



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 10 244 T2 2006.01.19**

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 315 807 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 10 244.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/CA01/01252**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 969 101.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 02/020773**

(86) PCT-Anmeldetag: **04.09.2001**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **14.03.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **04.06.2003**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **20.04.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.01.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/11 (2006.01)**

C07H 21/00 (2006.01)

A61K 31/712 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

230414 P 06.09.2000 US

(73) Patentinhaber:

McGill University, Montreal, Quebec, CA

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**DAMHA, Jose, Masad, St-Hubert, CA; PARNIAK,
A., Michael, Pittsburgh, US; LOK, Chun-Nam,
Ottawa, CA; VIAZOVKINA, Ekaterina, Montreal,
Quebec H2X 1A7, CA**

(54) Bezeichnung: **CHIMERISCHE ANTISENSE-OLIGONUKLEOTIDE AUS ARABINOFURANOSE-ANALOGEN UND DEOXYRIBOSENUKLEOTIDE**

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

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

Beschreibung**HINTERGRUND DER ERFINDUNG****(a) Bereich der Erfindung**

[0001] Die Erfindung betrifft neue Oligonucleotid-Chimere, die als therapeutische Mittel verwendet werden, um selektiv Gen-Transkription und -Expression in einer sequenzspezifischen Weise zu verhindern. Im Speziellen ist diese Erfindung auf die selektive Inhibition von Protein-Biosynthese durch Antisense-Strategie unter Verwendung von Oligonucleotiden, die aus Arabinonucleotid- oder modifizierten Arabinonucleotid-Resten gebildet sind, die eine Reihe von Desoxyribose-Nucleotidresten von variabler Länge flankieren, ausgerichtet. Im Speziellen bezieht sich diese Erfindung auf die Verwendung von Antisense-Oligonucleotiden, die aus Arabinonucleotid- oder modifizierten Arabinonucleotid-Resten gebildet sind, die eine Reihe von Desoxyribose-Nucleotidresten von variabler Länge flankieren, um an komplementäre RNA wie zelluläre Boten-RNA, virale RNA, usw. zu hybridisieren. Im Spezielleren bezieht sich diese Erfindung auf die Verwendung von Antisense-Oligonucleotiden, die aus Arabinonucleotid- oder modifizierten Arabinonucleotid-Resten gebildet sind, die eine Reihe von Desoxyribose-Nucleotidresten von variabler Länge flankieren, um an die komplementäre RNA zu hybridisieren und Spaltung (durch RNaseH-Aktivierung) dieser zu induzieren.

(b) Beschreibung des Stands der Technik**Die Antisense-Strategie**

[0002] Antisense-Oligonucleotide (AON) sind therapeutische Mittel, die spezifische Gen-Expression in einer sequenzspezifischen Art und Weise verhindern können. Viele AON sind derzeit in klinischen Versuchen für die Behandlung von Krebs und viralen Erkrankungen. Für die klinische Anwendbarkeit sollten AON Stabilität gegenüber Abbau durch Serum und zelluläre Nucleasen aufweisen, niedrige nichtspezifische Bindung an Serum- und Zell-Proteine zeigen (da diese Bindung die Menge an Antisense-Oligonucleotid, die für Basenpaarung mit der Ziel-RNA verfügbar ist, verringern würde), verstärkte Erkennung der Ziel-RNA-Sequenz aufweisen (in anderen Worten, gesteigerte Stabilität des Antisense-Ziel-RNA-Duplexmoleküls bei physiologischen Temperaturen liefern) und zu einem gewissen Grad Zellmembran-Permeabilität zeigen. Man nimmt an, dass Antisense-Inhibition von Ziel-Gen-Expression durch mindestens zwei Hauptmechanismen erfolgt. Der erste ist „Translationsstop“, in dem die Bildung eines Duplexmoleküls zwischen dem Antisense-Oligomer und seiner Ziel-RNA die vollständige Translation jener RNA in Protein durch Blockieren der Fähigkeit des Ribosoms, die vollständige mRNA-Sequenz zu erkennen, verhindert. Der zweite und wahrscheinlich wichtigere Mechanismus betrifft die Fähigkeit des Antisense-Oligonucleotids, die Ribonuclease H (RNaseH)-katalysierte Degradierung der Ziel-mRNA zu steuern. RnaseH ist ein endogenes zelluläres Enzym, das spezifisch RNA degradiert, wenn es mit einer komplementären DNA-Nucleotid (oder Antisense-Oligonucleotid)-Komponente ein Duplexmolekül bildet. Zum Beispiel erkennt zelluläre RNaseH das resultierende DNA/RNA-HybridDuplexmolekülmolekül und degradiert dann die mRNA an jener Stelle, wenn ein Antisense-DNA-Oligonucleotid an eine zelluläre mRNA durch komplementäre Basenpaarung hybridisiert. Antisense-Oligonucleotide, die Gen-Expression durch beide Mechanismen modulieren können, sind höchst wünschenswert, da dies die potenzielle Wirksamkeit der Antisense-Verbindung in vivo erhöht.

Oligonucleotid-Analoge

[0003] Oligonucleotide, die natürliche (Ribose oder Desoxyribose) Zucker und Phosphodiester (PO)-Bindungen enthalten, werden schnell durch Serum- und intrazelluläre Nucleasen degradiert, was deren Nutzen als effektive therapeutische Mittel limitiert. Chemische Strategien, die Nuclease-Stabilität zu verbessern, schließen Modifizierung der Zucker-Einheit, der Basen-Einheit und/oder Modifizierung oder Ersatz der Phosphodiesterbindung zwischen den Nucleotiden ein. Bis jetzt sind die am weitesten untersuchten Analoge die Phosphorothioat (PS)-Oligodesoxynucleotide, in denen eines der nicht-Brücken-Sauerstoffatome in dem Phosphodiester-Gerüst durch einen Schwefel ersetzt ist. Zahlreiche S-DNA-Oligonucleotid-Analoge werden klinischer Versuchs-Bewertung zur Behandlung von Krebs, infektiösen Erkrankungen und anderen menschlichen Krankheiten unterzogen, und manche sind schon Gegenstände von New Drug Application (NDA)-Anträgen. S-DNA-Antisense können RNaseH-Degradierung der Ziel-mRNA hervorrufen, und sie sind einigermaßen widerstandsfähig gegenüber Degradierung durch Serum- und zelluläre Nucleasen. PS-DNA-Antisense tendieren jedoch dazu, weniger thermodynamisch stabile Duplexmoleküle mit der Ziel-RNA-Nucleinsäure zu bilden als Oligodesoxynucleotide mit Phosphodiester (PO)-Bindungen. Darüber hinaus kann S-DNA-Antisense weniger effizient sein im Hervorrufen von RNaseH-Degradierung der Ziel-RNA als die entsprechende PO-DNA.

[0004] Spezifität der Aktivität kann durch Entwicklung von neuen Oligonucleotid-Analogen verbessert werden. Derzeitige Strategien, neue Oligonucleotide herzustellen, sind, das Phosphatgerüst zwischen den Nucleotiden, die heterozyklische Base und den Zuckerring oder eine Kombination von diesen zu verändern. Änderung oder vollständiger Ersatz der Bindung zwischen den Nucleotiden ist mit über 60 Arten von modifizierten Phosphatgerüsten, die seit 1994 untersucht wurden, der beliebteste Ansatz. Abgesehen vom Phosphorothioatgerüst wurde nur von zwei anderen berichtet, dass sie RNaseH-Aktivität aktivieren, d.h. die Phosphorodithioat (PS₂)- und die Boranophosphonat-Gerüste. Auf Grund des höheren Schwefelgehalts von Phosphorodithioat gebundenen (PS₂)-Oligodesoxynucleotiden scheinen sie Proteine fester zu binden als die Phosphorothioat (PS)-Oligomere und RNaseH-vermittelte Spaltung mit reduzierter Wirksamkeit im Vergleich zum PS-Analog zu aktivieren. Boranophosphonatgebundene Oligodesoxynucleotide aktivieren RNaseH-vermittelte Spaltung von RNA-Zielen, aber weniger gut als PO- oder PS-gebundene Oligodesoxynucleotide.

[0005] Von den berichteten Zucker-modifizierten Oligonucleotiden enthalten die meisten einen fünfgliedrigen Ring, der dem Zucker von DNA (D-2-Desoxyribose) und RNA (D-Ribose) ziemlich gleicht. Ein Beispiel von diesen sind α -Oligodesoxynucleotid-Analoge, worin die Konfiguration des 1' (oder anomeren)-Kohlenstoffatoms umgedreht worden ist. Diese Analoge sind Nuclease-resistent, bilden stabile Duplexmoleküle mit DNA- und RNA-Sequenzen und können β -Globin mRNA-Translation durch einen RNaseH-unabhängigen Antisense-Mechanismus inhibieren. Andere Beispiele sind xylo-DNA, 2'-O-Me RNA und 2'-F-RNA. Diese Analoge bilden stabile Duplexmoleküle mit RNA-Zielen; diese Duplexmoleküle sind jedoch nicht Substrate für RNaseH. Um über diese Einschränkung hinweg zu kommen, sind Oligonucleotide mit gemischten Grundgerüsten („MBO“), die aus entweder Phosphodiester (PO)- oder Phosphorothioat (PS)-Oligodesoxynucleotid-Segmenten zusammengestellt sind, die auf beiden Seiten durch Zucker-modifizierte Oligonucleotid-Segmente flankiert sind, synthetisiert worden (Zhao, G. et al., *Biochem. Pharmacol.* 1996, 51, 173; Crooke, S.T. et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996, 277, 923). Von den MOBs ist das bisher am meisten untersuchte die [2'-OMe RNA]-[PS DNA]-[2'OMe RNA]-Chimere. Das PS-Segment in der Mitte der Kette dient als die RNaseH-Aktivierungs-Domäne, wohingegen die flankierenden 2'-OMe RNA-Regionen die Affinität des MBO-Strangs für die Ziel-RNA erhöhen. MOBs haben erhöhte Stabilität in vivo und scheinen in ihrer biologischen Aktivität sowohl in vitro als auch in vivo effizienter zu sein als Phosphorothioat-Analoge. Beispiele dieses Ansatzes, der 2'-Ome- und andere Alkoxy-Substituenten in den flankierenden Regionen eines Oligonucleotids inkorporiert, sind von Monia et al. durch verstärkte anti-Tumor-Aktivität in vivo gezeigt worden (Monia, P.B. et al. *Nature Med.* 1996, 2, 668). Einige vorklinische Versuche mit diesen Analogen sind im Gange.

[0006] Über die Synthese von Oligonucleotiden, die Hexopyranosen an Stelle von Pentofuranose-Zuckern enthalten, wurde auch berichtet. Ein paar dieser Analoge haben erhöhte enzymatische Stabilität, aber leiden im Allgemeinen unter einer reduzierten Duplexmolekül-Bildungskapazität mit der Ziel-Sequenz. Eine beachtenswerte Ausnahme sind 6'→4'-gebundene Oligomere, die aus 1,5-Anhydrohexit I-Einheiten gebildet sind, die auf Grund ihrer hohen vororganisierten Zuckerstruktur sehr stabile Komplexe mit RNA bilden. Für keine dieser Hexopyranose-Oligonucleotid-Analoge wurde jedoch gezeigt, dass sie RNaseH-Aktivität hervorrufen. Kürzlich sind Oligonucleotide, die völlig veränderte Grundgerüste enthalten, synthetisiert worden. Beachtenswerte Beispiele sind die Peptid-Nucleinsäuren („PNA“) mit einem azyklischen Grundgerüst. Diese Verbindungen haben außergewöhnliche Hybridisierungseigenschaften und Stabilität gegenüber Nucleasen und Proteasen. Bemühungen, PNA-Oligomere als Antisense-Konstrukte zu verwenden, sind jedoch durch schlechte Wasserlöslichkeit, Selbstaggregationseigenschaften, schlechte zelluläre Aufnahme und Unfähigkeit, RNaseH zu aktivieren, behindert worden. Vor kurzem sind PNA-[PS-DNA]-PNA-Chimeren konstruiert worden, um RNaseH-vermittelte Spaltung durch den PS-DNA-Teil der Chimere beizubehalten.

Arabinonucleoside und Arabinonucleinsäuren (ANA)

[0007] Arabinonucleoside sind Isomere von Ribonucleosiden, die sich nur in der Stereochemie an der 2'-Position des Zuckerrings unterscheiden. Wir haben kürzlich gezeigt, dass Antisense-Oligonucleotide, die gänzlich aus Nucleotiden, umfassend Arabinose- oder modifizierte Arabinose (besonders 2'-F-Arabinose)-Zucker, gebildet sind, in der Lage sind, RNaseH-Degradierung der komplementären Ziel-RNA hervorzurufen (Damha, M.J. et al. *JACS* 1998, 120, 12976; Noronha, A.M. et al. *Biochemistry* 2000, 39, 7050). Wir stellten auch fest, dass die Hitzestabilität von Duplexmolekülen, die aus einem Arabinose-Oligonucleotid mit RNA bestehen, geringer war als jene des analogen DNA/RNA-Duplexmoleküls (Noronha, A.M. et al. *Biochemistry* 2000, 39, 7050). Im Gegensatz dazu ist jedoch die Hitzestabilität von Duplexmolekülen, die aus einem Oligonucleotid bestehen, das mit 2'-F-Arabinose-Nucleotiden, die mit RNA hybridisiert sind, synthetisiert wird, im Allgemeinen größer als jene des analogen DNA/RNA-Duplexmoleküls (Damha, M.J. et al. *JACS* 1998, 120, 12976). Gianaris und Damha fanden, dass Ersatz der Phosphodiester (PO)-Bindung in ANA-Oligonucleotiden durch Phosphorothioat (PS)-Bindungen die Stabilität des PS-ANA/PO-RNA-Duplexmoleküls signifikant erniedrigt (Gian-

naris, P.A.; Damha, M.J. *Can. J. Chem.* 1994, 72, 909). Diese Destabilisierung war größer als jene, die beobachtet wurde, wenn die PO-Bindungen eines analogen DNA-Oligonucleotids durch S-Bindungen zwischen den Nucleotiden ersetzt wurden (Giannaris, P.A.; Damha, M.J. *Can. J. Chem.* 1994, 72, 909).

[0008] Watanabe und Mitarbeiter inkorporierten 2'-Desoxy-2'-fluor- α -D-arabinofuranosylpyrimidin-Nucleoside (2'-F-ara-N, wobei N=C, U und T) an einigen Positionen innerhalb eines Oligonucleotids, das vor allem eine PO-DNA-Kette umfasste, und bewerteten die Hybridisierungs-Eigenschaften von solchen (2'-F)ANA-DNA-„Chimeren“ gegenüber komplementärer DNA (Kois, P. et al. *Nucleosides & Nucleotides* 1993, 12, 1093). Substitutionen mit 2'-F-araU und 2'-F-araC destabilisierten Duplexmolekül-Stabilität im Vergleich zum Duplexmolekül aus nur DNA und RNA, wohingegen Substitutionen durch 2'-F-araT das Duplexmolekül stabilisierten. Marquez und Mitarbeiter bewerteten vor kurzem die Selbstassoziation eines DNA-Strangs, in dem zwei interne Thymidine durch 2'-F-araT's ersetzt wurden (Ikeda et al. *Nucleic Acids Res.* 1998, 26, 2237). Sie bestätigten die Ergebnisse von Watanabe und Mitarbeitern, dass interne 2'-F-araT-Reste die DNA-Doppelhelix signifikant stabilisieren. Über die Verbindung dieser (2'-F)ANA-DNA-„Chimeren“ mit komplementärer RNA (das typische Antisense-Ziel) wurde nicht berichtet. Siehe auch die Arbeit über 2'-F-RNA und 2'-F-ANA (Wilds et al. *Bioconjugate Chem.* 1999, 10, 299).

