB: 5' - 1G667667CG - (CH₂CH₂O) - CGUCGCCGU77U667U6UUU6CUC5 >5 uM

200100

Tabulka 5: Biodistribuce Tc-99m-TTA1 a -TTA1.NB

	min	TTA1	TTA1.NB	min	TTA1	TTA1.NB
NÁDOR	2	4.470 ± 0.410	4.510 ± 0.300	2	44.430 ± 4.280	54.470 ± 1.210
	10	5.940 ± 0.590	3.020 ± 0.210	10	18.810 ± 0.940	14.320 ± 2.080
	60	2.689 ± 0.310	0.147 ± 0.018	60	1.514 ± 0.040	0.637 ± 0.111
	180	1.883 ± 0.100	0.043 ± 0.004	180	0.286 ± 0.028	0.221 ± 0.021
	570	1.199 ± 0.066	0.018 ± 0.001	570	0.140 ± 0.006	0.100 ± 0.013
	1020	1.150 ± 0.060	N/A	1020	0.081 ± 0.005	N/A
KREV	2	18.247 ± 1.138	15.013 ± 0.506	2	3.690 ± 0.250	3.120 ± 0.100
	10	2.265 ± 0.245	2.047 ± 0.195	10	7.010 ± 0.070	6.440 ± 0.250
	60	0.112 ± 0.003	0.102 ± 0.019	60	15.716 ± 2.036	14.649 ± 0.532
	180	0.032 ± 0.001	0.034 ± 0.003	180	1.479 ± 0.710	1.243 ± 0.405
	570	0.013 ± 0.001	0.011 ± 0.001	570	0.219 ± 0.147	0.159 ± 0.067
	1020	0.006 ± 0.001	N/A	1020	0.280 ± 0.243	N/A
PLÍČE	2	8.970 ± 1.210	8.130 ± 0.960	2	2.340 ± 0.240	2.280 ± 0.180
	10	2.130 ± 0.080	1.940 ± 0.230	10	0.890 ± 0.040	0.770 ± 0.070
	60	0.157 ± 0.011	0.120 ± 0.005	60	10.799 ± 5.381	21.655 ± 11.676
	180	0.048 ± 0.006	0.041 ± 0.003	180	26.182 ± 7.839	18.023 ± 3.485
	570	0.028 ± 0.006	0.017 ± 0.002	570	1.263 ± 0.706	0.716 ± 0.179
	1020	0.007 ± 0.001	N/A	1020	0.298 ± 0.167	N/A
JÁTRA	2	9.120 ± 0.530	7.900 ± 0.350	2	1.270 ± 0.130	1.490 ± 0.050
	10	12.460 ± 1.250	9.100 ± 0.830	10	0.870 ± 0.090	1.840 ± 1.000
	60	1.234 ± 0.091	0.423 ± 0.095	60	0.064 ± 0.003	0.050 ± 0.004
	180	0.401 ± 0.084	0.211 ± 0.059	180	0.016 ± 0.002	0.011 ± 0.001
	570	0.104 ± 0.017	0.058 ± 0.003	570	0.011 ± 0.002	0.007 ± 0.001
	1020	0.075 ± 0.003	N/A	1020	0.003 ± 0.0003	
SLEZINA	2	5.100 ± 0.410	4.860 ± 0.130			
	10	2.460 ± 0.210	1.220 ± 0.120			
	60	0.643 ± 0.076	0.110 ± 0.015			
	180	0.198 ± 0.026	0.038 ± 0.005			
	570	0.062 ± 0.004	0.020 ± 0.001			
	1020	0.030 ± 0.003	N/A			

29.01.00

- 44 -

PV 2002-365
4397

SEZNAM SEKEVNÍ

<160> 65

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 71

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(56)

<223> N v polohách 17-56 je A, C, T, nebo G

<400> 1

tcgcgcgagt cgtctgnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnccgc 60
atcgtcctcc c 71

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<400> 2

taatacgact cactataggg aggacgatgc gg 32

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<400> 3

tcgcgcgagt cgtctg 16

<210> 4
<211> 71
<212> RNA
<213> Umělá sekvence
<220>
<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina
<220>
<221> modifikovaná báze
<222> (1)..(71)
<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.
<400> 4
gggaggacga ugcggaauuc aaaacucacg uuauuccuc aucuauuagc uccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 5
<211> 71
<212> RNA
<213> Umělá sekvence
<220>
<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina
<220>
<221> modifikovaná báze
<222> (1)..(71)
<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.
<400> 5
gggaggacga ugcggaauuc uccgaaaaag acucuuccug cauccucuca cccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 6
<211> 71
<212> RNA
<213> Umělá sekvence
<220>
<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina
<220>
<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(71)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.

<400> 6

gggaggacga ugcggcaacc ucgaaagacu uuucccgcau cacuguguac ucccccagac 60
gacucgccccg a 71

<210> 7

<211> 71

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(71)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.

<400> 7

gggaggacga ugcggcaacc ucgauagacu uuucccgcau cacuguguac ucccccagac 60
gacucgccccg a 71

<210> 8

<211> 71

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(71)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.

<400> 8

gggaggacga ugcggcaacc ucaaucuuga cauuucccg accuaaaauu gccccagac 60
gacucgccccg a 71

<210> 9
<211> 71
<212> RNA
<213> Umělá sekvence
<220>
<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina
<220>
<221> modifikovaná báze
<222> (1)..(71)
<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.
<400> 9
gggaggacga ugcggaac gaucacuuac cuuuccugca ucugcuagcc uccccagac 60
gacucgccc a 71

<210> 10
<211> 71
<212> RNA
<213> Umělá sekvence
<220>
<220>
<221> modifikovaná báze
<222> (1)..(71)
<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.
<400> 10
gggaggacga ugcggaac agccauugac ccucguucc acuaauccau cccccagac 60
gacucgccc a 71

<210> 11
<211> 70
<212> RNA
<213> Umělá sekvence
<220>
<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina
<220>
<221> modifikovaná báze
<222> (1)..(70)
<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.

<400> 11

gggaggacga ugcgggccaac cucauuuuga cacuucgccg caccuaauug cccccagacg 60
acucgcccga 70

<210> 12

<211> 15

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(15)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(15)

<223> N v polohách 4 a 10 je A, G, 2'-F-U nebo 2'-F-C

<400> 12

gacnyuuccn gcayc

15

<210> 13

<211> 71

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(71)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.

