

12 **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

21 Anmeldenummer: **90103641.8**

51 Int. Cl.⁵: **C12N 15/48, C07H 21/04,**
A61K 31/70

22 Anmeldetag: **25.02.90**

Ein Antrag gemäss Regel 88 EPÜ auf Hinzufügung zur Beschreibung liegt vor. Über diesen Antrag wird im Laufe des Verfahrens vor der Prüfungsabteilung eine Entscheidung getroffen werden (Richtlinien für die Prüfung im EPA, A-V, 2.2).

30 Priorität: **09.03.89 DE 3907562**

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:
12.09.90 Patentblatt 90/37

84 Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

71 Anmelder: **BAYER AG**

D-5090 Leverkusen 1 Bayerwerk(DE)

72 Erfinder: **Stropp, Udo, Dr.**
Breidenhofer Strasse 12
D-5657 Haan(DE)

Erfinder: **Baumgarten, Jörg, Dr.**
Henselweg 13

D-5600 Wuppertal 1(DE)

Erfinder: **Löbberding, Antonius, Dr.**
Am Rohm 105

D-5600 Wuppertal 1(DE)

Erfinder: **Springer, Wolfgang, Dr.**
Katernberger Schulweg 31

D-5600 Wuppertal 1(DE)

Erfinder: **Piel, Norbert, Dr.**
Millrath Weg 74

D-4006 Erkrath(DE)

Erfinder: **Kretschmer, Axel, Dr.**
Richard-Zörner-Strasse 32

D-5060 Bergisch-Gladbach 1(DE)

Erfinder: **Kölbl, Heinz, Dr., z.Zt. Mobay**
Corporation

Animal Health Division, 9009 West 67th
Street

Merriam, Kansas 66202/3632(US)

Erfinder: **Frommer, Werner, Prof. Dr.**
Claudiusweg 17

D-5600 Wuppertal 1(DE)

EP 0 386 563 A1

54 **Antisense-Oligonukleotide zur Inhibierung der Transaktivatorzielsequenz (TAR) und der Synthese des Transaktivatorproteins (tat) aus HIV-I und deren Verwendung.**

57 Die vorliegende Erfindung betrifft chemisch modifizierte Antisense-Oligonukleotide zur Inhibierung der Transaktivatorzielsequenz (TAR) und der Synthese des Transaktivatorproteins (tat) aus HIV-I und deren Verwendung in Arzneimitteln. Die chemisch modifizierten Antisense-Oligonukleotide weisen antivirale Wirkungen auf.

Die Arzneimittel sind anwendbar zur Therapie von HIV-Infektionen. Die Antisense-Oligonukleotide sind als Gensonden für die Detektion von HIV geeignet.

Antisense-Oligonukleotide zur Inhibierung der Transaktivatorzielsequenz (TAR) und der Synthese des Transaktivatorproteins (Tat) aus HIV-I und deren Verwendung

Das gezielte Abschalten ungewollter Genexpression durch komplementäre Nucleinsäuren ist ein sehr wirksames Instrument, genetisch bedingte Störungen einer Proteinüberproduktion zu beheben. Hierzu gehört in einem weiteren Sinne auch das Abschalten fremder Nucleinsäuren in einem Organismus, wie nach einem Befall mit Viren, Bakterien oder Pilzen. Bei der Antisense-Methodik hybridisieren Antisense-Oligonukleotidderivate mit der zu hemmenden mRNA, so daß eine Proteinsynthese ausgehend von dieser mRNA unterbunden wird. Der Mechanismus der Hemmwirkung ist dabei noch nicht endgültig aufgeklärt. Diskutiert wird ein Abbau der RNA an den hybridisierten Stellen mit RNAse H oder eine sterische Hinderung der Ribosomenbindung, sowie eine Inhibierung des Spleißvorgangs. In der Literatur gibt es Belege für die Wirkung von Antisense-Oligonukleotiden (Markus-Sekura, C.J. (1988) *Analytical Biochem.* 172, 289-295; Stein, C.A. und Cohen, J.S. (1988) *Cancer Research* 48, 2659-2668; Paoletti, C. (1988) *Anti-Cancer Drug Design* 2, 325-331; Loose-Mitchell, D.S. (1988) *Trends in Pharmacological Sciences* 9, 45-47).