Hervorrufen von zellulärer RNaseH-Degradierung von Ziel-RNA durch Antisense-Oligonucleotide

[0009] Einer der wichtigsten Mechanismen für Antisense-Oligonucleotid-gerichtete Verhinderung von Gen-Expression ist die Fähigkeit dieser Antisense-Oligonucleotide, eine Struktur zu bilden, wenn sie mit der Ziel-RNA, die durch zelluläre RNaseH erkannt werden kann, ein Duplexmolekül bilden. Dies ermöglicht die RNaseH-vermittelte Degradierung des RNA-Ziels innerhalb der Region des Antisense-Oligonucleotid-RNA-basengepaarten Duplexmolekül (Monia et al. *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 14514).

[0010] RNaseH degradiert selektiv den RNA-Strang eines DNA/RNA-HeteroDuplexmolekül. RNaseH 1 vom Bakterium *Escherichia coli* ist das am leichtesten erhältliche und am besten charakterisierte Enzym. Untersuchungen mit eukaryontischen Zellextrakten, die RNaseH enthielten, legen nahe, dass sowohl prokaryontische als auch eukaryontische Enzyme ähnliche RNA-Spaltungseigenschaften aufweisen, obwohl das bakterielle Enzym besser in der Lage ist, Duplexmoleküle von kurzer Länge zu spalten (Monia et al. *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 14514). Von *E. coli*-RNaseH1 wird angenommen, dass sie in der kleinen Furche der DNA/RNA-Doppelhelix bindet und die RNA durch sowohl Endonuclease- als auch fortschreitende 3'-zu-5'-Exonuclease-Aktivitäten spaltet. Die Effizienz der RNaseH-Degradierung zeigt minimale Sequenzabhängigkeit und ist ziemlich empfindlich gegenüber chemischen Änderungen im Antisense-Oligonucleotid. Zum Beispiel kann RNaseH, während sie leicht RNA in S-DNA/RNA-Duplexmolekülen degradiert, dies nicht in Duplexmolekülen tun, die Methylphosphonat-DNA, α -DNA oder 2'-OMe-RNA-Antisense-Oligonucleotide mit RNA umfassen. Darüber hinaus, während *E. coli*-RNaseH an RNA/RNA-Duplexmoleküle bindet, kann sie keinen RNA-Strang spalten, trotz der Tatsache, dass die globale helikale Konformation von RNA/RNA-Duplexmolekülen jener von DNA/RNA-Substratduplexmolekülen („A“-Form-Helices) ähnlich ist. Diese Ergebnisse legen nahe, dass lokale strukturelle Unterschiede zwischen DNA/RNA (Substrat)- und RNA/RNA (Substrat)-Duplexmolekülen zu Substrat-Diskriminierung beitragen.

Arabinonucleinsäuren als Aktivatoren von RNaseH-Aktivität

[0011] Ein wesentliches Erfordernis im Antisense-Verfahren ist, dass ein Oligonucleotid oder sein Analog seine komplementäre Ziel-RNA erkennt und fest an sie bindet. Die Fähigkeit des resultierenden Antisense-Oligonucleotids/RNA-Duplexmoleküls, als ein Substrat von RNaseH zu dienen, wird wahrscheinlich therapeutischen Wert durch Verstärkung des Antisense-Effekts im Vergleich zu Antisense-Oligonucleotiden haben, die dieses Enzym nicht aktivieren können. Abgesehen von PS-DNA (Phosphorothioat), PS₂-DNA (Phosphorodithioat), Boranophosphonat-gebundener DNA und MBO-Oligos, die ein internes PS-DNA-Segment enthaften, sind die einzigen Beispiele von vollständig modifizierten Oligonucleotiden, die RNaseH-Aktivität hervorrufen, jene, die aus Arabinonucleotid (ANA)- oder modifizierten Arabinonucleotid-Resten gebildet sind (Internationale Anmeldung, publiziert unter No. WO 99/67378; Damha, M.J. et al. *JACS* 1998, 120, 12976; Noronha, A.M. et al. *Biochemistry* 2000, 39, 7050). Diese ANA-Oligonucleotide bewahren die natürliche β -D-Furanose-Konfiguration und ahmen die Konformation der DNA-Stränge nach (z.B. mit Zuckern, die in der C2'-Endo-Konformation gefaltet sind). Das letztere Erfordernis stammt von der Tatsache, dass der Antisense-Strang von natürlichen Substraten DNA ist, und dass, wie oben hingewiesen, seine primäre Struktur (und/oder Konformation) wesentlich zu sein scheint für RNaseH/Substrat-Spaltung; die DNA-Zucker von DNA/RNA-Hybriden nehmen vorwiegend die C2'-endo-Konformation an. ANA ist ein Stereoisomer von RNA, das sich nur in der Stereochemie an der 2'-Position des Zuckerrings unterscheidet. ANA/RNA-Duplexmoleküle nehmen eine helikale Struktur ein, die

sehr ähnlich ist zu jener von DNA/RNA-Substraten („A“-Form), was durch ähnliche Zirkulardichroismus-Spektren dieser Komplexe gezeigt wurde (Damha, M.J. et al. JACS 1998, 120, 12976; Noronha, A.M. et al. Biochemistry 2000, 39, 7050).

Oligonucleotid-Konstrukte mit gemischtem Rückgrat oder Zwischenteiler-Oligonucleotid-Konstrukte als Antisense-Oligonucleotide

[0012] Gemischt-Gerüst-Oligonucleotide (MBO) mit gemischtem Rückgrat, die aus einem Phosphodiester- oder Phosphorothioat-Oligodesoxynucleotid-„Zwischenteil“-Segment zusammengesetzt sind, das sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende durch Zucker-modifizierte Oligonucleotid-„Flügel“-Segmente flankiert ist, sind synthetisiert worden (Zhao, G. et al., Biochem. Pharmacol. 1996, 51, 173; Crooke, S.T. et al. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1996, 277, 923). Das derzeit wahrscheinlich am meisten untersuchte MBO ist die [2'-Ome-RNA]-[PS-DNA]-[2'Ome-RNA]-Chimere. Oligonucleotide, die nur 2'-Ome-RNA umfassen, binden mit sehr hoher Affinität an Ziel-RNA, aber können keine RNaseH-Degradierung jener Ziel-RNA hervorrufen. In [2'-Ome-RNA]-[PS-DNA]-[2'Ome-RNA]-Chimeren-Oligonucleotiden dient das PS-DNA-Segment in der Mitte der Kette dazu, RNaseH-Degradierung des Ziels hervorzurufen, wohingegen die flankierenden 2'-Ome-RNA-„Flügel“-Regionen die Affinität des MBO-Strangs für die Ziel-RNA erhöhen. MBOs haben erhöhte Stabilität in vivo und scheinen effektiver in ihrer biologischen Aktivität sowohl in vitro als auch in vivo zu sein als PS-DNA-Analoga mit gleicher Sequenz. Beispiele dieses Verfahrens der Inkorporation von 2'-Ome- und anderen Alkoxy-Substituenten in den flankierenden Regionen eines Oligonucleotids sind von Monia et al. durch verstärkte Antitumor-Aktivität in vivo gezeigt worden (Monia, P.B. et al. Nature Med. 1996, 2, 668). Einige vorläufige Versuche mit diesen Analogon sind im Gange.

[0013] Nichtsdestotrotz, da 2'-Ome-RNA nicht RNaseH-Aktivität hervorrufen kann, muss die DNA-Zwischenteil-Größe der [2'-Ome-RNA]-[PS-DNA]-[2'Ome-RNA]-Chimeren-Oligonucleotide vorsichtig definiert werden. Während E. coli-RNaseH 2'-Ome-RNA-MBO mit DNA-Zwischenteilen so klein wie 4 DNA-Nucleotide erkennen und verwenden kann (Shen, L.X. et al. 1998 Biorg. Med. Chem. 6, 1695), benötigt die eukaryontische RNaseH (wie menschliche RNaseH) wesentlich längere DNA-Zwischenteile (7 DNA-Nucleotide oder mehr) für optimale Degradierungs-Aktivität (Monia, B.P. et al 1993 J. Biol. Chem. 268, 14514). Im Allgemeinen sinkt bei [2'-Ome-RNA]-[PS-DNA]-[2'Ome-RNA]-Chimeren-Oligonucleotiden eukaryontische RNaseH-vermittelte Ziel-RNA-Spaltungseffizienz mit sinkender DNA-Zwischenteil-Länge und wird vermehrt vernachlässigbar mit DNA-Zwischenteil-Größen von weniger als 6 DNA-Nucleotiden. Daher ist die Antisense-Aktivität von [2'-Ome-RNA]-[PS-DNA]-[2'Ome-RNA]-Chimeren-Oligonucleotiden hochgradig abhängig von der DNA-Zwischenteil-Größe (Monia, B.P. et al 1993 J. Biol. Chem. 268, 14514; Agrawal, S. und Kandimalia, E.R. 2000 Mol. Med. Today, 6, 72).

[0014] Kürzlich sind Oligonucleotide, die völlig veränderte Grundgerüste enthielten, synthetisiert worden. Beachtenswerte Beispiele sind die Peptid-Nucleinsäuren („PNA“) mit einem azyklischen Grundgerüst. Diese Verbindungen haben außerordentliche Hybridisierungseigenschaften und Stabilität gegenüber Nucleasen und Proteasen. Bemühungen, PNA-Oligomere als Antisense-Konstrukte zu verwenden, sind jedoch durch schwache Wasserlöslichkeit, Selbst-Aggregationseigenschaften, schwache zelluläre Aufnahme und Unfähigkeit, RNaseH zu aktivieren, behindert worden. Vor ganz kurzer Zeit sind PNA-[PS-DNA]-PNA-Chimere konstruiert worden, um RNaseH-vermittelte Spaltung durch den PS-DNA-Teil der Chimere aufrecht zu erhalten.

[0015] Es würde höchst wünschenswert sein, mit Oligonucleotiden, die aus Arabinonucleotid- oder modifizierten Arabinonucleotid-Resten aufgebaut sind, die eine Reihe von Desoxyribose-Nucleotidresten von variabler Länge flankieren, zur sequenzspezifischen Verhinderung von Gen-Expression durch Verbindung mit (und RNaseH-vermittelten Spaltung von) komplementärer Boten-RNA ausgestattet zu sein.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

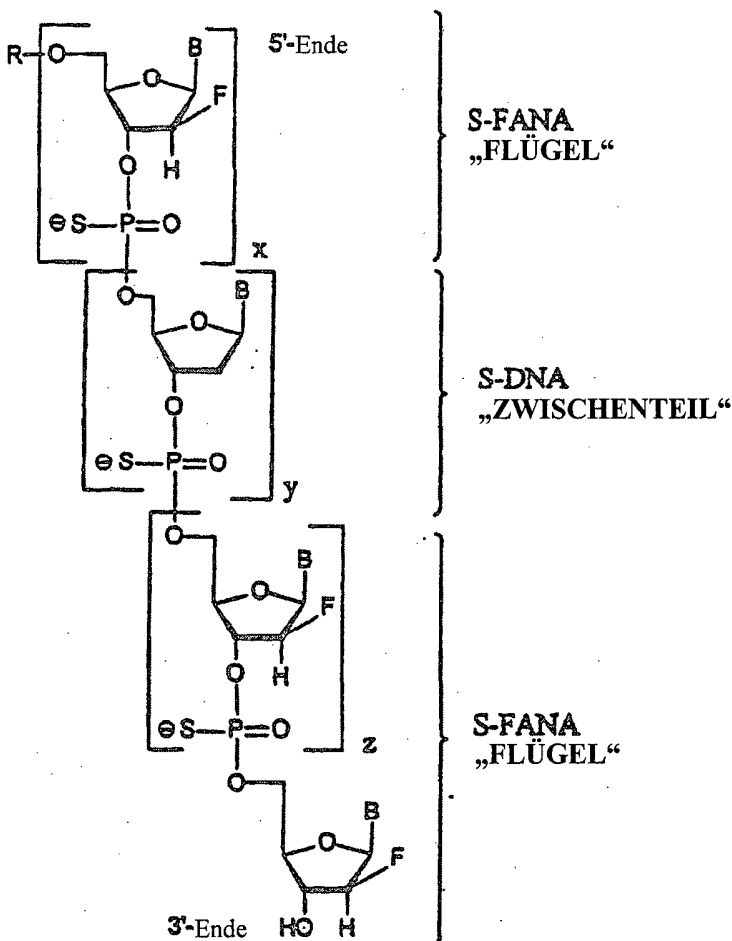
[0016] Ein Ziel der vorliegenden Erfindung ist, Antisense-Oligonucleotid-Chimeren zu liefern, die aus Arabinonucleotid- oder modifizierten Arabinonucleotid-Resten gebildet sind, die eine Reihe von Desoxyribose-Nucleotidresten von variabler Länge flankieren, die ein Duplexmolekül mit seiner Ziel-RNA-Sequenz bilden. Solch ein resultierendes Antisense-Oligonucleotid/RNA-Duplexmolekül ist ein Substrat für RNaseH, ein Enzym, das dieses Duplexmolekül erkennt und den RNA-Zielteil degradiert. RNaseH-vermittelte Spaltung von RNA-Zielen wird als ein wesentlicher Aktionsmechanismus von Antisense-Oligonucleotiden angesehen.

[0017] Die vorliegende Erfindung betrifft die Entdeckung, dass bestimmte Antisense-Hybrid-Chimere, besonders jene, die aus 2'-Desoxy-2'-fluor-β-D-arabinonucleotiden (FANA) gebildet sind, die eine definierte Sequenz

flankieren, die gebildet ist aus β -D-2'-Desoxyribonucleotiden (DNA), besser sind als Antisense-Hybrid-Chimere, die aus 2'-O-Methyl- β -D-ribonucleotiden (OMeNa) gebildet sind, die eine definierte Sequenz flankieren, gebildet aus β -D-2'-Desoxyribonucleotiden (DNA).

[0018] Dementsprechend haben Antisense-Hybrid-Chimere, gebildet aus 2'-Desoxy-2'-fluor- β -D-Arabinonucleotiden (FANA), flankierend eine definierte Sequenz, gebildet aus β -D-2'-Desoxyribonucleotiden (DNA), potenziellen Nutzen als therapeutische Agenzien und/oder Hilfsmittel für die Untersuchung und Kontrolle von spezifischer Gen-Expression in Zellen und Organismen.