<400> 13

gggaggacga ugcggaaccc auaacgcaa cccgaccaaca ugccucccg gccccagac 60
gacucgccc a 71

<210> 14
<211> 70
<212> RNA
<213> Umělá sekvence
<220>
<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina
<220>
<221> modifikovaná báze
<222> (1)..(70)
<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.
<400> 14
gggaggacga ugcgugccc auagaagcgu gccgcuaaag cuaacgccc cccccagacg 60
acucgcccga 70

<210> 15
<211> 71
<212> RNA
<213> Umělá sekvence
<220>
<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina
<220>
<221> modifikovaná báze
<222> (1)..(71)
<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.
<400> 15
gggaggacga ugcgugccc acuaugcgug ccgaaaaaca uuucccccuc uaccccagac 60
gacucgccc a 71

<210> 16
<211> 71
<212> RNA
<213> Umělá sekvence
<220>
<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina
<220>
<221> modifikovaná báze
<222> (1)..(71)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.

<400> 16

gggaggacga ugcggaacac uuucccaugc gucgccauac cggauauauu gcucccagac 60
gacucgccccg a 71

<210> 17

<211> 71

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(71)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.

<400> 17

gggaggacga ugcggacugg accaaaccgu cgccgauacc cggauacuuu gcucccagac 60
gacucgccccg a 71

<210> 18

<211> 71

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(71)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.

<400> 18

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguuaugg auguuuugcu cccugcagac 60
gacucgccccg a 71

<210> 19
<211> 71
<212> RNA
<213> Umělá sekvence
<220>
<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina
<220>
<221> modifikovaná báze
<222> (1)..(71)
<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.
<400> 19
gggaggacga ugcgguaaag ucucgguuga augcccaucc cagaucacccc ugacccagac 60
gacucgccccg a 71

<210> 20
<212> RNA
<213> Umělá sekvence
<220>
<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina
<220>
<221> modifikovaná báze
<222> (1)..(71)
<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.
<400> 20
gggaggacga ugcggauaggc aagucgaacc aucccccacg cuucuccugu ucccccagac 60
gacucgccccg a 71

<210> 21
<211> 71
<212> RNA
<213> Umělá sekvence
<220>
<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina
<220>
<221> modifikovaná báze
<222> (1)..(71)
<400> 21

gggaggacga ugcgggaagu uuucucugcc uugguuucga ugggcgccuc ccccccagac 60
gacucgccccg a 71

<210> 22

<211> 71

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(71)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.

<400> 22

gggaggacga ugcggucgag cggucgaccg ucaacaagaa uaaagcgugu ccucgcagac 60
gacucgccccg a 71

<210> 23

<211> 71

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(71)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.

<400> 23

gggaggacga ugcggauaggc aagucgaacc aucccccacg cuucuccugu ucccccagac 60
gacucgccccg a 71

<210> 24

<211> 76

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(76)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.

<400> 24

gggaggacga ugcggacuag accgcgaguc cauucaacuu gcccaaaaaa aaaccucccc 60
cagacgacuc gcccgga 76

<210> 25

<211> 71

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(71)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.

<400> 25

gggaggacga ugcggggagau caacauuccu cuaguuuugu uccaaccuac acccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 26

<211> 71

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(71)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.

<400> 26

gggaggacga ugcggacgag cgucucauga ucacacuauu ucgucucagu gugcacagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 27

<211> 71

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(71)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.

<400> 27

gggaggacga ugcggucgac cucgaaugac ucuccaccua ucuaacaucc ccccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 28

<211> 71

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(71)

<400> 28

gggaggacga ugcggucgac cucgaaugac ucuccaccua ucuaacagcc uccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 29

<211> 71

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina
<220>
<221> modifikovaná báze
<222> (1)..(71)
<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.
<400> 29
gggaggacga ugcggagaac ucauccuaac cgcucuaaca aaucuugucc gaccgcagac 60
gacucgccccg a 71

<210> 30
<211> 71
<212> RNA
<213> Umělá sekvence
<220>
<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina
<220>
<221> modifikovaná báze
<222> (1)..(71)
<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.
<400> 30
gggaggacga ugcggauaau ucgacaccaa ccaggucccg gaaaucaucc cucugcagac 60
gacucgccccg a 71

<210> 31
<211> 71
<212> RNA
<213> Umělá sekvence
<220>
<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina
<220>
<221> modifikovaná báze
<222> (1)..(71)
<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.

<400> 31

gggaggacga ugcggaacc aaccguugac caccuuuucg uuuccggaaa guccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 32

<211> 71

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(71)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.

<400> 32

gggaggacga ugcggaagcc aaccucuag ucagccuuuc guuucccacg ccaccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 33

<211> 72

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(72)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.

<400> 33

gggaggacga ugcgggacca acuaaacugu ucgaaagcug gaacaugucc ugacgccaga 60
cgacucgccc ga 72

<210> 34

<211> 71

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina
<220>
<221> modifikovaná báze
<222> (1)..(71)
<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.
<400> 34
gggaggacga ugcggaacaa cuaaacuguu cgaaagcugg aacacguccu gacgccagac 60
gacucgccccg a 71

<211> 71
<212> RNA
<213> Umělá sekvence
<220>
<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina
<220>
<221> modifikovaná báze
<222> (1)..(71)
<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.
<400> 35
gggaggacga ugcggaacaa cuaaacuguu cgaaagcuag aacacgucca gacgccagac 60
gacucgccccg a 71

<210> 36
<211> 71
<212> RNA
<213> Umělá sekvence
<220>
<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina
<220>
<221> modifikovaná báze
<222> (1)..(71)
<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.

<400> 36

gggaggacga ugcggaccaa cuaaacuguu cgaaagcugg aacacguucu gacgccagac 60
gacucgccccg a 71

<210> 37

<211> 71

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(71)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.

<400> 37

gggaggacga ugcggaccaa cuaaacuguu cgaaagcugg aauacguucu gacgccagac 60
gacucgccccg a 71

<210> 38

<211> 71

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(71)

<400> 38

gggaggacga ugcggaaguu uagugcucca guuccgacac uccucuacuc agccccagac 60
gacucgccccg a 71

<210> 39

<211> 71

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina
<220>
<221> modifikovaná báze
<222> (1)..(71)
<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.
<400> 39
gggaggacga ugcgaggacca gagccucucu caguucuaca gaacuuaccc acuggcagac 60
gacucgccccg a 71

<210> 40
<211> 71
<212> RNA
<213> Umělá sekvence
<220>
<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina
<220>
<221> modifikovaná báze
<222> (1)..(71)
<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.
<400> 40
gggaggacga ugcgaggaccua acucaaucag gaaccaaacc uagcacucuc auggccagac 60
gacucgccccg a 71

<210> 41
<211> 71
<212> RNA
<213> Umělá sekvence
<220>
<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina
<220>
<221> modifikovaná báze
<222> (1)..(71)
<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.
<400> 41
gggaggacga ugcgggagau caacauuccu cuaguuuggu uccaaccuac acccccagac 60
gacucgccccg a 71

<210> 42
<211> 71
<212> RNA
<213> Umělá sekvence
<220>
<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina
<220>
<221> modifikovaná báze
<222> (1)..(71)
<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.
<400> 42
gggaggacga ugcggaucuc gaucuuucag cacuucauuu cauuccuuuc ugccccagac 60
gacucgccccg a 71

<210> 43
<211> 71
<212> RNA
<213> Umělá sekvence
<220>
<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina
<220>
<221> modifikovaná báze
<222> (1)..(71)
<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.
<400> 43
gggaggacga ugcggacgau ccuuuccuua acauuucauc auuucucuug ugccccagac 60
gacucgccccg a 71

<210> 44
<211> 71
<212> RNA
<213> Umělá sekvence
<220>
<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina
<220>
<221> modifikovaná báze
<222> (1)..(71)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.