In der hier vorliegenden Erfindung wurde das HIV-I-Tat-Gen als Ziel der Antisense-Strategie ausgewählt, weil das Tat-Protein ein essentielles Regulatorprotein der Virusvermehrung ist (Dayton, A.J. et al. (1986) *Cell* 44, 941-947, Fisher, A.G. et al. (1986) *Nature* 320,367-369). Desweiteren wurde die HIV-I-Transaktivatorzielregion (TAR) im LTR (long terminal repeat) ausgewählt, weil sie allen bisher bekannten mRNAs des Virus gemeinsam ist (Rosen, C.A. et al. (1985) *Cell* 41, 813-823, Parkin, N.T. et al. (1988) *EMBO J.* 7, 2831-2837).

Die erfindungsgemäßen Antisense-Oligonukleotide sind chemisch modifizierte Oligonukleotide und Oligonucleoside, die gegenüber normalen Desoxyribonucleinsäureoligomeren insbesondere an den Phosphordiesterbindungen und auch an den 3'- und 5' Termini derivatisiert sind, so daß sie resistenter gegen Nuclease-Abbau sind und bessere Permeationseigenschaften oder Hybridisierungseigenschaften aufweisen. Diese chemisch modifizierten Antisense-Oligonukleotide werden im folgenden Text kurz als Antisense-Oligonukleotide bezeichnet. Diese erfindungsgemäßen Antisense-Oligonukleotide sind solche, die eine Hemmung der Synthese des Transaktivatorproteins und der Transaktivatorzielsequenz (TAR) aus HIV-I (AIDS-Virus) bewirken und damit antivirale Aktivität besitzen.

In jüngster Zeit wurden einige Forschungsarbeiten zum Versuch des Nachweises der Inhibierung der Expression von HIV-I Genen durch Antisense-Oligonukleotide veröffentlicht [s. Agrawal et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 85, 7079-7083 (1988); J. Goodchild et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 85, 5507-5511 (1988); J. Zaia et al., *J. Virol.* 62, 3914-3917 (1988); P. Sarin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 85,7448-7451 (1988); M. Matsukura et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 84, 7706-7710 (1987)].

Wir haben die in den Publikationen aufgeführten Antisense-Oligonukleotide ebenfalls in unseren Tests geprüft und fanden heraus, daß die biologische Aktivität der Antisense-Oligonukleotide mit den von uns beanspruchten Nucleinsäuresequenzen eine deutlich höhere inhibitorische Aktivität aufwiesen.

Außerdem zeigte sich, daß normale Desoxyribonucleinsäureoligonukleotide in Zellkulturtests in 2-3 Stunden fast vollständig abgebaut werden und daher die von uns eingesetzten, chemisch modifizierten Antisense-Oligonukleotide durch ihre hohe Nucleaseresistenz den publizierten Wirkungen [(J. Goodchild et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 85, 5507-5511 (1988))] überlegen sind.

Versuche, die zur Auffindung antiviraler Oligonukleotide gegen HIV führten:

In einem gekoppelten *in vitro* Test wird ausgehend von dem Transaktivator-Genfragment aus HIV-I Tat-mRNA gebildet. Anschließend wird von der mRNA in einem Kaninchen-Retikulozytenlysat Protein synthetisiert. Dieser Schritt der Proteinsynthese wird durch Antisense-Oligonukleotide kontrolliert. Sie hybridisieren dabei sequenzspezifisch mit der Tat-mRNA und verhindern hierdurch die Proteinsynthese. Über den exakten Mechanismus der Hemmwirkung ist noch nichts Genaues bekannt.

Im Falle von Antisense-mRNA wird die sense mRNA vollständig durch RNA/RNA-Duplexbildung blockiert und ist für eine Proteinsynthese nicht mehr zugänglich. Bei Verwendung von geeigneten Antisense-Oligonukleotiden gibt es eine Vielzahl von theoretischen Möglichkeiten, eine vorhandene mRNA zu blockieren. Obwohl der exakte Hemmechanismus nicht bekannt ist, kann man auf der Ziel-mRNA "sensible" Regionen postulieren, in denen Antisense-Oligonukleotide ihre gewünschte Wirkung zeigen können. Diese sensiblen Regionen können unter anderem die Ribosomenbindungsstelle und der Bereich um das AUG-Startcodon sein. Es können aber auch Regionen sein, die durch die Sekundärstruktur der mRNA bedingt sind, wie z.B. Stamm- und Loop-Bereiche. Sensibel können auch Bereiche auf der mRNA sein, die mit Proteinen oder anderen Nucleinsäuren wechselwirken. Hierzu gehören auch die Spleißstellen.