[0019] Im Einklang mit der vorliegenden Erfindung wird eine Oligonucleotid„Chimere“ geliefert, um selektiv Gen-Expression in einer sequenzspezifischen Weise zu verhindern, die eine Chimere aus modifizierter Arabinose und 2'-Desoxy-Zuckern umfasst, die an Einzelstrang-RNA hybridisiert, um mindestens eines des folgenden zu induzieren: (a) Nuclease-Stabilität, (b) Bindungsstärke der Hybridisierung an komplementäre RNA-Sequenzen, (c) Permeabilität von diesen Oligonucleotiden in Zellen; (d) Spaltung von Ziel-RNA durch RNaseH; oder (e) physikalische Blockade von Ribose-Translokation („Translationsstop“), die die allgemeine Struktur hat:

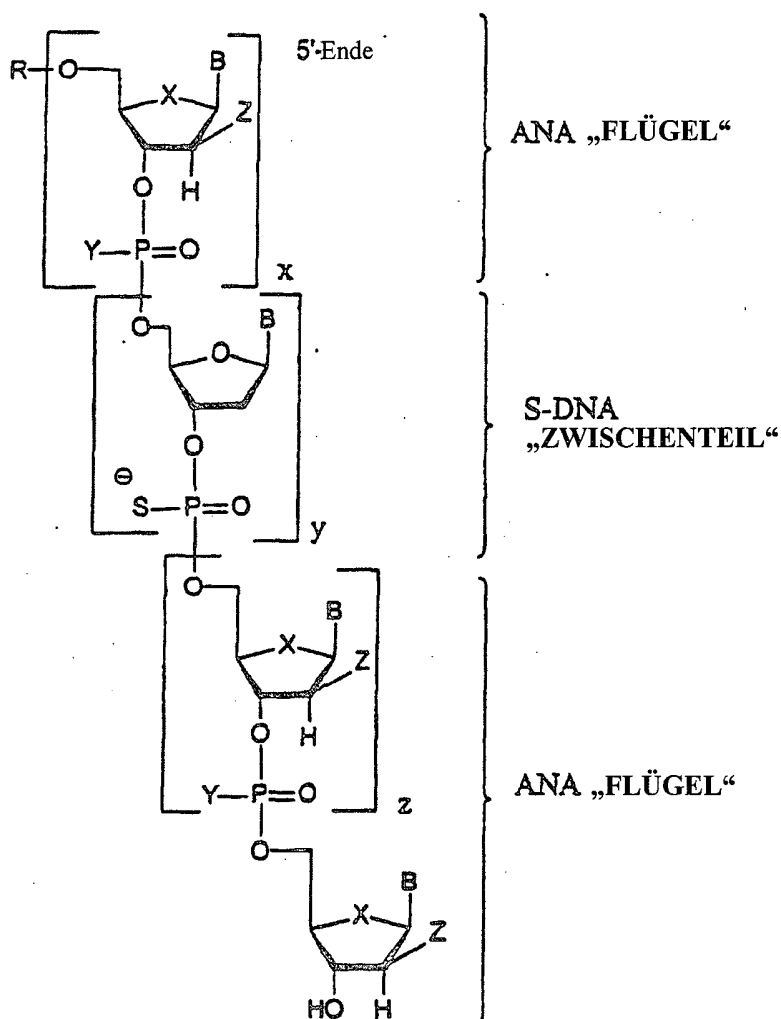


wobei

$x \geq 1$, $y \geq 1$ und $z \geq 0$ und

R ausgewählt ist aus einer Gruppe, bestehend aus Wasserstoff, Thiophosphat und einer Verbindungseinheit, die die zelluläre Aufnahme eines solchen Oligonucleotids verstärkt.

[0020] In Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung wird eine Oligonucleotid„Chimere“ geliefert, um selektiv Gen-Expression in einer sequenzspezifischen Weise zu verhindern, die eine Chimere aus modifizierter Arabinose und 2'-Desoxyzuckern umfasst, die an eine Einzelstrang-RNA hybridisiert, um mindestens eine der folgenden Eigenschaften zu induzieren: (a) Nuclease-Stabilität, (b) Bindungsstärke der Hybridisierung an komplementäre RNA-Sequenzen, (c) Permeabilität des Oligonucleotids in Zellen; (d) Spaltung der Ziel-RNA durch RNaseH; oder (e) physikalische Blockierung der Ribose-Translokation („Translationsstop“), wobei das Oligonucleotid die Formel aufweist:



wobei

$x \geq 1$, $y \geq 1$ und $z \geq 0$,

R ausgewählt ist aus einer Gruppe, bestehend aus Wasserstoff, Thiophosphat und einer Verbindungseinheit, die die zelluläre Aufnahme eines solchen Oligonucleotids fördert;

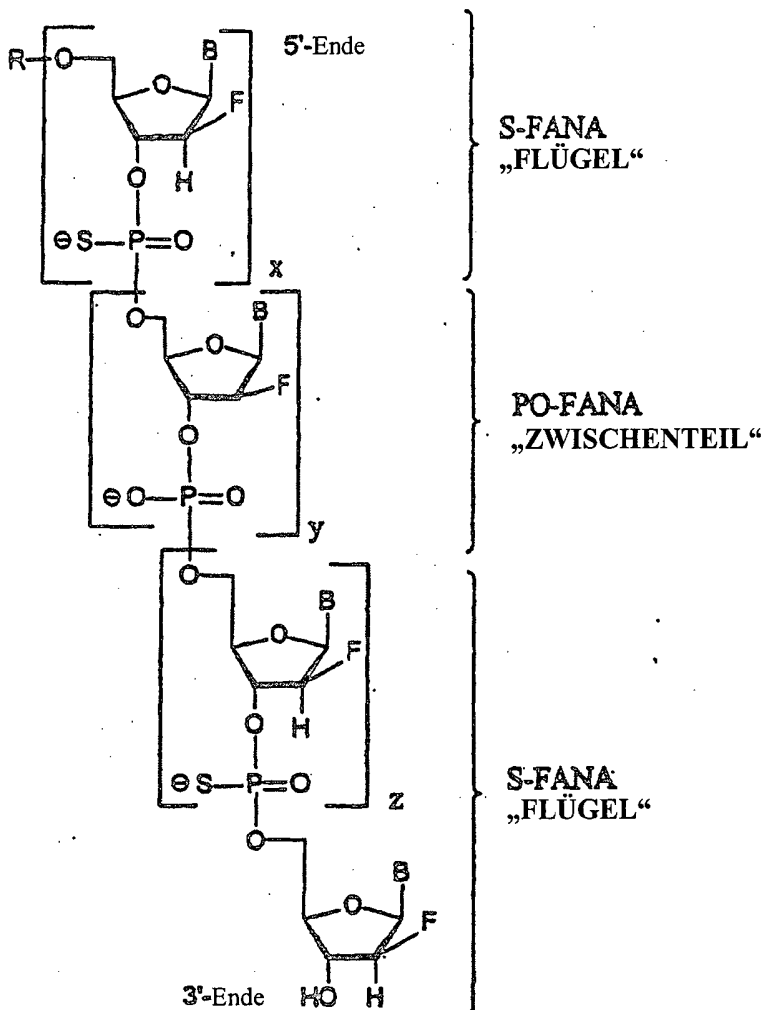
B ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Adenin, Guanin, Uracil, Thymin, Cytosin, Inosin und 5-Methylcytosin;

Y an der Phosphatverknüpfung zwischen Nucleotiden ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Schwefel, Sauerstoff, einem Methyl-, Amino-, Alkylamino-, Dialkylamino- (wobei die Alkylgruppe ein bis 20 Kohlenstoffatome besitzt), Methoxy- und Ethoxyrest;

X am Furanose-Ring (Position 4') ausgewählt ist aus den Gruppen Sauerstoff, Schwefel und Methylen (CH_2); und

Z an der 2'-Position des Zuckerrings ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus einem Halogen (Fluor, Chlor, Brom, Iod), einem Alkyl-, Alkylhalogenid- (z.B. $-\text{CH}_2\text{F}$), Allyl-, Amino-, Aryl-, Alkoxy- und Azid-.

[0021] In Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung wird eine Oligonucleotid„Chimere“ zur selektiven Verhinderung von Gen-Expression in einer sequenzspezifischen Weise geliefert, die eine Chimere aus modifizierter Arabinose und 2'-Desoxyzuckern umfasst, die an eine Einzelstrang-RNA hybridisiert, um mindestens eine der folgenden Eigenschaften zu induzieren: (a) Nuclease-Stabilität, (b) Bindungsstärke der Hybridisierung an komplementäre RNA-Sequenzen, (c) Permeabilität des Oligonucleotids in Zellen; (d) Spaltung von Ziel-RNA durch RNaseH; oder (e) physikalische Blockierung der Ribose-Translokation („Translationsstop“), wobei das Oligonucleotid die Formel aufweist:



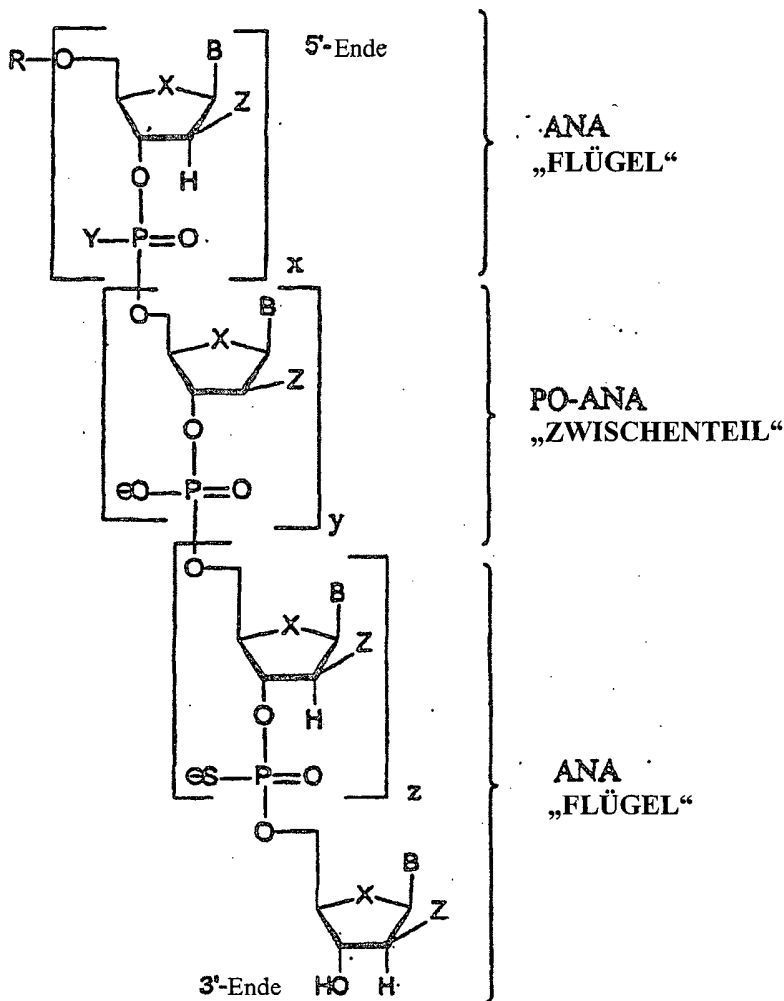
wobei

$x \geq 1$, $y \geq 1$ und $z \geq 0$,

R ausgewählt ist aus einer Gruppe, bestehend aus Wasserstoff, Thiophosphat und einer Verbindungseinheit, die die zelluläre Aufnahme eines solchen Oligonucleotids fördert;

B ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Adenin, Guanin, Uracil, Thymin, Cytosin, Inosin und 5-Methylcytosin.

[0022] In Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung wird eine Oligonucleotid„Chimere“ zur selektiven Verhinderung von Gen-Expression in einer sequenzspezifischen Weise geliefert, die eine Chimere aus modifizierter Arabinose und 2'-Desoxyzuckern umfasst, die an eine Einzelstrang-RNA hybridisiert, um mindestens eines der folgenden Eigenschaften zu induzieren: (a) Nuclease-Stabilität, (b) Bindungsstärke der Hybridisierung an komplementäre RNA-Sequenzen, (c) Permeabilität des Oligonucleotids in Zellen; (d) Spaltung von Ziel-RNA durch RNaseH; oder (e) physikalische Blockierung der Ribose-Translokation („Translationsstop“), wobei das Oligonucleotid die Formel aufweist:



wobei

$x \geq 1$, $y \geq 1$ und $z \geq 0$,

R ausgewählt ist aus einer Gruppe, bestehend aus Wasserstoff, Thiophosphat und einer Verbindungseinheit, die die zelluläre Aufnahme eines solchen Oligonucleotids fördert;

B ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Adenin, Guanin, Uracil, Thymin, Cytosin, Inosin und 5-Methylcytosin;

Y an der Phosphatverknüpfung zwischen Nucleotiden ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Schwefel, Sauerstoff, einem Methyl-, Amino-, Alkylamino-, Dialkylamino- (wobei die Alkylgruppe ein bis 20 Kohlenstoffatome besitzt), Methoxy- und Ethoxyrest;

X am Furanose-Ring (Position 4') ausgewählt ist aus den Gruppen Sauerstoff, Schwefel und Methylen (CH_2); und

Z an der 2'-Position des Zuckerrings ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus einem Halogen (Fluor, Chlor, Brom, Iod), Hydroxyl-, Alkyl-, Alkylhalogenid- (z.B. $-\text{CH}_2\text{F}$), Allyl-, Amino-, Aryl-, Alkoxy- und Azidrest.

[0023] In Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Spaltung von Einzelstrang-RNA geliefert, das die Schritte umfasst von:

- Hybridisieren eines Oligonucleotids der vorliegenden Erfindung in einer sequenzspezifischen Weise an eine Einzelstrang-RNA, um RNaseH-Aktivität zu induzieren; und
- Zulassen, dass die induzierte RNaseH die hybridisierte Einzelstrang-RNA spaltet.

[0024] In Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Verhinderung von Translation der Einzelstrang-RNA geliefert, das Hybridisieren von Chimär-Oligonucleotiden der vorliegenden Erfindung in einer sequenzspezifischen Weise an Einzelstrang-RNA umfasst und dabei die Produktion von spezifischem Protein verhindert, das durch die Einzelstrang-RNA codiert wird.

[0025] Die RNA kann komplementäre RNA wie zelluläre mRNA oder virale RNA sein.

[0026] In Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung wird die Verwendung eines Oligonucleotids der

vorliegenden Erfindung zur Herstellung eines Medikaments zur Spaltung von Einzelstrang-RNA geliefert, wobei das Oligonucleotid in einer sequenzspezifischen Weise an Einzelstrang-RNA hybridisiert, um RNaseH-Aktivität zur Spaltung der hybridisierten Einzelstrang-RNA zu induzieren.

[0027] In Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung wird die Verwendung eines Oligonucleotids der vorliegenden Erfindung zur Herstellung einer Sonde oder eines Labor-Reagenzes zur Spaltung von Einzelstrang-RNA geliefert, wobei das Oligonucleotid in einer sequenzspezifischen Weise an Einzelstrang-RNA hybridisiert, um RNaseH-Aktivität zur Spaltung der hybridisierten Einzelstrang-RNA zu induzieren.

[0028] In Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung wird ein Arzneimittel zur selektiven Verhinderung von Gen-Expression in einer sequenzspezifischen Weise geliefert, welches eine effektive Menge einer Oligonucleotid-„Chimere“ der vorliegenden Erfindung in Verbindung mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger umfasst.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0029] Fig. 1 zeigt die Wirksamkeit von verschiedenen Antisense-Oligonucleotiden, intrazelluläre Gen-Expression zu verhindern.

[0030] Fig. 2A–C zeigen den Vergleich von PS-DNA und PS-FANA-Zwischenstückmer (10 DNA)-Antisense-Oligonucleotiden, intrazelluläre Gen-Expression zu verhindern.

[0031] Fig. 3A–B zeigen den Effekt der Behandlung mit PS-DNA und PS-FANA-Zwischenstückmer (10 DNA)-Antisense-Oligonucleotiden auf zelluläres Luciferase-Protein und mRNA.