<400> 44

gggaggacga ugcggugacg acaacucgac ugcauauucuc acaacuccug ugccccagac 60
gacucgccccg a 71

<211> 72

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(72)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.

<400> 45

gggaggacga ugcggacuag accgcgaguc cauucaacuu gcccaaaaac cuccccagac 60
cgacucgccc ga 72

<210> 46

<211> 70

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(70)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F.

<400> 46

gggaggacga ugcgggacga ucgagcaaca uccgauucgg auuccuccac uccccagac 60
gacugccccga 70

<210> 47

<211> 50

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(50)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F; vazba v polohách 50
a 51 je 3'-3'.

<400> 47

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu 50

<210> 48

<211> 55

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(55)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F; vazba v polohách 55
a 56 je 3'-3'.

<400> 48

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu cccug 55

<210> 49

<211> 55

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(55)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F; G v polohách 1-3, 5
a 55 jsou modifikované 2'OMe; a v poloze 4 je 2'OMe;
vazba v polohách 55 a 56 je 3'-3'.

<400> 49

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu ccug 55

<210> 50

<211> 55

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<222> (1)..(55)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F; G v polohách 6, 9, 12 a 14 jsou modifikované 2'OMe; A v polohách 7 a 10 jsou modifikované 2'OMe; vazba v polohách je 3'-3'.

<400> 50

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu ccug 55

<210> 51

<211> 55

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(55)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F; g v polohách 15 a 22 jsou modifikované 2'OMe; a v polohách 16-17, 19-20 a 24 jsou modifikované 2'OMe; vazba v polohách 55 a 56 je 3'-3'.

<400> 51

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu ccug 55

<210> 52

<211> 55

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(55)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F; g v polohách 38, 41
a 44 jsou 2'OMe; vazba v polohách 55 a 56 je 3'-3'.

<400> 52

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccgaaugg auguuuugcu ccug 55

<210> 53

<211> 55

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(55)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F; g v polohách 39-40,
43 a 48 jsou 2'OMe; a's v polohách 36-37 a 41
jsou 2'OMe; vazba v polohách 55 a 56 je 3'-3'.

<400> 53

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccgaaugg auguuuugcu ccug 55

<210> 54

<211> 55

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(55)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F; g v polohách 1-3,
5-6, 9, 12, 14-15, 22, 28, 31, 34, 39-40, 43, 48
a 55 jsou 2'OMe.

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(55)

<223> a v polohách 7, 10, 16-17, 19-20, 24, 36-37,

a 41 jsou 2'OMe; vazba v polohách 55 a 56 je 3'-3'.

<400> 54

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu cccug 55

<210> 55

<211> 55

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(55)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F; g v polohách 1-3,

5-6, 9, 12, 14-15, 22, 39-40, 43, 48 a 55 jsou 2'OMe; a v polohách

4,7, 10, 16-17,19-20, 24-36-37, 40 jsou 2'OMe.

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(55)

<223> Vazba v polohách 55 a 56 je 3'-3'.

<400> 55

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu cccug 55

<210> 56

<211> 55

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(55)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F; g v polohách 1-3,

5-6, 15, 22, 39-40, 43, 48 a 55 jsou 2'OMe; a v polohách 4, 16-17,

19-20, 24 36-37 a 40 jsou 2'OMe; vazba v polohách 55 a 56 je 3'-3'.

<400> 56

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu ccug 55

<210> 57

<211> 55

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(55)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F; g v polohách 1-3, 5, 15, 22, 39-40, 43, 48, 55 jsou 2'OMe; a v polohách 4, 7, 16-17, 19-20, 24, 36-37, 40 jsou 2'OMe; vazba v polohách 55, 56 je 3'-3'.

<400> 57

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu ccug 55

<210> 58

<211> 55

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(55)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F; g v 1-3, 5, 9, 15, 22, 39-40, 43, 48, 55 jsou 2'OMe; a v 4, 16-17, 19-20, 24, 36-37, 41 jsou 2'OMe; vazba v 55, 56 je 3'-3'.

<400> 58

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu ccug 55

<210> 59
<211> 55
<212> RNA
<213> Umělá sekvence
<220>
<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina
<220>
<221> modifikovaná báze
<222> (1)..(55)
<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F; g v 1-3, 5, 15, 22,
39-40, 43, 48 a 55 jsou 2'OMe; a v 4, 10, 16-17, 19-20, 24, 36-37,
a 41 jsou 2'OMe; vazba v 55 a 56 je 3'-3'.

<400> 59
gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccgaaugg auguuuugcu ccug 55

<210> 60
<211> 55
<212> RNA
<213> Umělá sekvence
<220>
<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina
<220>
<221> modifikovaná báze
<222> (1)..(55)
<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F; g v 1-3, 5, 12, 14-15,
22, 39-40, 43, 48 a 55 jsou 2'OMe; a v 4, 16-17, 19-20, 24, 36-37 a
41 jsou 2'OMe; vazba v 55 a 56 je 3'-3'.

<400> 60
gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccgaaugg auguuuugcu ccug 55

<210> 61
<211> 55
<212> RNA
<213> Umělá sekvence
<220>
<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina
<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(55)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F; g v 1-3, 6, 15, 22, 28, 39-40, 43, 48, a 55 jsou 2'OMe; a v 4, 16-17, 19-20, 24, 36-37 a 40 jsou 2'OMe; vazba v 55 a 56 je 3'-3'.

<400> 61

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu ccug 55

<210> 62

<211> 55

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(55)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F; g v 1-3, 5, 15, 22, 39-40, 43, 48 a 55 jsou 2'OMe; a v 4, 16-17, 19-20, 27, 36-37 a 40 jsou 2'OMe; vazba v 55 a 56 je 3'-3'.