Die Wirkung der Antisense-Oligonukleotide wurde mit dem folgenden Test überprüft:

1. *In vitro* Transkription:

ausgehend vom zu hemmenden Gen wird mRNA gebildet

2. In vitro Translation:

von der in vitro synthetisierten mRNA wird Protein synthetisiert

3. Hemmung der in vitro Translation:

5 nachdem unter 2. die Proteinsynthese erfolgt ist (positive Kontrolle), können Antisense-Oligonukleotide eingesetzt werden, um die Proteinsynthese in nun folgenden Tests zu hemmen und die Hemmung quantitativ zu messen.

4. Hemmung in der Zellkultur:

die unter 3. positiv aufgefallenen Antisense-Oligonukleotide werden in der Zellkultur getestet.

10 Es wird ferner darauf geachtet, daß die Antisense-Sequenzen in hoch konservierten Gensequenz-Regionen liegen. Nach derzeitigem Kenntnisstand sind die erfindungsgemäßen Oligonukleotide und deren Derivate, wie unten beschrieben für die parenterale Anwendung geeignet. Die entsprechenden pharmazeutischen Zubereitungen enthalten neben den Oligonukleotiden die für parenterale Zubereitungen üblichen Hilfsstoffe wie zum Beispiel Puffer und/oder Stabilisatoren oder Liposomenformulierungen. Ferner ist eine
15 topische Anwendung denkbar, weil das tat-Gen in der Haut expremiert wird und hier möglicherweise Karposi-Sarkome verursacht [J. Vogel et al., Nature 335, 606-611 (1988)]. Die hierfür einsetzbaren Zubereitungen sind zum Beispiel Salben, Cremes, Lösungen oder Pflaster, die neben dem Wirkstoff die für diese Anwendung geeigneten pharmazeutischen Hilfsstoffe enthalten.

20

Beispiel 1:

Synthese chemisch modifizierter Antisense-Oligonukleotide

25

Synthese von modifizierten und unmodifizierten Antisense-Oligonukleotiden:

I. Darstellung von Oligonukleotiddiestern mittels automatischer Gensynthese nach der Phosphorarnidit-
30 Methode: Beaucage et al., Tetrahedron Lett. 22, 1859 (1981)

II. Darstellung der Phosphorthioate mittels automatischer Oligonukleotidsynthese ausgehend von Hydrogenphosphonat-Vorstufen oder Phosphoramidaten:

Stec et al., J. Am. Chem. Soc. 106, 6077 (1984)

B. Froehler, Tetrahedron Lett. 27, 5575-5578 (1986)

35 III. Darstellung der Methylphosphonate:

P. Miller et al., Biochemistry 25, 5092-5097 (1986)

IV. Darstellung von Oligonukleosiden mit Carbamatinternukleosidbindung

E. Stirchak et al., J. Org. Chem. 52, 4202-4206 (1987)

V. Darstellung von Oligonukleotiden, wobei diese an ausgewählten Internukleosidbindungen

40 a) eine oder mehrere Phosphorthioatbindungen gemäß II

b) eine oder mehrere Methylphosphonatbindungen gemäß III

c) eine oder mehrere Carbamatinternukleosidbindungen gemäß IV

d) mehrere Internukleosidbindungen gemäß I, II, III und IV gleichzeitig aufweisen.

45 VI. Darstellung von Oligonukleotiden, die kovalent am 3'- oder 5' Terminus mit Verbindungen verbunden sind:

M. Lemaitre et al., Nucleosides Nucleotides 6, 311-315 (1987)

N.T. Thuong et al., PNAS (USA) 84, 5129-5133 (1987)

T. Le Doan et al., Nucleic Acid Res. 15, 7749-7760 (1987)

50 J. Vasseur et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 152, 56-61 (1988)

E. Brosalind et al., Bioorg. Khim. 14, 125-128 (1988)

J.J. Toulme et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 83, 1227 (1986)

Beispiel 2

55

Klonierung von Genfragmenten in den Vektor pSP65:

pSP65-Tat: das 240 bp große Sal I/ Hind III-Tat-Fragment aus HIV-1 (nt 5358 -5625, nach L. Ratner et al. Nature, 313 (1985), 277-284) wurde in den identisch geschnittenen pSP65 Vektor ligiert und in E.coli 5k transformiert (Maniatis, T. et.al. (1982) "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York)