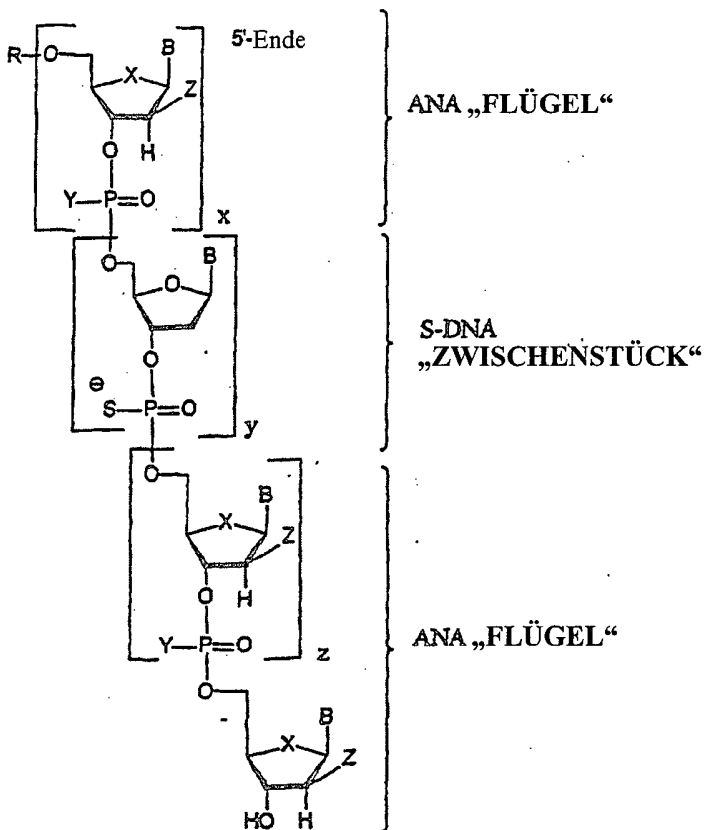
[0032] Fig. 4 zeigt den Effekt von DNA-„Zwischenstück“-Größe auf die Fähigkeit von Zwischenstückmer-Antisense-Oligonucleotiden, zelluläre, spezifische Gen-Expression zu verhindern.

[0033] Fig. 5 zeigt den Effekt von DNA-„Zwischenstück“-Größe auf die Fähigkeit von Zwischenstückmer-Antisense-Oligonucleotiden, zelluläre, spezifische Gen-Expression zu verhindern – Effekt der Antisense-Oligonucleotid-Konzentration.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0034] In Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung werden Antisense-Oligonucleotide geliefert, die aus Nucleotiden, die β -D-Arabinose- oder modifizierte β -D-Arabinose-Zuckereinheiten besitzen, gebildet sind, die eine Reihe von Desoxyribose-Nucleotidresten von variabler Länge flankieren, die ein Duplexmolekül mit ihrer Ziel-RNA-Sequenz bilden. Von β -D-Arabinose und seinen Derivaten und der therapeutischen Verwendung von solchen Verbindungen. Es ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, neue Antisense-Oligonucleotid-Analoga zu liefern, die an komplementäre Nucleinsäuren hybridisieren, die mRNA oder virale RNA (einschließlich retrovirale RNA) sein können, zum Zweck der Verhinderung der Expression von spezifischen Genen. Genauer bezieht sich diese Erfindung auf die Verwendung von Antisense-Oligonucleotiden, gebildet aus Nucleotiden, die β -D-Arabinose- oder modifizierte β -D-Arabinose-Zuckereinheiten besitzen, flankierend eine Reihe von Desoxyribose-Nucleotidresten von variabler Länge, um an spezifische Ziel-RNA-Sequenzen zu hybridisieren und die Spaltung der Ziel-RNA durch die Aktion von zellulärer RNaseH hervorzurufen.

[0035] Die Oligonucleotide dieser Erfindung können durch die folgende Formel (I) dargestellt werden:



wobei B eine allgemeine Purin- oder Pyrimidinbase wie Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin und Uracil einschließt, aber sich nicht notwendigerweise darauf beschränkt. Die Oligonucleotide schließen Strecken von DNA (DNA-„Zwischenstück“) ein, flankiert durch eine Anzahl von β -D-Arabinofuranose- oder modifizierten β -D-Arabinofuranose-Nucleotiden an den 5'- und 3'-Enden („Flügel“) des Antisense-Oligonucleotids, wodurch sie „Zwischenstückmere“ wie ANA-DNA-ANA, 2'-F-ANA-DNA-2'-F-ANA, usw. bilden. Die Phosphatverknüpfung zwischen den Nucleotiden schließt Sauerstoff, Schwefel, eines Methyl-, Amino-, Alkylamino-, Dialkylamino-, Methoxy- und Ethoxyrest ein, ist aber nicht notwendigerweise darauf beschränkt. Der 2'-Substituent des Arabinose-Zuckers schließt Fluor, Hydroxyl-, Amino-, Azid-, Methyl-, Methoxy- und andere Alkoxygruppen (z.B. Ethoxy-, Propoxy-, Methoxyethoxy-, usw.) ein, ist aber nicht darauf beschränkt.

[0036] Das Zwischenstückmer-Antisense-Oligonucleotid dieser Erfindung enthält eine Sequenz, die komplementär ist zu einer spezifischen Sequenz einer Boten-RNA oder einer viralen genomischen RNA, so dass das Zwischenstückmer-Oligonucleotid spezifisch die Biosynthese von Proteinen, die durch die mRNA codiert sind, verhindern beziehungsweise Virusreplikation verhindern kann. Teilweise Modifikationen am Oligonucleotid, die auf das 5' und/oder 3'-Ende oder das Phosphat-Grundgerüst oder die Zuckerreste gerichtet sind, um deren Antisense-Eigenschaften (z.B. Nuclease-Resistenz) zu fördern, sind innerhalb des Rahmens der Erfindung.

[0037] Eine bevorzugte Gruppe von Oligonucleotiden, die in dieser Erfindung nützlich sind, sind jene, wobei B eine natürliche Base (Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin, Uracil) ist, die Zuckereinheit der „Flügel“ β -D-2'-Desoxy-2'-F-Arabinofuranose ist, und die Phosphatverknüpfungen zwischen den Nucleotiden Schwefel (wie Phosphorothioat-Verknüpfungen) enthalten. Diese Modifikationen bringen Oligonucleotide hervor, die hohe Affinität für Einzelstrang-RNA aufweisen. Zusätzlich wurde für diese Oligonucleotide gezeigt, dass sie die Anforderungen, die notwendig sind für Antisense-Therapeutika, erfüllen. Zum Beispiel rufen sie Degradierung der Ziel-RNA durch zelluläre RNaseH hervor und senken dabei die intrazelluläre Menge von und Aktivität von dem spezifischen Protein, das durch die Ziel-RNA codiert wird.

[0038] Die Zwischenstückmer-Antisense-Oligonucleotide dieser Erfindung weisen eine Reihe von wünschenswerten Eigenschaften auf:

- (1) Es wurde gefunden, dass sie an Einzelstrang-RNA binden und diese durch Aktivierung von RNaseH spalten. Für die Zwischenstückmer-Oligonucleotide, die „Flügel“ besitzen, die aus β -D-2'-Desoxy-2'-F-Arabinofuranose-Nucleotide bestehen, wurden insbesondere gefunden, dass sie ausgezeichnete Affinität gegenüber RNA-Zielen haben, vergleichbar mit Zwischenstückmer-Oligonucleotiden, die „Flügel“ besitzen, die aus 2'-O-Methylribonucleotide bestehen, und eine signifikant bessere als jene von identischer DNA-Se-

quenz.

(2) Für die Zwischenstückmer-Oligonucleotide, die „Flügel“ besitzen, die aus β -D-2'-Desoxy-2'-F-Arabinofuranose-Nucleotide bestehen, wurde gefunden, dass sie besser sequenzspezifische Verhinderung von intrazellulärer Gen-Expression bewirken als die DNA-Oligonucleotide mit gleicher Sequenz. Mit großen DNA-Zwischenstücken (10 DNA-Oligonucleotide) war die intrazelluläre Antisense-Aktivität von Zwischenstückmer-Oligonucleotiden, die „Flügel“ besitzen, die aus β -D-2'-Desoxy-2'-F-Arabinofuranose-Nucleotiden bestehend, äquivalent zu jener von Zwischenstückmer-Oligonucleotiden mit gleicher Sequenz, die „Flügel“ besitzen, die aus 2'-O-Methylribonucleotiden bestehen. Mit kleineren DNA-Zwischenstücken (6 DNA oder weniger) war die intrazelluläre Antisense-Aktivität von Zwischenstückmer-Oligonucleotiden, die „Flügel“ besitzen, die aus β -D-2'-Desoxy-2'-F-Arabinofuranose-Nucleotiden bestehen, signifikant besser als jene von Zwischenstückmer-Oligonucleotiden mit gleicher Sequenz, die „Flügel“ besitzen, die aus 2'-O-Methylribonucleotiden bestehen.

[0039] Diese Beobachtungen legen fest, dass Zwischenstückmer-Oligonucleotide, die „Flügel“ besitzen, die aus β -D-2'-Desoxy-2'-F-Arabinofuranose-Nucleotiden, flankierend eine interne Sequenz von DNA (das „Zwischenstück“), bestehen, ausgezeichnete Modelle für Antisense-Oligonucleotid-Agenzien sind und als therapeutische und/oder wertvolle Hilfsmittel zur Untersuchung und Kontrolle der Gen-Expression in Zellen und Organismen dienen sollten.

[0040] Die vorliegende Erfindung wird durch Bezugnahme auf die folgenden Beispiele, die angegeben sind um die Erfindung zu illustrieren, nicht um deren Rahmen zu limitieren, leichter verstanden werden.

BEISPIEL 1

Herstellung von Antisense-Oligonucleotiden, gebildet aus 2'-Desoxy-2'-fluor- β -D-arabinonucleotiden (FANA), flankierend eine definierte Sequenz, gebildet aus β -D-2'-Desoxyribonucleotiden (DNA)

1. Synthese von FANA, S-[FANA] und S-[FANA-DNA-FANA]

[0041] Die Synthese von PO-FANA wurde durchgeführt, wie kürzlich beschrieben (Damha et al. J.Am.Chem.Soc. 120, 12976–12977 (1998)). Synthese von S-FANA- und S-[FANA-DNA-FANA]-Chimere wurde im 1 Micromol-Maßstab unter Verwendung eines Expedite 8909-DNA-Sythesegeräts durchgeführt. Langkettiges Alkylamin-Glas mit kontrollierter Porengröße (LCAA-CPG) wurde als die feste Unterlage verwendet. Der Synthese-Zyklus bestand aus den folgenden Schritten:

- 1) Detritylation von Nucleosid/tid, gebunden an CPG (3% Trichloressigsäure/Dichlormethan): 150 Sek.
- 2) Kopplung von 2'-F-Arabinonucleosid- oder 2'-Desoxyribonucleosid-3'-phosphoramidit-Monomeren: 15 min. Konzentration der verwendeten Monomere war 50 mg/mL für araF-T-, araF-C- und DNA-Monomere und 60 mg/mL für araA und araF-G (Acetonitril als Lösungsmittel).
- 3) Acetylierung unter Verwendung des Standard-Schritts zur Anbringung einer Kappenstruktur: 20 Sek. Die Lösung zum Anbringen einer Kappenstruktur bestand aus 1:1 (Vol./Vol.) „capA“- und „capB“-Reagenzien. CapA: Essigsäureanhydrid/Collidin/THF (1:1:8 ml); capB: N-Methylimidazol/THF (4:21 ml).
- 4) Ausgiebiges Waschen mit Acetonitril (50 Pulse).
- 5) Anbringen von Schwefel mit einer frischen Lösung von 0,2M 3H-1,2-Benzodithiol-3-on in Acetonitril: 10 min.
- 6) Waschen mit Acetonitril: 20 Pulse.
- 7) Trocknen der festen Unterlage durch Zugabe des Kappungs-Reagenz (siehe Schritt 3): 5 Sek.
- 8) Waschen mit Acetonitril (20 Pulse).

[0042] Nach dem Kettenaufbau wurden Oligonucleotide von der festen Unterlage gespalten und die Schutzgruppen wurden entfernt, wie es kürzlich beschrieben wurde (Noronha et al. Biochemistry 39, 7050–7062 (2000)). Die rohen Oligomere wurde durch entweder (a) präparative Gelelektrophorese (24% Acrylamid, 7M Harnstoff), gefolgt durch Entsalzen (Sephadex™ G-25), oder (b) Anionen-Austausch-HPLC, gefolgt von Entsalzen (SepPak™-Patronen) aufgereinigt. Ausbeuten: 5–30 A₂₆₀-Einheiten

Bedingungen der HPLC-Aufreinigung:

Säule: Protein Pak DEAE-5PW (7,5 mm × 7,5 cm, Waters™),
Lösungsmittel: Puffer A: H₂O; Puffer B: 1 M NaClO₄,

Gradient: 100% Puffer A isocratisch für 12 min,
100% A- 15% B, linear (für 5 min),
15% B – 55% B, linear (für 60 min).

[0043] Geladen wurden 1–2 A₂₆₀-Einheiten zur Analyse und 30–50 A₂₆₀-Einheiten zur präparativen Auftrennung. Die Durchflußrate wurde bei 1 ml/min eingestellt, Temperatur wurde bei 50°C angepasst. Der Detektor wurde auf 260 nm für analytische und 290 nm für präparative Chromatographie eingestellt. Unter diesen Bedingungen wurde das gewünschte Vollängen-Oligomer als letztes eluiert.

2. Synthese von S-DNA und S-[2'OMe-RNA-DNA-2'-OMe-RNA]-Chimeren

[0044] Phosphorothioat-DNA (S-DNA) und S-[2'OMe-RNA-DNA-2'OMe-RNA]-Chimeren wurden kommerziell von der University of Calgary DNA Synthesis Laboratory (Calgary, ALTA) erworben. Sie wurden aufgereinigt (HPLC) und entsalzt (SepPak™-Patronen), wie oben beschrieben (siehe Teil 1 oben).

[0045] Die Basen-Sequenz und Hybridisierungseigenschaften der verschiedenen synthetisierten Oligonucleotide sind in Tabelle 1 aufgeführt.

TABELLE 1

Antisense-Oligonucleotid (AON)-Sequenzen und Schmelzpunkte (T_m) von Duplexmolekülen aus AON mit komplementärer Ziel-RNA^a

ID#	AON-Bezeichnung	AON-Sequenz^b	T_m (°C)^c
1	S-FANA-Zwischenstück (10 DNA)	S- <u>ATA Tcc</u> ttg tcg ta <u>T CCC</u>	64
2	S-FANA-Zwischenstück (8 DNA)	S- <u>ATA TCc</u> ttg tcg <u>tAT CCC</u>	65
3	S-FANA-Zwischenstück (6 DNA)	S- <u>ATA TCC</u> ttg tcg <u>TAT CCC</u>	68
4	S-FANA-Zwischenstück (4 DNA)	S- <u>ATA TCC Ttg</u> tc <u>G TAT CCC</u>	70
5	S-FANA-Zwischenstück (2x1DNA)	S- <u>ATA TCC TTg</u> <u>TCg TAT CCC</u>	71
6	S-FANA	S- <u>ATA TCC TTG TCG TAT CCC</u>	72
7	PO-FANA	O- <u>ATA TCC TTG TCG TAT CCC</u>	82
8	2'OMe-Zwischenstück (10 DNA)	S- <u>ATA Tcc</u> ttg tcg ta <u>T CCC</u>	66
9	2'OMe-Zwischenstück (6 DNA)	S- <u>ATA TCC</u> ttg tcg <u>TAT CCC</u>	68
10	2'OMe-Zwischenstück (4 DNA)	S- <u>ATA TCC Ttg</u> tc <u>G TAT CCC</u>	72
11	S-DNA	S- ata tcc ttg tcg tat ccc	62
12	PO-DNA	O- ata tcc ttg tcg tat ccc	70

^aWässrige Lösungen von $2,5 \times 10^{-6}$ des Duplexmolekül. Puffer: 140 nM KCl, 1mM MgCl₂, 5 mM Na₂HPO₄ (pH 7,2). ^bCode: N = FANA-Nucleotid; n = DNA-Nucleotid; N = 2'OMe-RNA-Nucleotid; S- = enthält Phosphorothioat-Bindungen; PO- = enthält Phosphordiester-Bindungen. ^c± 1°C

BEISPIEL 2

Wirksamkeit von verschiedenen Antisense-Oligonucleotiden, intrazelluläre Gen-Expression zu verhindern

[0046] Antisense-Oligonucleotide haben das Potenzial, Expression von nahezu jedem Gen zu verhindern, basierend auf der spezifischen Basensequenz der gewählten Ziel-mRNA. Wir untersuchten die Fähigkeit von

Antisense-Oligonucleotiden, gebildet aus 2'-Desoxy-2'-fluor- β -D-arabinonucleotiden (FANA), flankierend eine Reihe von 2'-Desoxyribose-Nucleotideresten von variabler Länge (S-FANA-Zwischenstückmer), die Expression eines gut-charakterisierten Marker-Modells, nämlich Expression des Enzyms Luciferase, in Zellen, die stabil mit dem Luciferase-Gen transfiziert sind, zu behindern. Die Wirksamkeit des S-FANA-Zwischenstückmers, intrazelluläre Luciferase-Expression zu verhindern, wurde mit Antisense-Oligonucleotiden von identischer Sequenz verglichen, die gänzlich aus 2'-Desoxy-2'-fluor- β -D-arabinonucleotiden oder gänzlich aus 2'-Desoxyribonucleotiden gebildet wurden. Bindungen zwischen Nucleotiden waren entweder Phosphodiester (PO) oder Phosphorothioat (PS). Die spezifischen Antisense-Oligonucleotidsequenzen waren 5'-ATA TCC TTG TCG TAT CCC-3', was komplementär ist zu Basen 1511–1528 der codierenden Region des Luciferase-Gens. Als eine Kontrolle wurden zufällig ausgewählte Oligonucleotidsequenzen (5'-TAA TCC CTA TCG TCG CTT-3') verwendet; diese haben die selbe Basen-Anordnung wie die spezifische AON-Sequenz, aber sind zu keinem Teil des Luciferase-Gens komplementär. Diese zufällig ausgewählten Oligonucleotide waren nicht in der Lage, Verhinderung von Ziel-Luciferase-Expression zu bewirken.