<400> 62

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu ccug 55

<210> 63

<211> 55

<212> RNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(55)

<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F; g v 1-3, 5, 15, 22, 39-40, 43, 48 a 55 jsou 2'OMe; a v 4, 16-17, 19-20, 24, 36-37, a 40 jsou 2'OMe; vazba v 55 a 56 je 3'-3'.

<400> 63

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu ccug 55

<210> 64
<211> 39
<212> RNA
<213> Umělá sekvence
<220>
<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina
<220>
<221> modifikovaná báze
<222> (1)..(39)
<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F; g v polohách 2-3,
5-6, 23-24, 27, 32, a 39 jsou 2'OMe; a v polohách 4, 7, 20-21, a 25
jsou 2'OMe.
<220>
<221> modifikovaná báze
<223> Vazba v polohách 39 a 40 je 3'-3'.
<220>
<221> modifikovaná báze
<222> (1)..(39)
<223> N v poloze 10 je (CH₂CH₂O)₆
<400> 64
gggaggacgn cgucgccgua auggauguuu ugcucccug 39

<210> 65
<211> 34
<212> RNA
<213> Umělá sekvence
<220>
<223> Popis umělé sekvence: Nukleová kyselina
<220>
<221> modifikovaná báze
<222> (1)..(34)
<223> Všechny pyrimidiny jsou modifikované 2'F; g v polohách 2-3,
5-6, 23-24, 27 a 32 jsou 2'OMe; a v polohách 4, 7, 20-21, a 25
jsou 2'OMe
<220>
<221> modifikovaná báze
<222> (1)..(34)
<223> N v poloze 10 je (CH₂CH₂O)₆

<220>

<221> modifikovaná báze

<222> (1)..(34)

<223> vazba v polohách 34 a 35 je 3' - 3'

<400> 65

gggaggacgn cgucgccgua auggauguuu ugcu

34

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Ligandová nukleová kyselina k tenascinu-C identifikovaná způsobem, který obsahuje následující kroky:

a) kandidátní směs nukleových kyselin se přivede do kontaktu s tenascinem-C, přičemž nukleová kyselina mající zvýšenou afinitu k tenascinu-C ve srovnání se zbytkem kandidátní směsi může být oddělena od zbytku kandidátní směsi,

b) nukleové kyseliny se zvýšenou afinitou se oddělí od zbytku kandidátní směsi, c) nukleové kyseliny se zvýšenou afinitou se amplifikuji,

c) čímž se připraví směs nukleových kyselin obohacená nukleovými kyselinami s relativně vysokou afinitou a specifitou pro vazbu k tenascinu-C, čímž je identifikována ligandová nukleová kyselina k tenascinu-C.

2. Ligandová nukleová kyselina podle nároku 1, kde kandidátní směs nukleových kyselin obsahuje jednořetězcové nukleové kyseliny.

3. Ligandová nukleová kyselina podle nároku 2, kde jednořetězcové nukleové kyseliny jsou ribonukleové kyseliny.

4. Ligandová nukleová kyselina podle nároku 3, kde kandidátní směs nukleových kyselin obsahuje ribonukleové kyseliny modifikované 2'-fluoroskupinou.

5. Purifikovaná a izolovaná ligandová nukleová kyselina k tenascinu-C, která se nevyskytuje v přírodě.

6. Purifikovaná a izolovaná ligandová nukleová kyselina k tenascinu-C, která se nevyskytuje v přírodě, podle nároku 5, kde ligandová nukleová kyselina je jednořetězcová.

7. Purifikovaná a izolovaná ligandová nukleová kyselina k tenascinu-C, která se nevyskytuje v přírodě, podle nároku 6, kde ligandová nukleová kyselina je RNA.

8. Purifikovaná a izolovaná ligandová RNA, která se nevyskytuje v přírodě, podle nároku 7, kde ligandová RNA obsahuje nukleotidy modifikované 2'-fluoroskupinou.

9. Purifikovaná a izolovaná ligandová RNA, která se nevyskytuje v přírodě, podle nároku 8, kde ligandová RNA je vybrána ze skupiny obsahující sekvenční uvedené v tabulkách 3 a 4 a na obrázku 2.

10. Způsob identifikace ligandové nukleové kyseliny k tenascinu-C v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kroky:

a) kandidátní směs nukleových kyselin se přivede do kontaktu s tenascinem-C, přičemž nukleová kyselina mající zvýšenou afinitu k tenascinu-C ve srovnání se zbytkem kandidátní směsi může být oddělena od zbytku kandidátní směsi,

b) nukleové kyseliny se zvýšenou afinitou se oddělí od zbytku kandidátní směsi,

c) nukleové kyseliny se zvýšenou afinitou se amplifikují, čímž se připraví směs nukleových kyselin obohacená nukleovými kyselinami s relativně vysokou afinitou a specifitou pro vazbu k tenascinu-C, čímž je identifikována ligandová nukleová kyselina k tenascinu-C.

11. Způsob podle nároku 10 v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje krok:

d) opakují se kroky a), b), a c).

12. Způsob podle nároku 10 v y z n a č u j í c í s e t í m, že kandidátní směs nukleových kyselin je složena z jednořetězcových nukleových kyselin.

13. Způsob podle nároku 12 v y z n a č u j í c í s e t í m, že jednořetězcové nukleové kyseliny jsou ribonukleové kyseliny.

14. Způsob podle nároku 13 v y z n a č u j í c í s e t í m, že nukleové kyseliny jsou ribonukleové kyseliny modifikované 2'-fluoroskupinou.

15. Komplex pro použití při *in vivo* diagnostice, který obsahuje ligandovou nukleovou kyselinu k tenascinu-C a marker.

16. Komplex podle nároku 15, kde ligandová nukleová kyselina k tenascinu-C byla identifikována způsobem, který obsahuje následující kroky:

a) kandidátní směs nukleových kyselin se přivede do kontaktu s tenascinem-C, přičemž nukleová kyselina mající zvýšenou afinitu k tenascinu-C ve srovnání se zbytkem kandidátní směsi může být oddělena od zbytku kandidátní směsi,

b) nukleové kyseliny se zvýšenou afinitou se oddělí od zbytku kandidátní směsi,

c) nukleové kyseliny se zvýšenou afinitou se amplifikují, čímž se připraví směs nukleových kyselin obohacená nukleovými kyselinami s relativně vysokou afinitou a specifitou pro vazbu

k tenascin-C, čímž je identifikována ligandová nukleová kyselina k tenascin-C.