5 pSP65-TAR-tat: das TAR-Fragment [(-17, 80), bezogen auf die Cap-Stelle] wurde aus der LTR des HIV-1 durch Schneiden mit Pvu II und Sal I isoliert und in die Sma I/Sal I- Schnittstelle des Konstruktes pSP65-Tat ligiert. (Das Tat-Gen dient in dem pSP65-TAR-Tat-Klon nur als Reportergen und könnte auch durch ein anderes Protein ersetzt werden.)

10 Positive Klone wurden durch Plasmidminipräparation und Restriktionsenzymverdau identifiziert und anschließend durch DNA-Sequenzanalyse vollständig charakterisiert.

Beispiel 3:

15

Gekoppelte in vitro Transkription und Translation

Tat-mRNA bzw. TAR-mRNA wurden im wesentlichen nach Melton, D.A. et.al. (1984) Nucl. Acids Res. 12, 7035-7056 synthetisiert, wobei die DNA der Konstrukte mit Pvu II oder Hind III linearisiert wurden.

20 Zur in vitro Translation wurde ein Kaninchenretikulozytenlysats der Fa. Stratagene, La Jolla, CA, USA verwendet, das im wesentlichen auf den Methoden von Hunt, T. und Jackson, R.J. (1974) "Modern Trends in Human Leukemia", Hrsg. Neth, Gallo, Spiegelman und Stohlman, Lehmanns Verlag, München und Pelham, H.R.B. und Jackson, R.J. (1976) Eur. J. Biochem. 67, 247ff beruht.

25 1 µg mRNA wird in Gegenwart von radioaktiv-markiertem Cystein zur Translation eingesetzt. Die Analyse des gebildeten Proteins erfolgte auf einem 6-20 % diskontinuierlichem SDS-PAGE nach Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685.

30 Zur quantitativen Messung der Translationsinhibition durch Antisense-Oligonukleotide wurden zur mRNA eine gewünschte Menge Oligonukleotid (0,1 µg - 2 µg) hinzugegeben und dann wie oben beschrieben translatiert. Autoradiographien von SDS-Polyacrylamidelektrophoresegelen der Testansätze wurden mit einem Scanner quantitativ ausgewertet. Wie aus der Tabelle 1 hervorgeht, hemmen die eingesetzten spezifischen Antisense-Oligonukleotide die Translation zu 90-95%. Unspezifische Antisense-Oligonukleotide hemmen dagegen nicht.

35 Beispiel 4:

Klonierung eines LTR-hGH-Reportergenkonstruktes zur Transfektion in eukaryotischen Zellen

40 Aus dem Plasmid pOGH (Nichols Institute, Los Angeles, CA, USA) wurde das genomische hGH-Genfragment (humanes Wachstumshormogen) mit seinen 5 Exons und Introns als 2.2kb großes Sal I-EcoRI Fragment herausgeschnitten.

45 Gleichzeitig wurde aus dem Plasmid pΔ(83-5365/5607-7719/8053-9296) ein 2.1kb großes EcoRI-Sal I Fragment herausgeschitten, das das LTR-Fragment von HIV(-167,80) und pBR322-Sequenzen mit dem Replicon enthält (Sodroski, J. et al., Science (1985) 229, 74-77).

Durch die Doppelspaltung mit EcoRI und Sal I erhält man die richtige Orientierung des hGH-Gens zum LTR-Promoterbereich. Beide Genfragmente wurden miteinander ligiert und in E.coli 5K transformiert.

50 Rekombinante Klone, die LTR und hGH-Sequenzen enthalten, wurden über die Ampicillinresistenz von pBR322 vorselektioniert und dann nach analytischer Isolierung der Plasmide durch Spaltung mit Restriktionsenzymen und Southern Blotting mit dem LTR- und hGH-Genfragment als Genprobe sowie durch DNA-Sequenzanalyse identifiziert.

Beispiel 5:

55

Herstellung einer Testzelle

Die biologische Wirkung von antisense Oligonukleotiden wurde mit einer genetisch manipulierten HeLa-Zelllinie gemessen. Hierzu wurde der LTR-hGH enthaltende Vektor zusammen mit pKOneo stabil in die HeLa-Zelllinie (ATCC.CCL2) cotransfiziert.