[0047] Die Fähigkeit von Oligonucleotiden, die komplementär sind zu einer spezifischen Region von mRNA, die Luciferase codiert, zur Verhinderung der Luciferaseaktivitäts-Expression in Hela X1/5-Zellen (erhalten von der European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK) wurde getestet. Hela X1/5-Zellen sind stabil mit dem Luciferase-Gen transfiziert und exprimieren funktionelles Luciferase-Enzym.

[0048] Oligonucleotide wurden durch Komplexbildung der Oligonucleotide mit Cytofectin GSV GS3815 (Glen Research, Sterling, VA, USA) an die Zellen abgegeben. Kurz, Oligonucleotide wurden mit DMEM in der Abwesenheit von fetalem Rinderserum (FBS) verdünnt, um eine Endkonzentration des Oligonucleotids 10-fach höher als die Endkonzentration, der die Zellen ausgesetzt sein würden, zu liefern. Cytofectin GSV wurde in serumfreiem DMEM in einer Endkonzentration von 25 μ g/ml hergestellt. Gleiche Volumina von Oligonucleotid- und Cytofectin-Lösungen wurden in Polystyrol-Plastik gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann wurde die Mischung 5-fach mit DMEM, enthaltend 10% FBS, verdünnt.

[0049] X1/5-Zellen wurden in Platten mit 96 Vertiefungen in einer Dichte von $1,5 - 2 \times 10^4$ Zellen/Vertiefung ausgesät und für 24 h in DMEM/10% FBS wachsen gelassen. Dies lieferte im Allgemeinen eine Zelldichte von 80% Konfluenz, beurteilt durch Mikroskopie. Das Kulturmedium wurde dann von den Zellen entfernt, die Zellen wurden einige Male mit Phosphat-gepufferter Salzlösung gewaschen und dann mit dem Medium, enthaltend das Oligonucleotid/Cytofectin-Gemisch, überschichtet. Nach 24 h Inkubation wurden die Hela-Zellen geerntet, homogenisiert und auf Luciferase-Aktivität überprüft. Luciferase-Aktivität wurde durch ein luminometrisches Verfahren unter Verwendung der Luciferasetest-Kit-Bestandteile, erhalten von Promega (Madison, WI, USA), getestet.

[0050] Die Ergebnisse eines Versuchs, in dem die Fähigkeit von Antisense-Oligonucleotiden (Sequenz 5'-ATA TCC TTG TCG TAT CCC-3'), gebildet durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Nucleotiden und Bindungs-Chemien, Luciferase-Aktivität in X1/5-Zellen zu verhindern, verglichen wurde, sind in [Fig. 1](#) aufgezeigt. In allen Fällen wurden die Zellen einer Endkonzentration von 250 nM Antisense-Oligonucleotid für 24 h vor dem Testen der Luciferase-Aktivität ausgesetzt. Das Antisense-Oligonucleotid, gebildet gänzlich aus β -D-2'-Desoxyribose mit Phosphodiester-Bindungen (PO-DNA; ID# 12 in Tabelle 1) war nicht in der Lage, irgendeine Verhinderung von Luciferase-Aktivität in X1/5-Zellen zu bewirken, wohingegen das Antisense-Oligonucleotid, gebildet gänzlich aus β -D-2'-Desoxyribose mit Phosphorothioat-Bindungen (PS-DNA; ID# 11 in Tabelle 1) ungefähr 60% Verhinderung lieferte. Antisense-Oligonucleotide, gebildet gänzlich aus 2'-Desoxy-2'-fluor- β -D-arabinonucleotiden mit entweder Phosphodiester-Bindungen (PO-FANA; ID# 7 in Tabelle 1) oder Phosphorothioat-Bindungen (PS-FANA; ID# 6 in Tabelle 1) lieferten ungefähr 55% beziehungsweise 25% Verhinderung der Luciferase-Aktivität. Unter den gleichen Bedingungen lieferte das Antisense-Oligonucleotid, gebildet aus 2'-Desoxy-2'-fluor- β -D-arabinonucleotiden, flankierend eine Reihe von zehn 2'-Desoxyribose-Nucleotidresten, alle verbunden durch Phosphorothioat-Bindungen (S-FANA-Zwischenstückmer; ID# 1 in Tabelle 1), mindestens eine 90%ige Verhinderung von Luciferase-Aktivität in X1/5-Zellen. Bei keinem der Antisense-Oligonucleotide wurde unter den Bedingungen, die in diesem Versuch verwendet wurden, offensichtliche Zelltoxizität beobachtet.

[0051] Die Ergebnisse ([Fig. 1](#)) zeigen, dass das S-FANA-Zwischenstückmer (10 DNA Zwischenstück) ein signifikant besserer Inhibitor von Luciferaseaktivitäts-Expression in X1/5-Zellen ist als PO-DNA, S-DNA, PO-FANA oder S-FANA. X1/5-Zellen wurden mit verschiedenen Antisense-Oligonucleotiden (250 nM Endkonzentration) inkubiert, alle waren gegen die gleiche Zielsequenz von Luciferase-mRNA gerichtet. In Folge geeigneter Inkubation wurde die Restmenge an intrazellulärer Luciferase-Aktivität bestimmt.

BEISPIEL 3

Vergleich von S-DNA- und S-FANA-Zwischenstückmer (10 DNA)-Antisense-Oligonucleotiden, intrazelluläre Gen-Expression zu verhindern

[0052] Lösungen von S-DNA- (ID# 11, Tabelle 1) und S-FANA-Zwischenstückmer (ID# 1, Tabelle 1) wurden mit Cytofectin GSV GS3815, wie in Beispiel 2 beschrieben, hergestellt. Hela X1/5-Zellen wurden in Replikaplaten mit 6 Vertiefungen in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/Vertiefung plattiert und für 24 h in DMEM/10% FBS wachsen gelassen. Das Kulturmedium wurde dann von den Zellen entfernt, die Zellen wurden einige Male mit Phosphat-gepufferter Salzlösung gewaschen und dann mit dem Medium, enthaltend das Oligonucleotid/Cytofectin-Gemisch, überschichtet. Nach 24 h Inkubation wurden die Hela X1/5-Zellen geerntet und in einer Weise behandelt, wie es für die folgenden Testverfahren (unten beschrieben) geeignet ist.

(a) Test auf Luciferase-Enzymaktivität

[0053] Luciferase-Enzymaktivitätstests wurden unter Verwendung des Luciferase-Testkit-Systems von Promega, Madison, WI, USA, entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Kurz, Zellen wurden mit phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen und dann mit dem Zell-Lysepuffer, der im Kit geliefert wird, lysiert. Replikaaliquots der Zell-Lysate wurden in Testsplatten mit 96 Vertiefungen transferiert. Luciferin-Substratlösung wurde zugefügt und Lumineszenz wurde unmittelbar unter Verwendung eines SPECTRAMax GEMINI XS-Microplatten-Spectralfluorometers (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), das im Lumineszenz-Lesemodus eingestellt war, gemessen. Ergebnisse wurden für jegliche Variation in der Gesamtzell-Proteinkonzentration in den individuellen Proben normalisiert (bestimmt unter Verwendung des Bio-Rad Protein-testreagenzes an identischen Aliquots).

(b) Test auf Luciferase-Protein-Expression

[0054] Die Mengen an Luciferase-Protein in Antisense- behandelten und unbehandelten X1/5-Zellen wurden durch Western-Blot-Analyse bestimmt. Protein-Extrakte von X1/5-Zellen wurden durch Lyse der Zellen im gleichen Lysepuffer, wie er zu Herstellung der Proben für die Luciferase-Enzymtests verwendet wurde, hergestellt, gefolgt von Aufklärung durch Zentrifugieren. Der Proteingehalt der einzelnen Proben wurde unter Verwendung des Bio-Rad Protein-testreagenzes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) gemessen. Proben, die identische Mengen an Zellprotein (ungefähr 20 µg) enthielten, wurden einer SDS-PAGE unterzogen, dann auf Nitrozellulose-Membranen (0,45 µ) übertragen. Die Membran wurde in TTBS (20 mM Tris-HCl, enthaltend 500 mM NaCl und 0,05% Tween 20), enthaltend 5% Magermilch, für mindestens eine Stunde inkubiert. Die Blots wurden dann mit einem Ziegen-Antikörper, der spezifisch mit Leuchtkäfer-Luciferase reagiert (erhalten von Chemicon International Inc, Temecula, CA, USA), inkubiert, wobei Antikörper in einer Konzentration von 1 mg/ml in TTBS verwendet wurde. Nach 1 h Inkubation wurden die Membranen ausgiebig mit TTBS gewaschen, dann mit Meerrettich-Peroxidasekonjugiertem anti-Ziegen-IgG (Chemicon International Inc, Temecula, CA, USA) in einer 1:10 000-Verdünnung in TTBS inkubiert. Die Peroxidase-reaktiven Regionen wurden dann unter Verwendung des Renaissance Western-Blot-Chemiluminescence Reagent-Kits (NEN Life Science Products, Boston, MA, USA) und mit Kodak X-OMAT-Film entsprechend den Anweisungen des Herstellers bestimmt. Luciferase-Proteinmengen wurden dann durch densitometrische Analyse des entwickelten Films quantifiziert.

(c) Test auf Luciferase-mRNA

[0055] Die Isolierung der Gesamt-RNA aus X1/5-Zellen und Northern-Blot-Tests auf Luciferase-mRNA-Mengen wurden durchgeführt. Normalisierte Mengen an Gesamt-Zell-RNA (10–20 µg) wurden auf 1 %igen Agarose-Gelen, enthaltend 2,2 M Formaldehyd größenfraktioniert, dann auf 0,45 µ-Nitrocellulose-Membranen (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) transferiert. Die Hybridisierungs-Sonde für Luciferase-mRNA war ³²P-intern markierte DNA, stammend von der Vollängen-cDNA für das Leuchtkäfer-Luciferase-Gen (vom Plasmid pGEM-Luc, Promega, Madison, WI, USA), hergestellt unter Verwendung des Oligolabeling-Kits von Amersham-Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, USA). Hybridisierung der radioaktiv-markierten Sonde mit Membran-gebundener RNA wurde in 6x SSC-Puffer (900 mM Natriumchlorid, enthaltend 90 mM Natriumcitrat bei pH 7,0), enthaltend 50% Formamid, 0,5% Natriumdodecylsulfat und Blockierungs-Reagenzien, durchgeführt. Hybridisierungen wurden bei 42°C für 16 Stunden durchgeführt. Die Membranen wurden dann zwei mal mit 1 × SSC, enthaltend 0,1 % SDS, bei Raumtemperatur, dann 0,1 × SSC, enthaltend 0,1 % SDS, bei Raumtemperatur und schließlich 0,1 × SSC, enthaltend 0,5% SDS, bei 42°C gewaschen. Membran-assoziierte Radioaktivität wurde durch Autoradiographie lokalisiert und durch Densitometrie quantifiziert.

[0056] Die Ergebnisse von [Fig. 2](#) zeigen, dass das S-FANA-Zwischenstückmer (10 DNA) signifikant effektiver als S-DNA in der Verhinderung von Luciferase-Aktivität in X1/5-Zellen in einem Konzentrationsbereich zwischen 15 nM und 250 nM Antisense-Oligonucleotid (Feld A) war.

[0057] Behandlung von X1/5-Zellen mit dem S-FANA-Zwischenstückmer (10 DNA) resultierte in einer Dosis-abhängigen Senkung in Gesamt-Luciferaseprotein (Feld B), die in Zellen, die mit S-DNA-Antisense- behandelt wurden, nicht offensichtlich war. Zusätzlich resultierte die Behandlung von X1/5-Zellen mit dem S-FANA-Zwischenstückmer (10 DNA) in einer Dosis-abhängigen Abnahme von Gesamt-Luciferase-mRNA (Feld C); diese Abnahme war größer als jene, bewirkt durch S-DNA-Antisense-. Luciferase-Proteinmengen wurden durch Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch gegen Luciferase gerichtet war, getestet. Luciferase-mRNA-Mengen wurden durch Northern-Blot-Analyse unter Verwendung einer DNA-Sonde, die spezifisch gegen eine Sequenz der Luciferase-mRNA gerichtet war, getestet.

BEISPIEL 4

Effekt der Behandlung mit S-DNA und S-FANA-Zwischenstückmer (10 DNA)-Antisense-Oligonucleotiden auf zelluläres Luciferase-Protein und mRNA

[0058] Lösungen von S-DNA- (ID# 11, Tabelle 1) und S-FANA-Zwischenstückmer (ID# 1, Tabelle 1) wurden mit Cytofectin GSV GS3815, wie in Beispiel 2 beschrieben, hergestellt. Hela X1/5-Zellen wurden in Replikplatten mit 6 Vertiefungen in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/Vertiefung plattiert und für 24 h in DMEM/10% FBS wachsen gelassen. Das Kulturmedium wurde dann von den Zellen entfernt, die Zellen wurden einige Male mit Phosphat-gepufferter Salzlösung gewaschen und dann mit dem Medium, enthaltend das Oligonucleotid/Cytofectin-Gemisch, überschichtet, um die gezeigten Endkonzentrationen von S-DNA oder S-FANA-Zwischenstückmer (10 DNA)-Antisense-Oligonucleotiden zu liefern. Nach 24 h Inkubation wurden die Hela X1/5-Zellen geerntet und in einer Weise behandelt, die für die Analyse von Luciferase-Proteinmengen oder Luciferase-mRNA-Mengen geeignet ist, genau wie in Beispiel 3 beschrieben.

[0059] Die Ergebnisse in [Fig. 3](#), Feld (A) zeigen die Western-Blot-Analyse von Luciferase-Proteinmengen in Extrakten von X1/5-Zellen, behandelt mit verschiedenen Konzentrationen von S-DNA- (obere Reihe) oder S-FANA-Zwischenstück-Konstrukt (10 DNA) (untere Reihe). (A) Variation in Luciferase-Proteinmengen nach Aussetzen der X1/5-Zellen gegenüber steigenden Mengen von entweder PS-DNA- oder PS-FANA-Zwischenstückmer (10 DNA)-Antisense-Oligonucleotiden.