17. Komplex podle nároku 16, kde kandidátní směs nukleových kyselin je složena z jednořetězcových nukleových kyselin.

18. Komplex podle nároku 17, kde jednořetězcové nukleové kyseliny jsou ribonukleové kyseliny.

19. Komplex podle nároku 18, kde nukleové kyseliny jsou ribonukleové kyseliny modifikované 2'-fluoroskupinou.

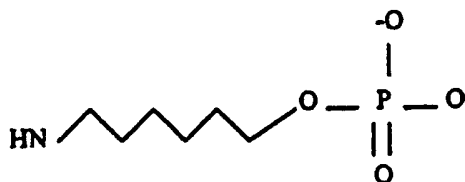
20. Komplex podle nároku 15, kde marker je vybrán ze skupiny obsahující radionuklidy, fluorofory, magnetické sloučeniny a biotin.

21. Komplex podle nároku 20, kde radionuklid je vybrán ze skupiny obsahující technecium-99m, Re-188, Cu-64, Cu-67, F-18, ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{32}P , a ^{186}Re .

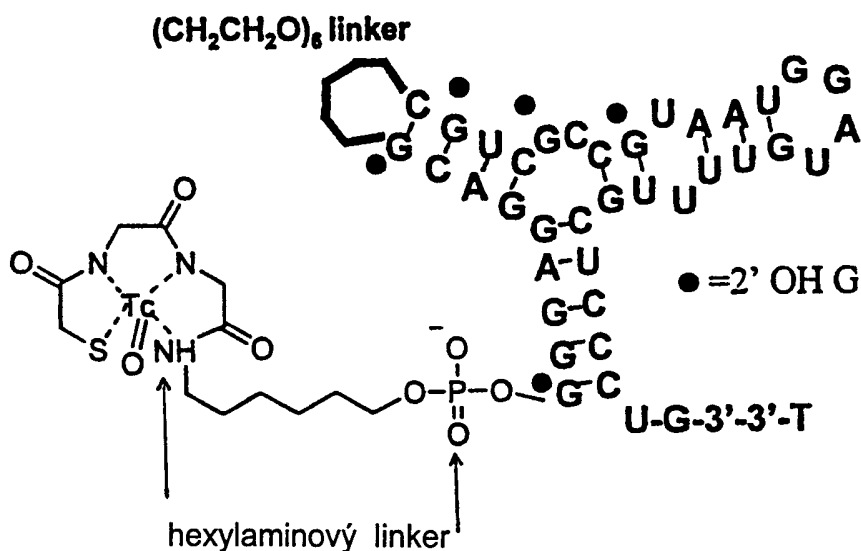
22. Komplex podle nároku 21, kde marker je technecium-99m.

23. Komplex podle nároku 22, který dále obsahuje linker.

24. Komplex podle nároku 23, kde linker má následující strukturu:



25. Komplex podle nároku 24, který je následující:



kde

všechny A jsou modifikované skupinou 2'-OMe,

všechny G, s výjimkou označených, jsou modifikované skupinou 2'-OMe,

všechny C jsou modifikované skupinou 2'-F a

všechny U jsou modifikované skupinou 2'-F.

26. Způsob přípravy komplexu obsahujícího ligandovou nukleovou kyselinu k tenascinu-C a marker vyznačující se tím, že obsahuje následující kroky:

a) kandidátní směs nukleových kyselin se přivede do kontaktu s tenascinem-C, přičemž nukleová kyselina mající zvýšenou afinitu k tenascinu-C ve srovnání se zbytkem kandidátní směsi může být oddělena od zbytku kandidátní směsi,

b) nukleové kyseliny se zvýšenou afinitou se oddělí od zbytku kandidátní směsi,

c) nukleové kyseliny se zvýšenou afinitou se amplifikují, čímž se připraví směs nukleových kyselin obohacená nukleovými kyselinami s relativně vysokou afinitou a specifitou pro vazbu k tenascinu-C, čímž je identifikována ligandová nukleová kyselina k tenascinu-C, a

d) na ligandovou nukleovou kyselinu k tenascinu-C se kovalentně naváže marker.

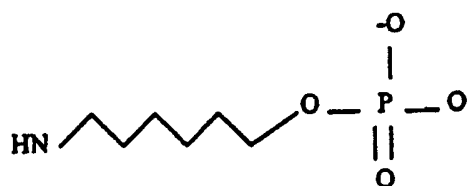
27. Způsob podle nároku 26 v y z n a č u j í c í s e t í m, že marker je vybrán ze skupiny obsahující radionuklidy, fluorofory, magnetické sloučeniny a biotin.

28. Způsob podle nároku 27 v y z n a č u j í c í s e t í m, že radionuklid je vybrán ze skupiny obsahující Tc-99m, Re-188, Cu-64, Cu-67, F-18, ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{32}P , a ^{186}Re .

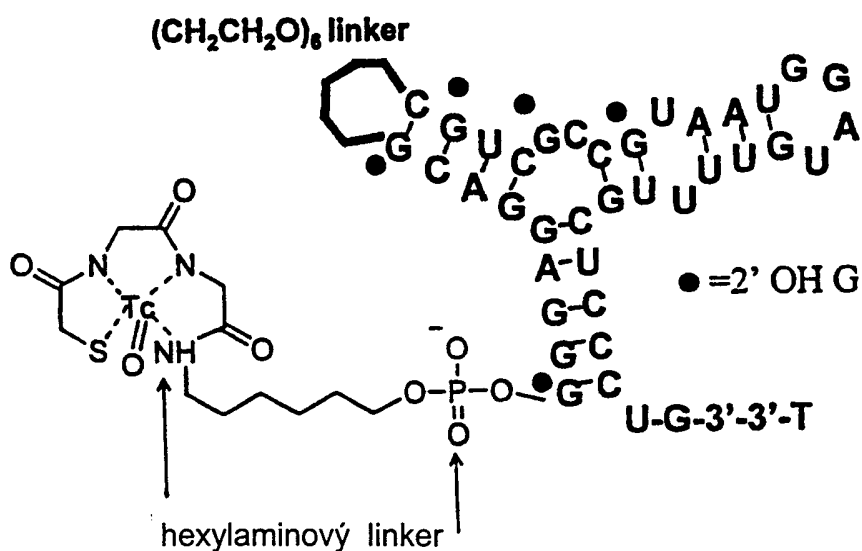
29. Způsob podle nároku 28 v y z n a č u j í c í s e t í m, že marker je Tc-99m.

30. Způsob podle nároku 29 v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje linker.

31. Způsob podle nároku 30 v y z n a č u j í c í s e t í m, že linker má následující strukturu:



32. Způsob podle nároku 31 v y z n a č u j í c í s e t í m, že komplex je následující:



kde

všechny A jsou modifikované skupinou 2'-OMe,

všechny G, s výjimkou označených, jsou modifikované skupinou 2'-OMe,

všechny C jsou modifikované skupinou 2'-F a

všechny U jsou modifikované skupinou 2'-F.