5 Die Cotransfektion wurde nach der Ca-Phosphat Methode durchgeführt, wie in "Basic Methods in Molecular Biology", Elsevier Science Publishing Co, Inc. New York,(1986), Seiten 286-289 beschrieben.

Die Selektion der cotransfizierten Zellen erfolgte mit dem Antibiotikum G418 Sulfat (Fa. Gibco). Nach der Cotransfektion mit dem LTR-hGH-Vektor und dem pKOneo-Vektor, das das G418 Resistenz-Gen enthält und einer 2-tägigen Vorinkubation wurde dem Wachstumsmedium (DMEM, Fa. Flow Lab.) 0,6 mg G418 pro ml zugesetzt. Nach weiterer 14-tägiger Inkubation wurden die Klone isoliert, die sich aus den gegen G418
10 resistenten transfizierten Zellen gebildet hatten.

Die isolierten Klone wurden auf hGH-Produktion untersucht. Der stabile Einbau der LTR-Region wurde mit Hilfe von Genprobetechniken detektiert, d.h. die genomische DNA der Zellen wurde isoliert und die LTR-Region mithilfe der PCR-Methode (polymerase chain reaction) amplifiziert und mit LTR-spezifischen Gensonden nachgewiesen. Zwei HeLa-Transfektanten wurden aufgrund dieser Untersuchungen als Testzelllinien ausgewählt.
15

Beispiel 6:

20

Biologische Testung von Oligonukleotiden

Die biologische Wirkung von Antisense-Oligonukleotiden, die spezifisch auf die LTR-Region aus HIV einwirken, wurde an der Hemmung der Bildung des humanen Wachstumshormons (hGH) durch die Testzelllinien gemessen. Die hGH-Testung erfolgte mit dem von der Fa. Nichols Institute, Diagnostics, San Juan Capistrano angebotenen Immunoassay zur quantitativen Bestimmung von humanem Wachstumshormon.
25

Die HeLa-Testzelllinien wurden zunächst für 1 bis 3 Tage in Gegenwart verschiedener Konzentrationen (10 µg - 100 µg/ml) an antisense Phosphorothioat-Oligonukleotiden vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Gegenwart der Oligonukleotide trypsinisiert und in neues Wachstumsmedium (DMEM Medium, Fa. Flow Lab.) umgesetzt. Nach weiterer Inkubation für 24 und 48 Stunden wurde die hGH-Konzentration im Wachstumsmedium gemessen. Der Test wurde in 96 microwell Mikrotiterplatten durchgeführt.
30

Wie aus der Abb. 3a zu entnehmen ist, hemmen die LTR sequenzspezifischen antisense Oligonukleotide (g) und (h) konzentrationsabhängig die hGH Produktion zwischen 30 und 70%.

35 Ein nicht sequenzspezifisches Phosphorothioat-Oligonukleotid (CCC GCG CCA AAG ACC GCC ACC), bei dem alle Phosphordiesterbindungen schwefelsubstituiert sind, zeigte dagegen auch in höheren Konzentrationen (50-100 µg/ml) nur geringe inhibitorische Aktivität (Abb. 3b).

40 Ergebnisse

Die in vitro Translation der Tat-mRNA führte zu einem Protein von der Größe 13 kDa (bei Hind III geschnittener DNA) und 17 kDa (bei Pvu II geschnittener DNA).

45 Die Hemmung der in vitro Translation durch Antisense-Oligonukleotid-Diester erfolgte bei einer Konzentration von ca. 5-25 µm Oligonukleotid. EG wurden Oligonukleotide ausfindig gemacht, die eine Hemmung der Proteinsynthese von ca. 90-95 % erzielten (siehe Tabelle 1 und Abb. 1).

Das Resultat der Hemmung der in vitro Translationen ist in der Abbildung 1 dargestellt. Gebildetes Protein in Prozent ist gegen die jeweiligen Antisense-Oligonukleotide aufgetragen. Die sequenzabhängige Lage der Antisense-Oligonukleotide ist schematisch auf der Abzisse in 5'-3'-Orientierung der Tat-mRNA aufgeführt. Die Kontrolle (in der Abb. 1 ganz rechts dargestellt) symbolisiert 100 % Tat-Proteinsynthese. Ein
50 Oligonukleotid wirkt um so besser, je geringer die Proteinsynthese ist.