[0060] Es ist leicht zu sehen, dass die Zellen, behandelt mit S-FANA-Zwischenstückmer (10 DNA), eine dosisabhängige Abnahme des Gesamt-Luciferase-Proteins zeigen, während dieser Effekt viel weniger deutlich ist in Zellen, behandelt mit S-DNA. Quantifizierung der Luciferase-Proteinmengen wird in Feld (B) von [Fig. 2.\(B\)](#) geliefert. Das PS-FANA-Zwischenstückmer (10 DNA)-Antisense-Oligonucleotid ruft RNaseH-Spaltung von intrazellulärer Luciferase-mRNA hervor. 1 entspricht der Vollängen-Luciferase-mRNA, 2 und 3 sind die Spaltungsprodukte. + repräsentiert mRNA, isoliert von Zellen, die mit 250 nM PS-FANA-Zwischenstückmer (10 DNA) behandelt wurden, - repräsentiert mRNA, isoliert von Zellen, die nicht Antisense ausgesetzt wurden.

[0061] Die Ergebnisse in [Fig. 3](#), Feld (B) zeigen, dass Behandlung von X1/5-Zellen mit 250 nM S-FANA-Zwischenstückmer (10 DNA) in einer leicht erkennbaren Spaltung von Luciferase-mRNA (Reihe +) resultiert. Drei Arten von Luciferase-mRNA werden gesehen, Volllänge n-mRNA(1), und zwei kleinere Arten (2 und 3), die den Spaltungsprodukten entsprechen, die von RNaseH-Degradierung der Vollängen-mRNA in der Region, die das Ziel des Antisense-Oligonucleotids ist, erwartet werden. Das Luciferase-mRNA-Profil in Zellen, die keiner Antisense ausgesetzt wurden, ist in der Reihe, markiert mit (-), gezeigt.

BEISPIEL 5

Effekt der DNA-„Zwischenstück“-Größe auf die Fähigkeit von Zwischenstückmer-Antisense-Oligonucleotiden, zelluläre, spezifische Gen-Expression zu verhindern

[0062] Wir verglichen Antisense-Oligonucleotide, gebildet aus 2'-Desoxy-2'-fluor-β-D-arabinonucleotiden (FANA), flankierend eine Reihe von 2'-Desoxyribose-Nucleotidresten von variabler Länge, mit Phosphorothioat-Bindungen zwischen den Nucleotiden (S-FANA-Zwischenstückmer) mit ähnlichen MBO, gebildet mit 2'-O-Methyl-RNA-Flügeln, und mit nicht-Zwischenstückmer-PS-DNA- und -PS-FANA-Oligonucleotiden in deren Fähigkeit, Expression von intrazellulärer Luciferase-Aktivität in Hela X1/5-Zellen zu verhindern. Die spezifische Antisense-Oligonucleotidsequenz war 5'-ATA TCC TTG TCG TAT CCC-3', welche komplementär ist zu

Basen 1511–1528 der codierenden Region des Luciferase-Gens.

[0063] Oligonucleotide wurden durch Komplexbildung der Oligonucleotide mit Cytofectin GSV GS 3815 (Glen Research, Sterling, VA, USA) an die Zellen abgegeben, genau wie für Beispiel 2 beschrieben.

[0064] X1/5-Zellen wurden in Platten mit 96 Vertiefungen in einer Dichte von $1,5 - 2 \times 10^4$ Zellen/Vertiefung plattiert und für 24 h in DMEM/10% FBS wachsen gelassen. Das Kulturmedium wurde dann von den Zellen entfernt, die Zellen wurden einige Male mit Phosphat-gepufferter Salzlösung gewaschen und dann mit dem Medium, enthaltend das Oligonucleotid/Cytofectin-Gemisch, überschichtet, um eine Endkonzentration von 250 nM Antisense-Oligonucleotid zu liefern. Nach 24 h Inkubation wurden die Hela-Zellen geerntet, homogenisiert und auf Luciferase-Aktivität durch ein luminometrisches Verfahren unter Verwendung der Luciferase-Test-kit-Bestandteile, erhalten von Promega (Madison, WI, USA), getestet.

[0065] Die Ergebnisse eines Versuchs, in dem die Fähigkeit von Antisense-Oligonucleotiden (Sequenz 5'-ATA TCC TTG TCG TAT CCC-3'), gebildet aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Nucleotiden, die Luciferase-Aktivität in X1/5-Zellen zu verhindern, verglichen wurde, sind in [Fig. 4](#) angegeben. Die Daten repräsentieren intrazelluläre Rest-Luciferase-Aktivität nach dem Aussetzen gegenüber einer Endkonzentration von 250 nM Antisense-Oligonucleotid. Alle Antisense wurden gegen die gleiche Sequenz der Luciferase-mRNA gerichtet. S-DNA ist PS-DNA, S-FANA ist PS-FANA ohne ein DNA-Zwischenstück, S-FANA-Zwischenstückmer ist ein Antisense-Oligonucleotid, gebildet aus 2'-Fluor-arabinonucleotiden, flankierend eine Reihe von Desoxyribose-Nucleotidresten von definierter Länge (angezeigt), 2'-OMe-Zwischenstückmer ist ein Antisense-Oligonucleotid, gebildet aus 2'-O-Methylribonucleotiden, flankierend eine Reihe von Desoxyribose-Nucleotidresten von definierter Länge (angezeigt).

[0066] In allen Fällen wurden die Zellen einer Endkonzentration von 250 nM Antisense-Oligonucleotid für 24 h vor dem Testen der Luciferase-Aktivität ausgesetzt. Das Antisense-Oligonucleotid, gebildet gänzlich aus β -D-2'-Desoxyribonucleotiden mit Phosphorothioat-Bindungen (S-DNA; ID# 11 in Tabelle 1), verhinderte Luciferase-Expression zu etwa 65%, wohingegen jenes, gebildet gänzlich aus β -D-2'-Desoxy-2'-F-Arabinonucleotiden mit Phosphorothioat-Bindungen (S-FANA; ID# 6 in Tabelle 1) viel weniger effektiv war und nur durchschnittlich 20% Verhinderung der Luciferase-Expression lieferte. Sowohl S-FANA- als auch 2'-O-Methyl-RNA-MBO-Zwischenstückmere mit einem 10 DNA-Zwischenstück-Segment (ID# 1, beziehungsweise 8 in Tabelle 1) waren gleichwertige und sehr effektive Inhibitoren, die ungefähr eine 85–90%ige Senkung der intrazellulären Luciferase-Aktivität lieferten. Die Antisense-Aktivität von 2'-O-Methyl-RNA-MBO-Zwischenstückmeren sank jedoch dramatisch mit sinkender Größe des DNA-Zwischenstücks; in der Tat zeigte das 2'-O-Methyl-RNA MBO-Zwischenstückmer mit einem 4 DNA-Zwischenstück (ID# 10, Tabelle 1) wenig oder keine verhindernde Aktivität der Luciferase-Expression in X1/5-Zellen. In starkem Kontrast dazu war die Antisense-Aktivität von S-FANA unbeeinflusst von sinkenden DNA-Zwischenstücken bis zu einer 4 DNA-Länge. Interessanterweise war die Antisense-Aktivität des S-FANA-Zwischenstückmers mit einem einzigen DNA-Zwischenstück (ID# 5, Tabelle 1) genau so gut wie jene der entsprechenden Oligonucleotide mit nur S-DNA (ID# 11, Tabelle 1). Dies war unerwartet, da das reine S-FANA-Oligonucleotid in dieser Hinsicht sehr schwach war.

[0067] Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigen, dass MBO-Antisense-Oligonucleotide, gebildet mit Flügeln, bestehend aus S-FANA, minimale Abhängigkeit von DNA-Zwischenstück-Größe zeigen, im Gegensatz zu der starken DNA-Zwischenstück-Größenabhängigkeit, die von den entsprechenden MBO, gebildet mit Flügeln, bestehend aus S-2'-O-Methyl-RNA, gezeigt wird.

BEISPIEL 6

Effekt der DNA-„Zwischenstück“-Größe auf die Fähigkeit von Zwischenstückmer-Antisense-Oligonucleotiden, zelluläre spezifische Gen-Expression zu verhindern – Effekt von Antisense-Oligonucleotid-Konzentration

[0068] Um die Antisense-Aktivität von S-FANA-Zwischenstückmeren im Vergleich zu S-2'-O-Methyl-RNA-Zwischenstückmer-MBO besser zu definieren, untersuchten wir das Dosis-Antwort-Verhältnis der Verhinderung der Luciferase-Expression in X1/5-Zellen als eine Funktion der Antisense-Oligonucleotid-Konzentration.

[0069] X1/5-Zellen wurden in Platten mit 96 Vertiefungen in einer Dichte von $1,5 - 2 \times 10^4$ Zellen/Vertiefung plattiert und für 24 h in DMEM/10% FBS wachsen gelassen. Das Kulturmedium wurde dann von den Zellen entfernt, die Zellen wurden einige Male mit Phosphat-gepufferter Salzlösung gewaschen und dann mit dem Medium, enthaltend das Oligonucleotid/Cytofectin-Gemisch, überschichtet, um eine Endkonzentration der An-

tisense-Oligonucleotide im Bereich von 0 bis 250 nM zu liefern. Nach 24 h Inkubation wurden die Hela-Zellen geerntet, homogenisiert und auf Luciferase-Aktivität durch ein luminometrisches Verfahren unter Verwendung der Luciferase-Testkit-Bestandteile, erhalten von Promega (Madison, WI, USA), getestet.

[0070] Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Fig. 5 (Felder A und B) gezeigt. Die Daten repräsentieren intrazelluläre Rest-Luciferaseaktivität nach dem Aussetzen von X1/5-Zellen gegenüber verschiedenen angezeigten Endkonzentrationen von Antisense-Oligonucleotid. Alle Antisense waren gegen die gleiche Sequenz der Luciferase-mRNA gerichtet. S-DNA ist PS-DNA, S-FANA-Zwischenstückmer ist ein Antisense-Oligonucleotid, gebildet aus 2'-Fluorarabinonucleotiden, flankierend eine Reihe von Desoxyribose-Nucleotidresten von definierter Länge (angezeigt), OMe-Zwischenstückmer ist ein Antisense-Oligonucleotid, gebildet aus 2'-O-Methylribonucleotiden, flankierend eine Reihe von Desoxyribose-Nucleotidresten von definierter Länge (angezeigt).

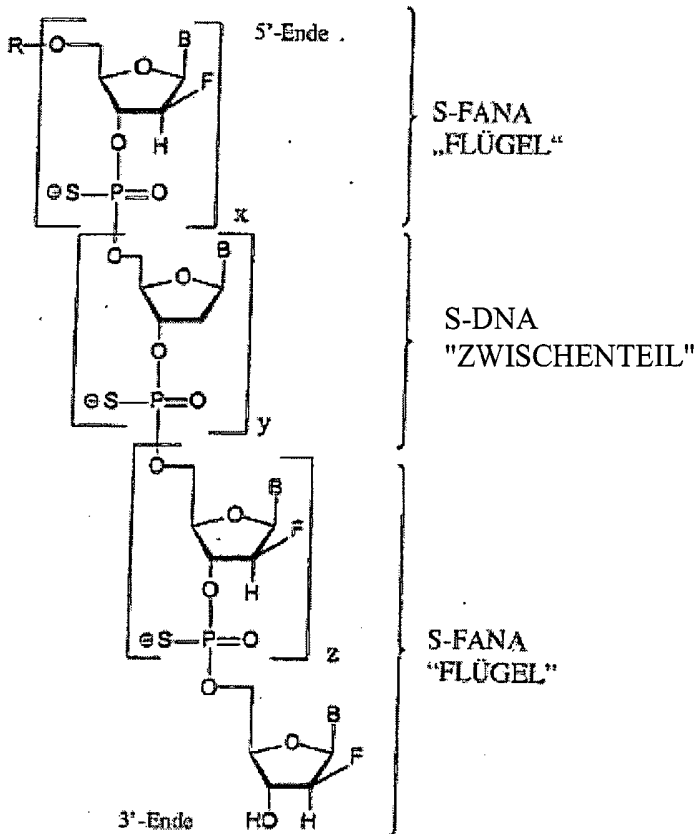
[0071] In Fig. 5A kann gesehen werden, dass alle S-FANA-Zwischenstückmere mit Zwischenstücken zwischen 4 und 10 S-DNA-Nucleotiden sehr effektive Inhibitoren von intrazellulärer Luciferase-Gen-Expression waren, viel besser als S-DNA allein. Die IC_{50} -Werte für diese Inhibition reichten von etwa 15 nM (für das 10 DNA-Zwischenstück, ID# 1, Tabelle 1) bis \ll 15 nM (für die 8, 6 und 4 DNA-Zwischenstück-Oligonucleotide; ID# 2, 3 beziehungsweise 4 in Tabelle 1). Im Gegensatz dazu waren die IC_{50} -Werte für S-DNA (ID# 11, Tabelle 1)-Antisense-Inhibition etwa 100 nM. Die IC_{50} -Werte für das S-FANA-MBO mit 1 DNA-Zwischenstücken (ID# 5, Tabelle 1) war identisch zu jener der Oligonucleotide aus S-DNA allein.

[0072] In Fig. 5B kann gesehen werden, dass die IC_{50} -Werte für die Fähigkeit des S-2'-O-Methyl-RNA-Zwischenstückmers (10 DNA-Zwischenstück; ID# 8, Tabelle 1) im Wesentlichen identisch war zu jener des entsprechenden S-FANA-Zwischenstückmers (ID# 1, Tabelle 1). Im Gegensatz dazu waren die IC_{50} -Werte für die Antisense-Aktivität der anderen getesteten S-2'-O-Methyl-RNA-Zwischenstückmere (6 und 4 DNA-Zwischenstücke); ID# 9 beziehungsweise 10 in Tabelle 1) \gg 250 nM. In der Tat waren die letzteren Zwischenstückmere nahezu unwirksam als Antisense-Inhibitoren der Luciferase-Expression in X1/5-Zellen.

Patentansprüche

1. Oligonucleotid-"Chimere" zur selektiven Verhinderung von Genexpression in einer sequenzspezifischen Art und Weise, umfassend eine Chimere aus modifizierter Arabinose und 2'-Desoxyzuckern, die an eine Einzelstrang-RNA hybridisiert, um wenigstens eines des folgenden zu induzieren:

(a) Nuclease-Stabilität, (b) Bindungsstärke der Hybridisierung an komplementäre RNA-Sequenzen, (c) Permeabilität des Oligonucleotids in Zellen, (d) Spaltung von Ziel-RNA durch RNaseH, oder (e) physikalische Blockierung der Ribose-Translokation („Translationsstop"), mit der folgenden allgemeinen Struktur:



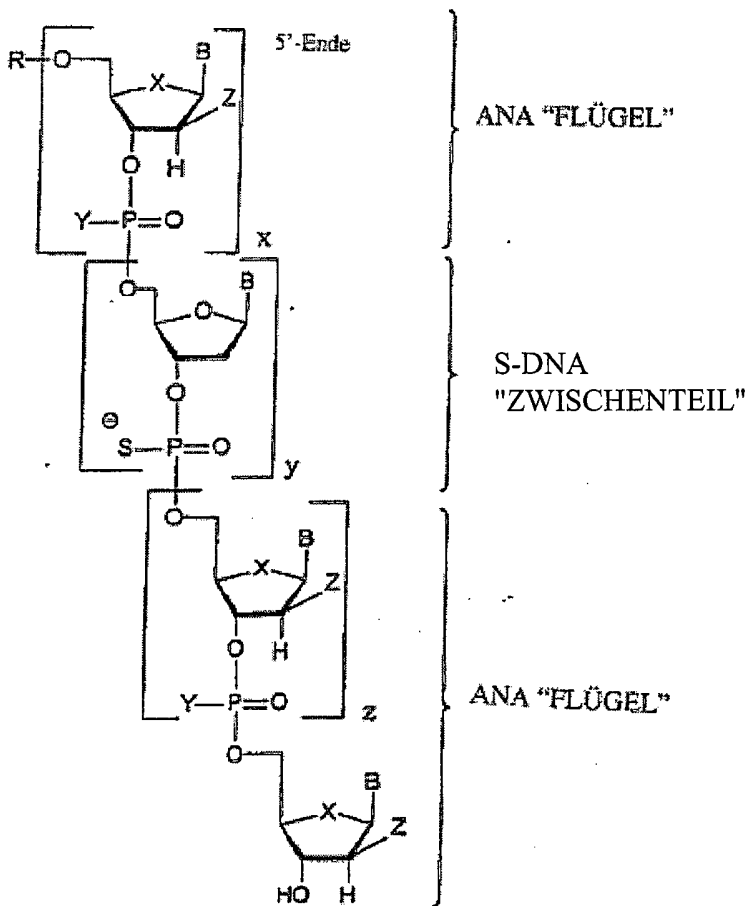
wobei

$x \geq 1$, $y \geq 1$, und $z \geq 0$ ist, und

R ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Wasserstoff, Thiophosphat und einer Verbindungseinheit, die die zelluläre Aufnahme eines solchen Oligonucleotids fördert.