33. Způsob detekce přítomnosti nemoci, při které je exprimován tenascin-C v biologické tkáni, která je nemocí zasažena, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje následující kroky:

a) identifikuje se ligandová nukleová kyselina z kandidátní směsi nukleových kyselin, přičemž tato ligandová nukleová kyselina je ligandem k tenascinu-C, způsobem kdy

I) kandidátní směs nukleových kyselin se přivede do kontaktu s tenascinem-C, přičemž nukleová kyselina mající zvýšenou afinitu k tenascinu-C ve srovnání se zbytkem kandidátní směsi může být oddělena od zbytku kandidátní směsi,

II) nukleové kyseliny se zvýšenou afinitou se oddělí od zbytku kandidátní směsi,

III) nukleové kyseliny se zvýšenou afinitou se amplifikují, čímž se připraví směs nukleových kyselin obohacená o nukleové kyseliny s relativně vysokou afinitou a specifitou pro vazbu k tenascinu-C, čímž je identifikována ligandová nukleová kyselina k tenascinu-C, a

b) na ligandovou nukleovou kyselinu k tenascinu-C identifikovanou v kroku III se kovalentně naváže marker použitelný pro *in vivo* diagnostiku, čímž se připraví komplex marker-ligandová nukleová kyselina,

c) tkáň, která může obsahovat nádor, se vystaví komplexu marker-ligandová nukleová kyselina, a

d) detekuje se přítomnost komplexu marker-ligandová nukleová kyselina ve tkáni, čímž je identifikována nemoc, při které je exprimován tenascin-C.

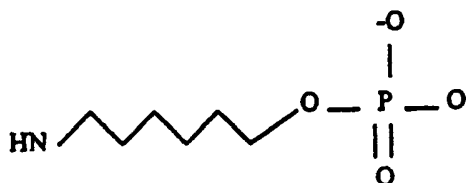
34. Způsob podle nároku 33 v y z n a č u j í c í s e t í m, že komplex marker-ligandová nukleová kyselina dále obsahuje linker.

35. Způsob podle nároku 34 v y z n a č u j í c í s e t í m, že marker je vybrán ze skupiny obsahující radionuklidy, fluorofory, magnetické sloučeniny a biotin.

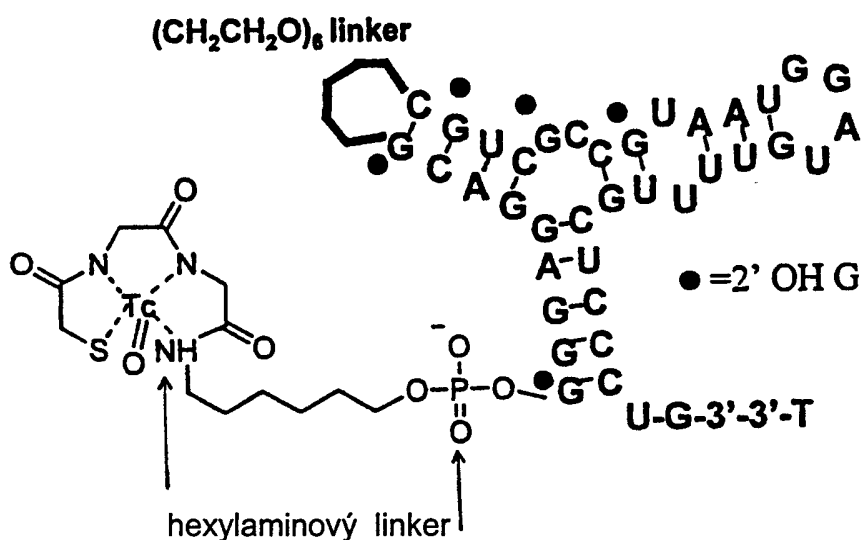
36. Způsob podle nároku 35 v y z n a č u j í c í s e t í m, že radionuklid je vybrán ze skupiny obsahující Tc-99m, Re-188, Cu-64, Cu-67, F-18, ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{32}P , a ^{186}Re .

37. Způsob podle nároku 36 v y z n a č u j í c í s e t í m, že marker je technecium-99m.

38. Způsob podle nároku 37 v y z n a č u j í c í s e t í m, že linker má následující strukturu:



39. Způsob podle nároku 38 v y z n a č u j í c í s e t í m, že komplex marker-ligandová nukleová kyselina je následující:



kde

všechny A jsou modifikované skupinou 2'-OMe,

všechny G, s výjimkou označených, jsou modifikované skupinou 2'-OMe,

všechny C jsou modifikované skupinou 2'-F a
všechny U jsou modifikované skupinou 2'-F.

40. Způsob podle nároku 33 v y z n a č u j í c í s e
t í m, že dále obsahuje krok, kdy se ke komplexu naváže
terapeutické nebo diagnostické činidlo.

41. Způsob podle nároku 33 v y z n a č u j í c í s e
t í m, že nemoc je vybrána ze skupiny obsahující rakovinu,
psoriázu a aterosklerózu.

42. Způsob podle nároku 41 v y z n a č u j í c í s e
t í m, že nemoc je rakovina.

43. Způsob podávání terapeutického činidla při nemoci,
kdy je exprimován tenascin-C, v y z n a č u j í c í s e
t í m, že obsahuje kroky, kdy

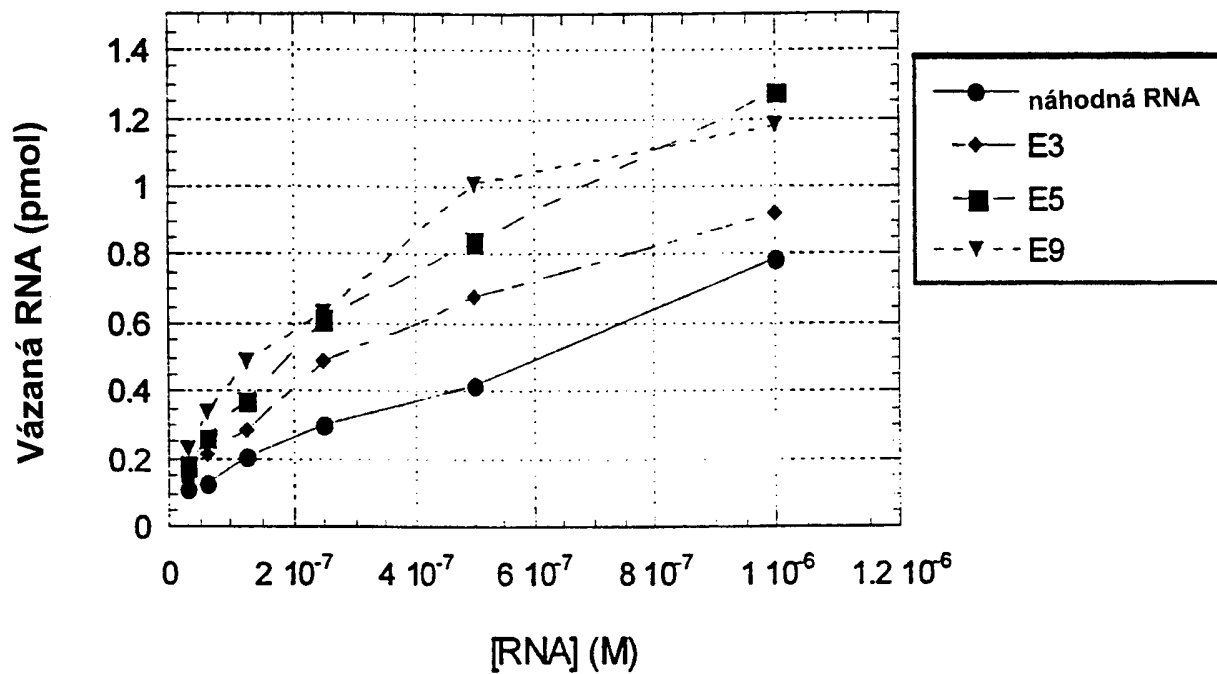
se ligandová nukleové kyseliny k tenascinu-C kovalentně
naváže na terapeutické činidlo a vytvoří s ním komplex,
a tento komplex se podává pacientovi.