Es wurden Antisense-Oligonukleotide gegen die folgenden TAR- und Leadersequenzen nt 21-53,74-161,202-279 und das zweite und dritte Exon des Tat-Gens nt 5368-5403, 5421-5548, 5583-5617 und nt 7967-8366, 8385-9183 (Nukleotid-Nummern nach L. Ratner et al., Nature 313, (1985) 277-284) des HIV I
55 Genoms gefunden.

Bei der durchgeführten Testreihe war es überraschend, daß die Antisense-Oligonukleotide sowohl in der 5' nicht translatierten Region, am 3'-Ende der vorliegenden Tat-mRNA und innerhalb der Tat-mRNA die Proteinsynthese hemmen können, obwohl andere Gruppen publiziert haben, daß die Antisense-Oligonukleo-

tide im Bereich des AUG-Startcodons die Proteinsynthese am besten hemmen. Die hier vorgestellten Experimente zeigen überraschenderweise, daß Oligonukleotide auch am Ende der mRNA eine sehr gute Inhibition zeigen. Der Mechanismus, der diesem Phänomen zugrunde liegt, ist unbekannt. Die Antisense-Oligonukleotide zeigen eine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung auf die tat-Expression in vitro (Abb. 2).
 5 Experimentell konnte bei gleicher Vorgehensweise ebenso die inhibitorische Wirkung von chemisch modifizierten Anisense-Oligonukleotiden nachgewiesen werden: Die entsprechenden Methylphosphonate und Phosphorthioate korrelierten sehr gut in ihrer Wirkung mit den genannten Ergebnissen, die mit Phosphordiester-Oligonukleotiden erzielt wurden.

Als besonders hoch wirksam erweist sich eine Kombination aus internukleotid-modifizierten Oligonukleo-
 10 tiden mit endständig kovalent verknüpften lipophilen Verbindungen wie Cholesterin, Hexadecanol, Acridinderivate u.a (Synthese analog zu Thuong, N.T. und Chassignol, M. (1988), Tetrahedron Letters 29, 5905-5908). Diese Konjugate erhöhen die Zellmembranpenetration unter gleichzeitiger Wirkungssteigerung. So zeigen beispielsweise Konjugate aus Phosphorthioat-Oligonukleotiden und Cholesterin eine deutlich höhere Hemmung der Proteinsynthese als das identische Phosphorthioat ohne das kovalent gebundene Cholesterin
 15 (Abb. 2A).

Die Wirkung der HIV-sequenzspezifischen Antisense-Oligonukleotide wurde auch an Östrogenrezeptor-, TMV- und BMV-mRNA erprobt. Es zeigte sich, daß sie die Translation dieser mRNAs in den verwendeten Konzentrationen nicht beeinflussen. Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide sind also hoch spezifisch für die HIV-Gensequenz.

20 Die hier ebenfalls getestete TAR-mRNA zeichnet sich durch eine ausgeprägte Stamm-Loop-Struktur aus (Feng, S. und Holland, E.C. (1988) Nature 334, 165-167). In dieser Transaktivatorzielsequenz TAR wirkten die Oligonukleotide (Phosphorthioate) am besten, die im Loop-Bereich hybridisierten (g und h in Tabelle 1). Die Sekundärstruktur kann aus einer computer-simulierten Berechnung erhalten werden.

Vergleichende Untersuchungen hinsichtlich der Anzahl der Nukleotidmonomeren in den Antisense-
 25 Oligonukleotiden haben ergeben, daß insbesondere ab einer Sequenzlänge von 10 Nukleotiden sehr gute Wirkungen zur Translationsinhibition erzielbar waren. Weiterhin wurde festgestellt, daß bei Antisense-Oligonukleotiden mit einer Sequenzlänge von mehr als 18 Nukleotiden keine Steigerung der Wirkung in den von uns verwendeten Tasts nachweisbar war, aber auch keine Verringerung der Translationsinhibition auftrat. Die Verwendung von länger-kettigen Antisense-Oligonukleotiden ist die sequenzspezifische Wirkung und die Hybridisierung mit einer möglichst hohen Schmelztemperatur (T_m) förderlich. Daher können
 30 grundsätzlich die von uns als besonders wirksam identifizierten Antisense-Oligonukleotide an den angegebenen 3'- und 5'-Termini der Target-Sequenz entsprechend durch die komplementären Nukleotide verlängert werden, ohne die gefundene Wirkqualität zu verlieren. Die erfindungsgemäße Wirkqualität kann außerdem durch Veränderungen in den angegebenen Nukleotidsequenzen durch Austausch einer oder
 35 mehrere Nukleobasen mit anderen Partialstrukturen wie z.B. Hypoxanthin oder anderen Purinen, Pyrimidinen oder gänzlich anderen Substituenten aufrecht erhalten werden, die die Hybridisierung nicht verschlechtern. Weiterhin wirken Antisense-Oligonukleotide bei Veränderungen der angegebenen Oligonukleotid-Sequenzen durch Weglassen oder Hinzunahme von Nukleotiden oder Pseudonukleotiden innerhalb der genannten Sequenzen, wenn die Hybridisierung dadurch nicht verhindert wird.