2. Oligonucleotid-"Chimere" zur selektiven Verhinderung von Genexpression in einer sequenzspezifischen Art und Weise, umfassend eine Chimere aus modifizierter Arabinose und 2'-Desoxyzuckern, die an eine Einzelstrang-RNA hybridisiert, um wenigstens eines des folgenden zu induzieren:

(a) Nuclease-Stabilität, (b) Bindungsstärke der Hybridisierung an komplementäre RNA-Sequenzen, (c) Permeabilität des Oligonucleotids in Zellen, (d) Spaltung von Ziel-RNA durch RNaseH, oder (e) physikalische Blockierung der Ribose-Translokation („Translationsstop“), wobei das Oligonucleotid die Formel aufweist:



wobei

$x \geq 1$, $y \geq 1$, und $z \geq 0$ ist, und

R ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Wasserstoff, Thiophosphat und einer Verbindungseinheit, die die zelluläre Aufnahme eines solchen Oligonucleotids fördert;

B ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Adenin, Guanin, Uracil, Thymin, Cytosin, Inosin und 5-Methylcytosin;

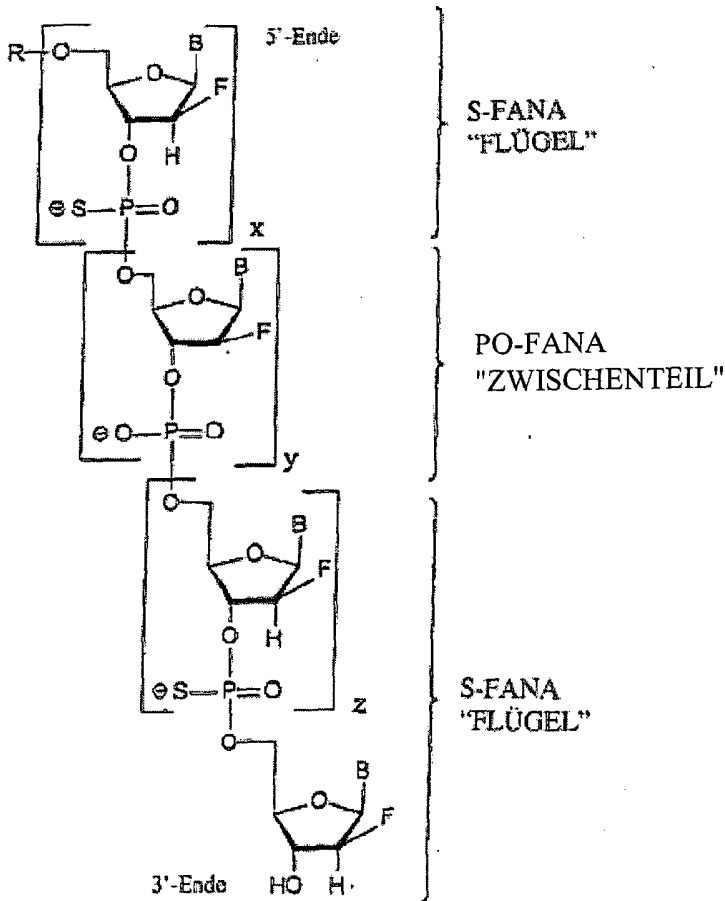
Y an der Phosphatverknüpfung zwischen Nucleotiden ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Schwefel, Sauerstoff, einem Methyl-, Amino-, Alkylamino-, Dialkylamino- (wobei der Alkylrest 1 bis 20 Kohlenstoffatome besitzt), Methoxy- und Ethoxyrest;

X am Furanose-Ring (Position 4') ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Sauerstoff, Schwefel und Methylen (CH_2); und

Z an der 2'-Position des Zuckerrings ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus einem Halogen (Fluor, Chlor, Brom oder Jod), einem Alkyl-, Alkylhalogenid- (z.B. $-\text{CH}_2\text{F}$), Allyl-, Amino-, Aryl-, Alkoxy- und Azidrest.

3. Oligonucleotid-"Chimere" zur selektiven Verhinderung von Genexpression in einer sequenzspezifischen Art und Weise, umfassend eine Chimere aus modifizierter Arabinose und 2'-Desoxyzuckern, die an eine Einzelstrang-RNA hybridisiert, um wenigstens eines des folgenden zu induzieren:

(a) Nuclease-Stabilität, (b) Bindungsstärke der Hybridisierung an komplementäre RNA-Sequenzen, (c) Permeabilität des Oligonucleotids in Zellen, (d) Spaltung von Ziel-RNA durch RNaseH, oder (e) physikalische Blockierung der Ribose-Translokation („Translationsstop"), wobei das Oligonucleotid die folgende Formel aufweist:



wobei

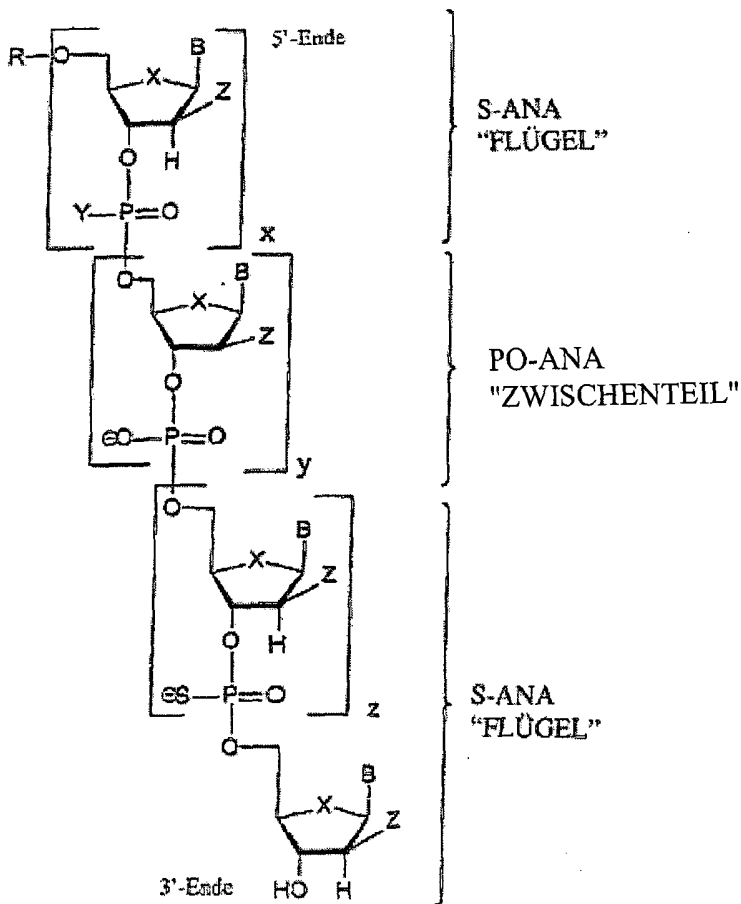
$x \geq 1$, $y \geq 1$, und $z \geq 0$ ist,

R ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Wasserstoff, Thiophosphat und einer Verbindungseinheit, die die zelluläre Aufnahme eines solchen Oligonucleotids fördert;

B ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Adenin, Guanin, Uracil, Thymin, Cytosin, Inosin und 5-Methylcytosin.

4. Oligonucleotid-"Chimere" zur selektiven Verhinderung von Genexpression in einer sequenzspezifischen Art und Weise, umfassend eine Chimere aus modifizierter Arabinose und 2'-Desoxyzuckern, die an eine Einzelstrang-RNA hybridisiert, um wenigstens eines des folgenden zu induzieren:

(a) Nuclease-Stabilität, (b) Bindungsstärke der Hybridisierung an komplementäre RNA-Sequenzen, (c) Permeabilität des Oligonucleotids in Zellen, (d) Spaltung von Ziel-RNA durch RNaseH, oder (e) physikalische Blockierung der Ribose-Translokation („Translationsstop“), wobei das Oligonucleotid die Formel aufweist:



wobei

$x \geq 1$, $y \geq 1$, und $z \geq 0$ ist, und

R ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Wasserstoff, Thiophosphat und einer Verbindungseinheit, die die zelluläre Aufnahme eines solchen Oligonucleotids fördert;

B ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Adenin, Guanin, Uracil, Thymin, Cytosin, Inosin und 5-Methylcytosin;

Y an der Phosphatverknüpfung zwischen Nucleotiden ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Schwefel, Sauerstoff, einem Methyl-, Amino-, Alkylamino-, Dialkylamino- (wobei der Alkylrest 1 bis 20 Kohlenstoffatome besitzt), Methoxy- und Ethoxyrest;

X am Furanose-Ring (Position 4') ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Sauerstoff, Schwefel und Methylen (CH_2); und

Z an der 2'-Position des Zuckerrings ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus einem Halogen (Fluor, Chlor, Brom oder Jod), einem Hydroxyl-, einem Alkyl-, Alkylhalogenid- (z.B. $-\text{CH}_2\text{F}$), Allyl-, Amino-, Aryl-, Alkoxy- und Azidrest.

5. In-vitro-Verfahren zum Spalten von Einzelstrang-RNA, umfassend die Schritte

(a) Hybridisieren eines Oligonucleotids gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 in sequenzspezifischer Art und Weise an eine Einzelstrang-RNA zur Induzierung von RNase H-Aktivität; und

(b) das Zulassen, dass die induzierte RNase H die hybridisierte Einzelstrang-RNA spaltet.

6. In-vitro-Verfahren zum Verhindern der Translation der Einzelstrang-RNA, umfassend das Hybridisieren Chimerer Oligonucleotide gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 in sequenzspezifischer Art und Weise an Einzelstrang-RNA, wobei die Produktion von spezifischem Protein, codiert durch die Einzelstrang-RNA, verhindert wird.

7. Verfahren gemäß Anspruch 5 oder 6, wobei die RNA komplementäre RNA ist.

8. Verfahren gemäß Anspruch 7, wobei die komplementäre RNA zelluläre mRNA oder virale RNA ist.

9. Verwendung eines Oligonucleotids gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 für die Herstellung eines Medikaments zum Spalten von Einzelstrang-RNA, wobei das Oligonucleotid in einer sequenzspezifischen Art und

Weise an eine Einzelstrang-RNA hybridisiert, um RNase H-Aktivität zum Spalten der hybridisierten Einzelstrang-RNA zu induzieren.

10. Verwendung gemäß Anspruch 9, wobei die komplementäre RNA zelluläre mRNA oder virale RNA ist.

11. Verwendung eines Oligonucleotids gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 für die Herstellung einer Sonde oder eines Laborreagenzes zum Spalten einer Einzelstrang-RNA, wobei das Oligonucleotid in einer sequenzspezifischen Art und Weise an eine Einzelstrang-RNA hybridisiert, um RNase H-Aktivität zum Spalten der hybridisierten Einzelstrang-RNA zu induzieren.

12. Verwendung gemäß Anspruch 11, wobei die komplementäre RNA zelluläre mRNA oder virale RNA ist.

13. Arzneimittel zur selektiven Verhinderung von Genexpression in einer sequenzspezifischen Art und Weise, umfassend eine wirksame Menge einer Oligonucleotid-„Chimere“ gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 in Verbindung mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger.

14. Oligonucleotid gemäß Anspruch 1, umfassend Arabinonucleotid oder modifizierte Arabinonucleotidreste, die eine Reihe von Desoxyribosenucleotidresten flankieren, wobei die Reihe von Desoxyribosenucleotidresten ein Zwischenteil von 10 Desoxyribosenucleotidresten umfasst.

15. Oligonucleotid gemäß Anspruch 1, umfassend Arabinonucleotid oder modifizierte Arabinonucleotidreste, die eine Reihe von Desoxyribosenucleotidresten flankieren, wobei die Reihe von Desoxyribosenucleotidresten ein Zwischenteil von 8 Desoxyribosenucleotidresten umfasst.

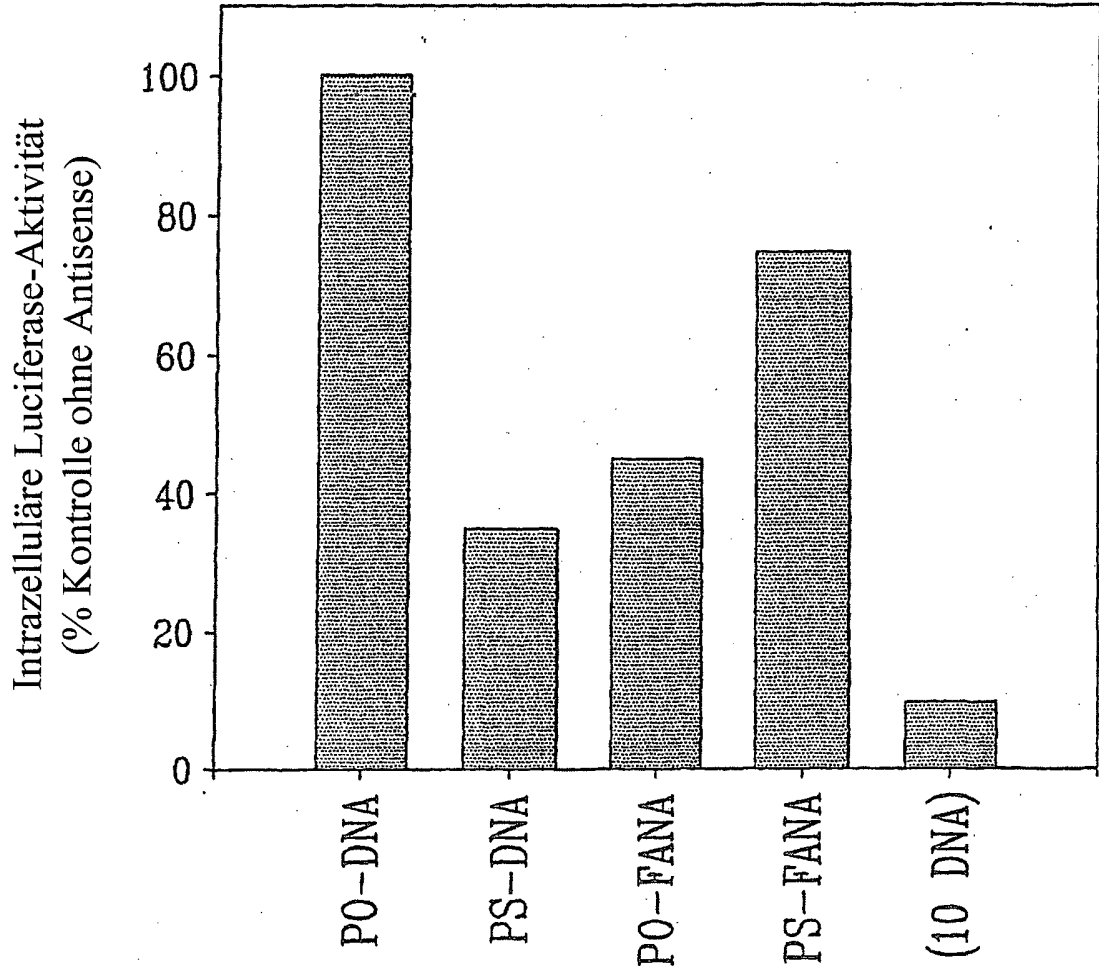
16. Oligonucleotid gemäß Anspruch 1, umfassend Arabinonucleotid oder modifizierte Arabinonucleotidreste, die eine Reihe von Desoxyribosenucleotidresten flankieren, wobei die Reihe von Desoxyribosenucleotidresten ein Zwischenteil von 6 Desoxyribosenucleotidresten umfasst.