29.01.03

PV 2002-365

4497

1/8



Obr. 1

29.01.00

PV 2002-365

4494

3/8

TTA1

nádor

nádor

TTA1.NB

nádor

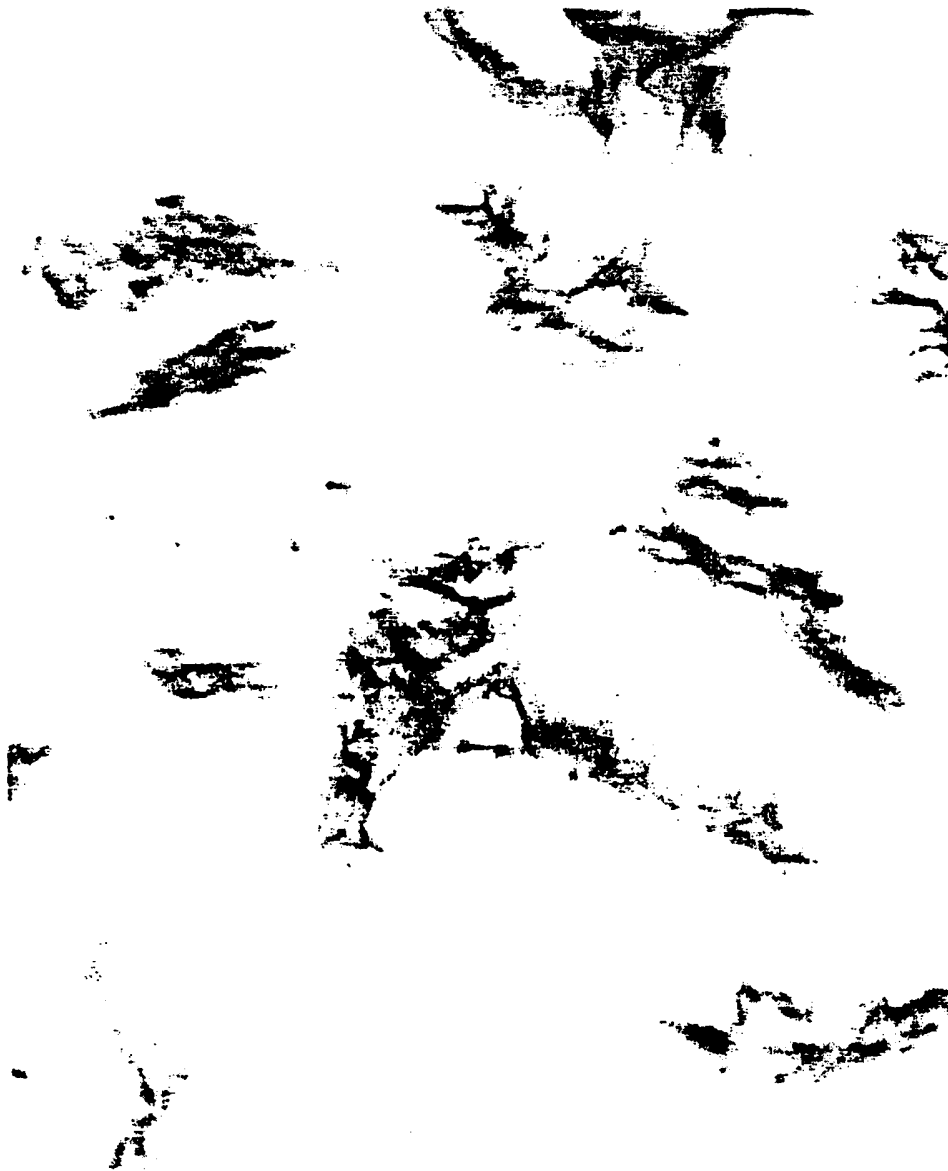
Obr. 3

29.01.02

PV 2002-365

~~4797~~

4/8



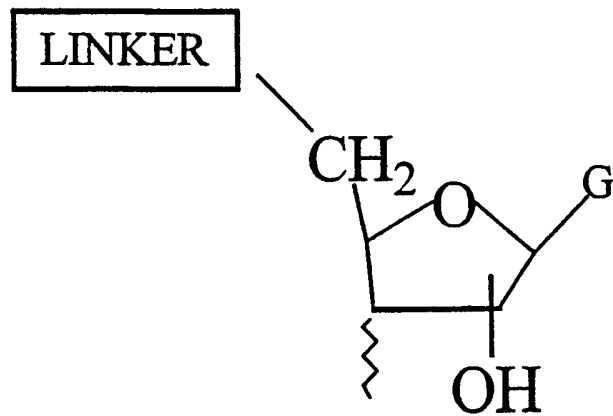
Obr. 4

29.01.02

PV 2002-365

~~7497~~

5/8



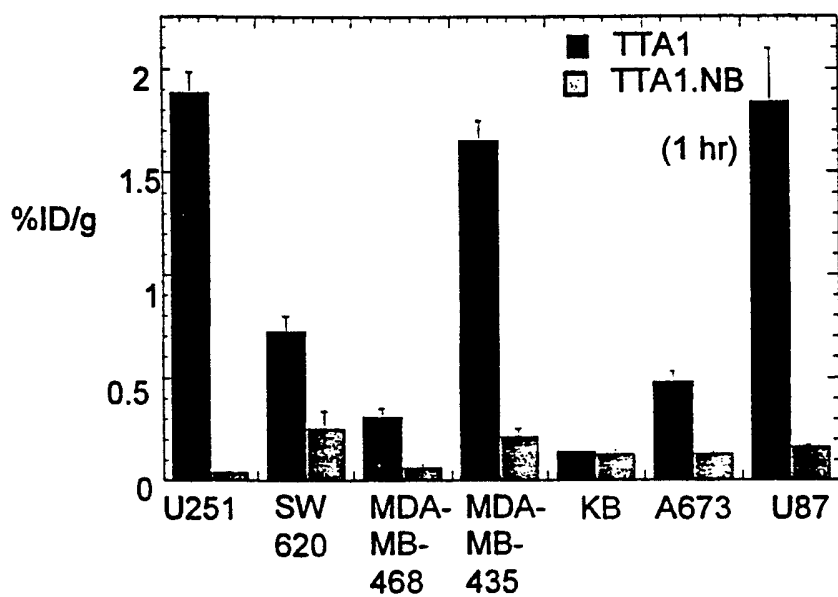
Obr. 5

29.01.02

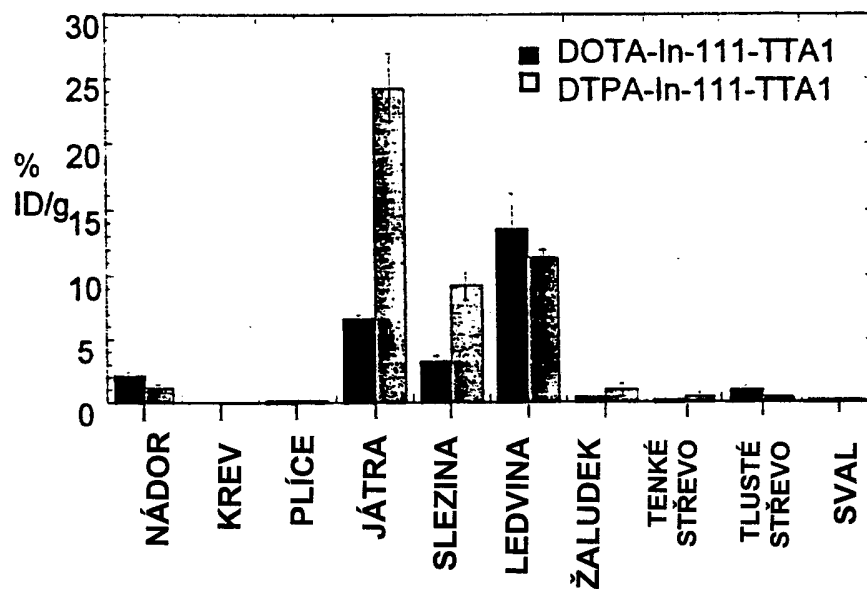
PV 2002-365

4494

6/8



Obr. 6.