17. Oligonucleotid gemäß Anspruch 1, umfassend Arabinonucleotid oder modifizierte Arabinonucleotidreste, die eine Reihe von Desoxyribosenucleotidresten flankieren, wobei die Reihe von Desoxyribosenucleotidresten ein Zwischenteil von 4 Desoxyribosenucleotidresten umfasst.

18. Oligonucleotid gemäß Anspruch 1, umfassend Arabinonucleotid oder modifizierte Arabinonucleotidreste, die eine Reihe von Desoxyribosenucleotidresten flankieren, wobei die Reihe von Desoxyribosenucleotidresten ein Zwischenteil von 2×1 Desoxyribosenucleotidresten umfasst.

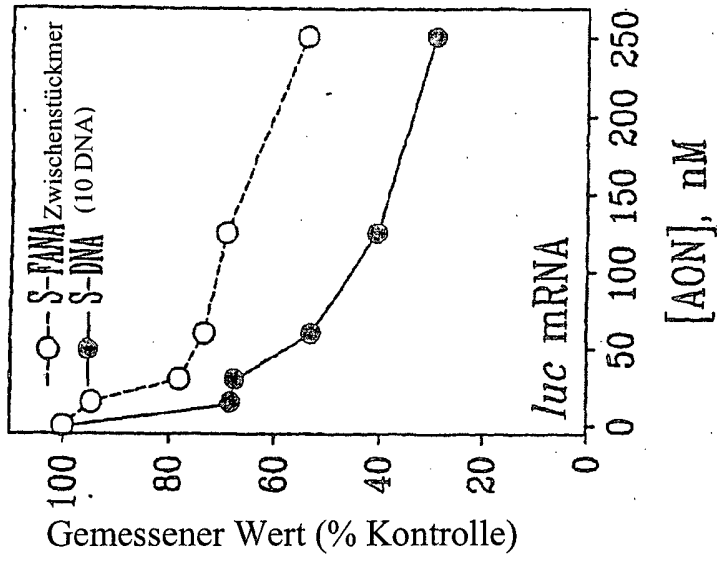
Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

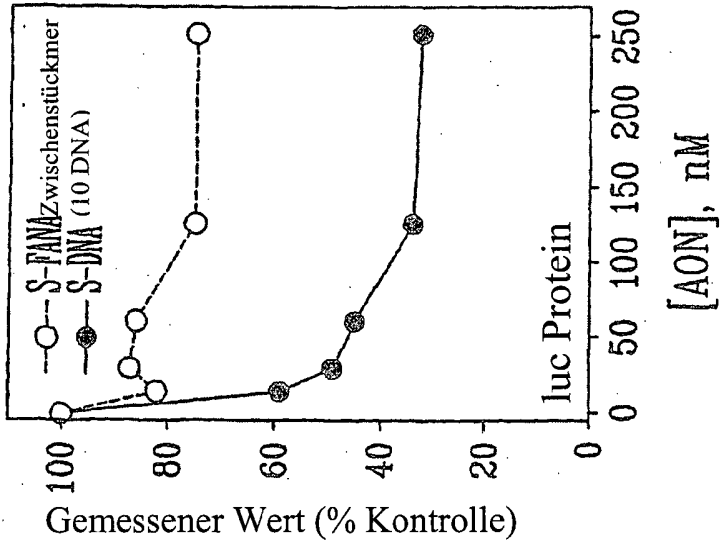


PS-FANA-
Zwischenstückmer

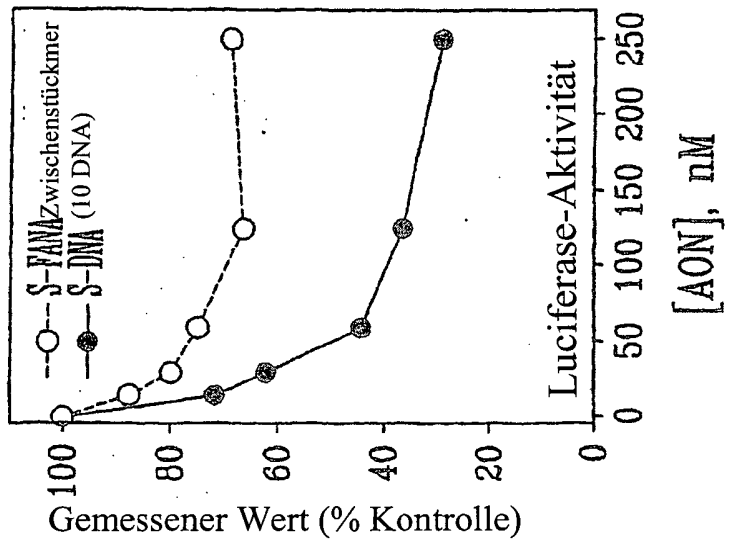
7 5 1



FEF-2C

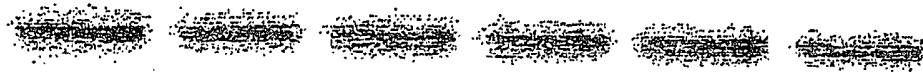


FEF-2B

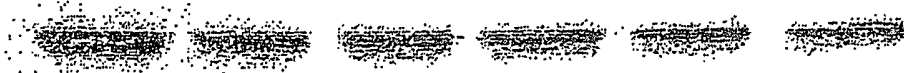


FEF-2A

PS-DNA



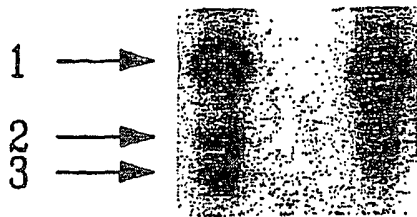
PS-FANA-Zwischenstückmer (10 DNA)



0 15 30 60 125 250

Antisense Konzentration (nM)

755-3A



+ -

755-3B

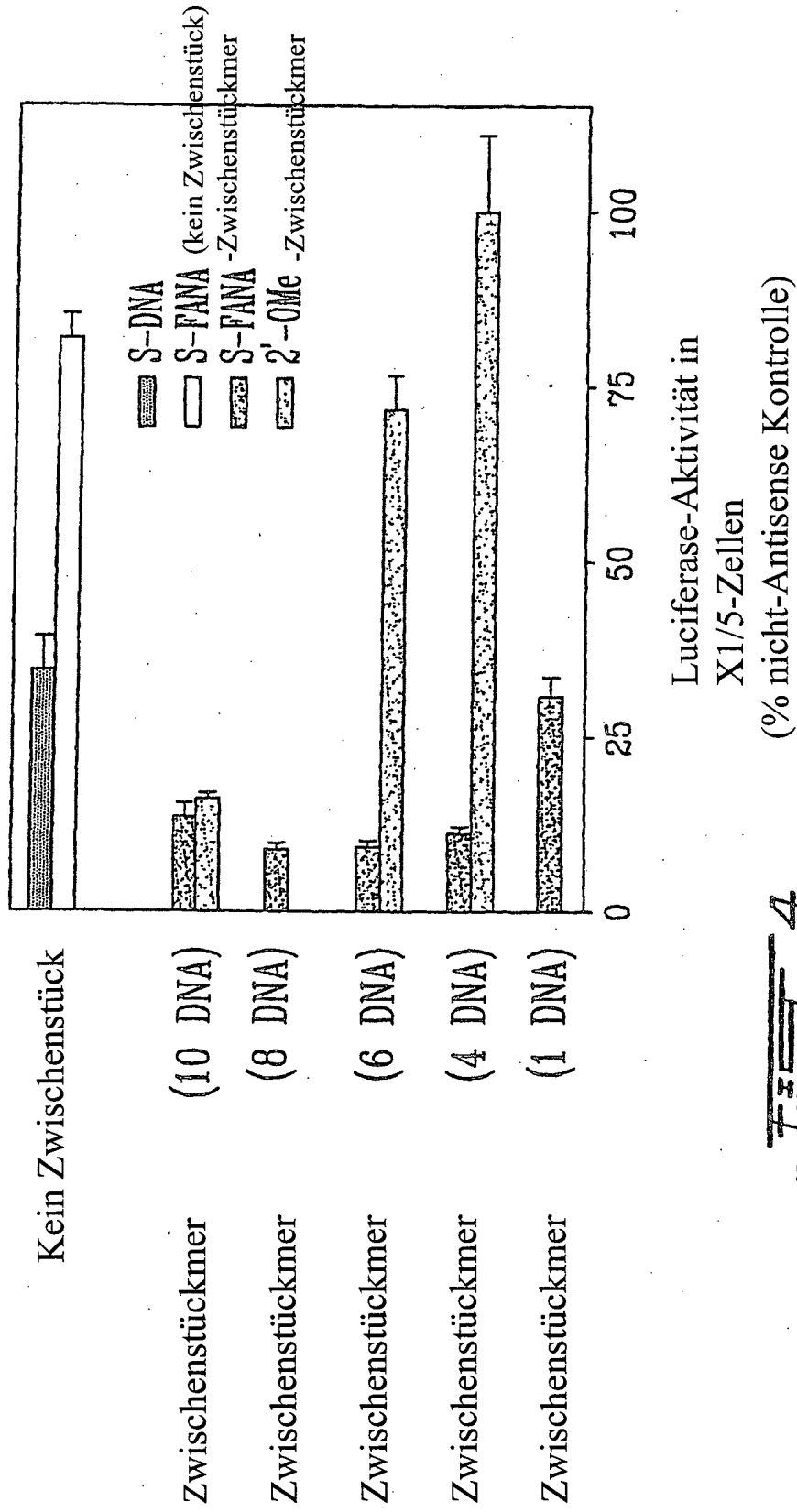
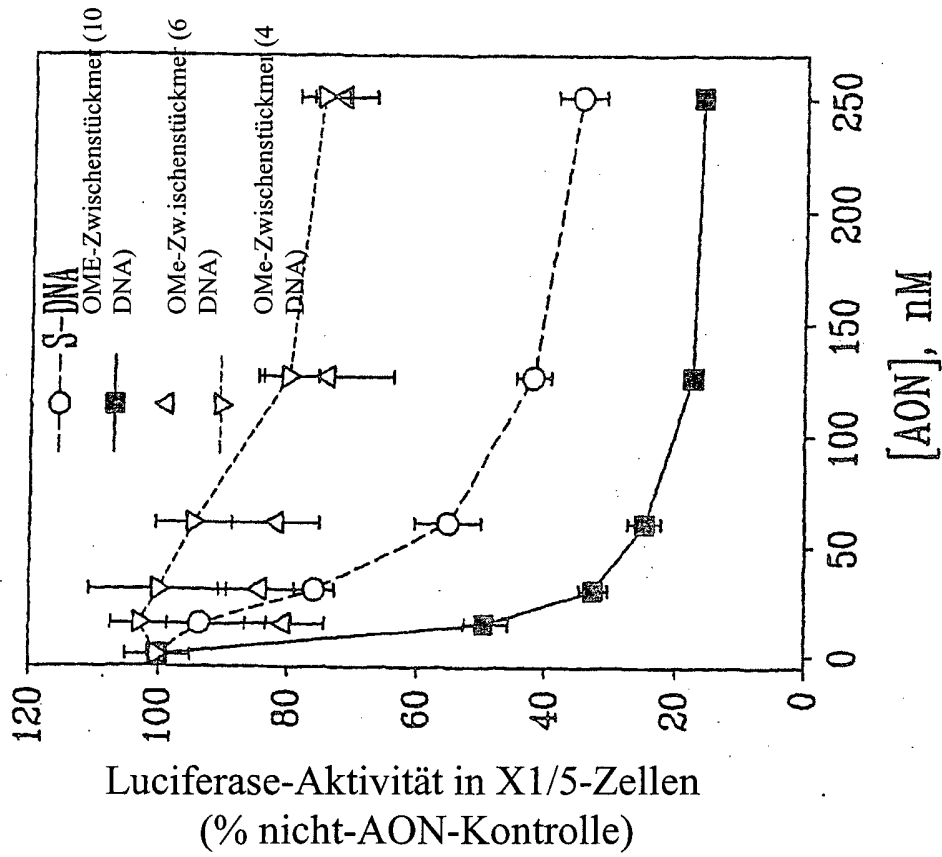
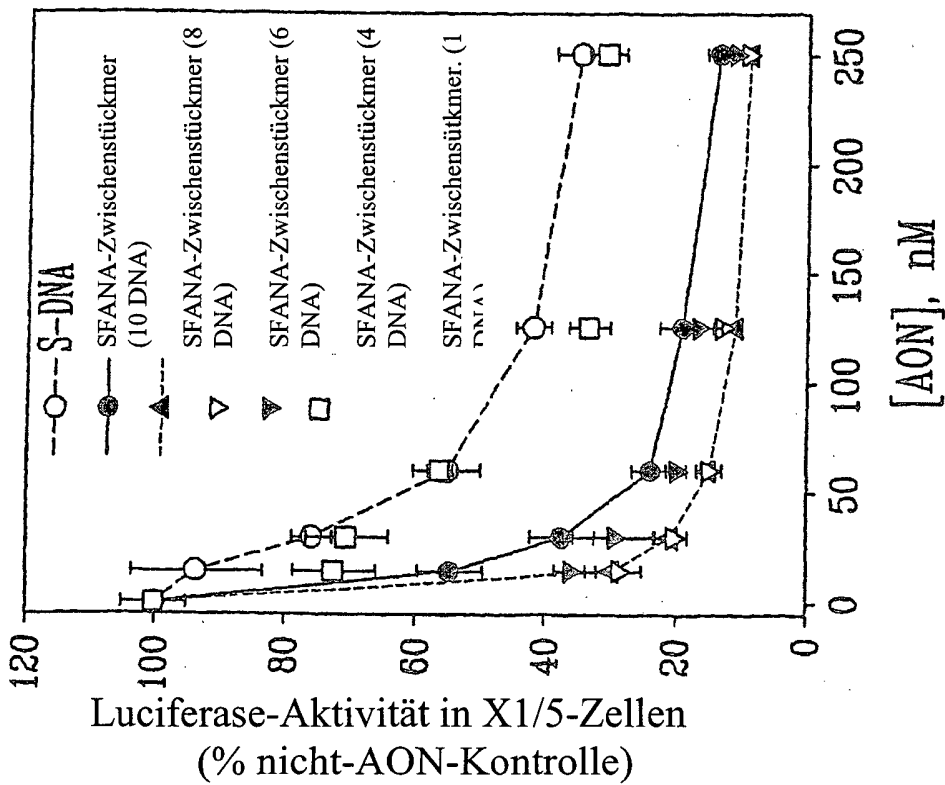


Fig. 4



FSB-5B



FSB-5A