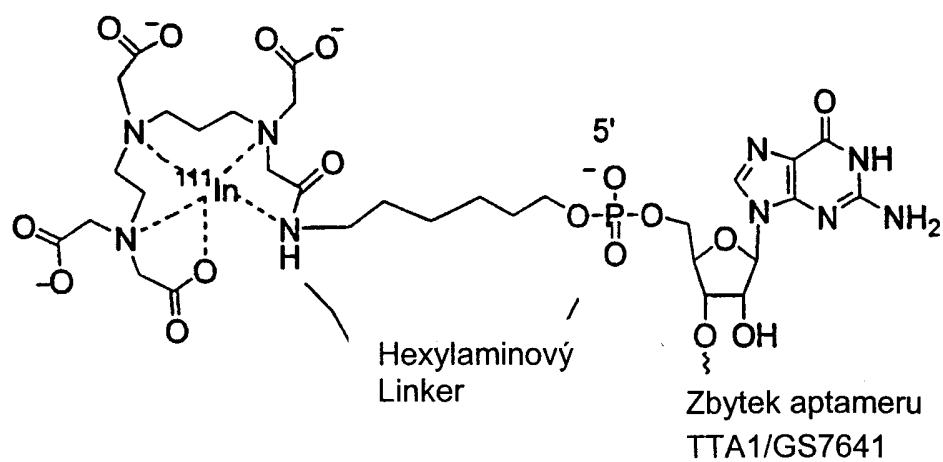
Obr. 7

29.01.02

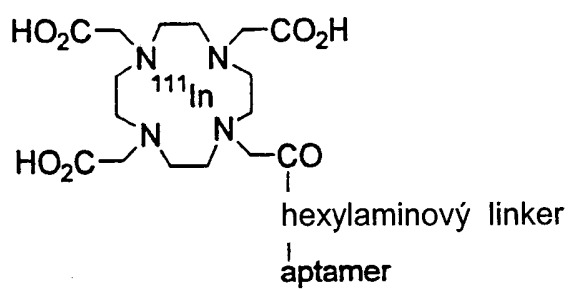
PI 2002-365

4497

7/8



Obr. 8



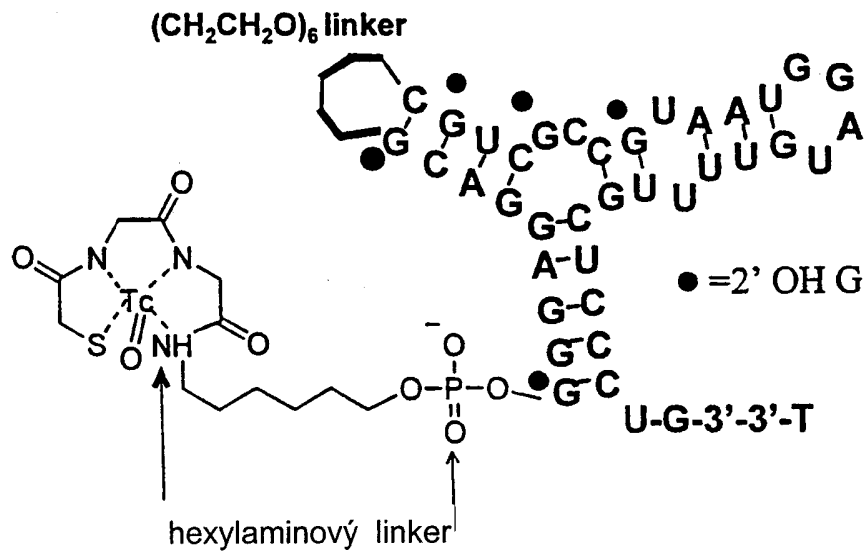
Obr. 9

29.01.02

PV 2002-365

~~7797~~

8/8



všechny A jsou modifikované skupinou 2'-OMe,

všechny G, s výjimkou označených, jsou modifikované skupinou 2'-OMe,

všechny C jsou modifikované skupinou 2'-F a

všechny U jsou modifikované skupinou 2'-F

Obr. 10