40 An das zellfreie in vitro Testsystem schließt sich ein Zellsystem an, in dem die "ex vivo" Wirkung der Antisense-Oligonukleotide bestätigt wird. Hierzu werden aber keine normalen Diester-Oligonukleotide verwendet, weil sie schlecht die Zellmembran penetrieren können und im Zytosol zu schnell durch Nukleasen abgebaut werden wurden. An die Stelle der Diester werden im Zelltest Methylphosphonate, Phosphorthioate oder andersartig, gegen Nukleasen geschützte Oligonukleotide verwendet, die ferner die
 45 Fähigkeit besitzen müssen, Zellmembranen penetrieren zu können. Zahlreiche Modifizierungen wurden beschrieben:

Methylphosphonate: Miller, P.S. et.al. (1985) Biochimie 67,769-776; Phosphorthioate: F. Eckstein, Ann. Rev. Biochem. 54, 367-402, Matsukura, M. et.al. (1987) PNAS 84, 7706-7710; endständig modifizierte Oligonukleotide (polyL-Lys, Acridine, Psoralene, Azidoproflavin): Lemaitre, M. et.al. (1987) PNAS 84, 648-652,
 50 Zerial, A. et.al. (1987) Nucleic Acids Res. 15,9909-9919; Toulme, J.J. et al. (1986) PNAS 83, 1227-12231; Lee, B.L. et al. (1988) Biochemistry 27, 3187-3203; Le Doan, T. et al. (1987) NAR 15,7749ff; Alpha-Oligonukleotide: Thuong, N.T. et.al. (1987) PNAS 84, 5129-5133; Carbamat-Oligonukleotide: Stirchak, E.P. and Summerton, J.E. (1987), J. Organic Chemistry 52, 4202-4206, Amidat-Oligonukleotide: diese und andere Derivate werden in den Übersichtsartikeln von G. Zon aufgeführt (Pharmaceutical Research 5
 55 (1988), 539-549).

Die folgenden Antisense-Oligonukleotide erwiesen sich aus der Gruppe einer Vielzahl von getesteten Oligonukleotiden als besonders hoch wirksam gegen HIV-1.

Tat-Oligos:

- a) TAA CGC CTA TTC TGC TAT GTC GAC (5366-5389)
- b) TCT AGT CTA GGA TCT ACT GG (5417-5436)
- c) GGC TGA CTT CCT GGA TGC TT (5444-5463)
- d) GCA ATG AAA GCA ACA CTT TT (5493-5512)
- 5 e) GAG TCT GAC TGC CTT GAG GA (5584-5603)
- f) CTT TGA TAG AGA AAC TTG AT (5604-5623)

TAR-Oligos:

- g) GCT CCC AGG CTC AGA TC (21-37)

- h) CCA GAG AGC TCC CAG GC (28-44) Die Numerierung erfolgt nach L. Ratner (siehe oben).

10 Die vorliegende Erfindung umfaßt auch Fragmente dieser Nukleotide, sowie Verlängerungen dieser Sequenzen am 3'- und/oder 5'-Ende, insofern sie die Wirkung der angegebenen Sequenzen nicht verschlechtern.

Außerdem Veränderungen in den angegebenen Nukleotidsequenzen durch Austausch einer oder mehrerer Nukleobasen mit anderen Partialstrukturen wie z.B. Inosin oder anderen Purinen, Pymidinen oder
15 gänzlich anderen Substituenten.

Außerdem Veränderungen der angegebenen Oligonukleotidsequenzen durch Weglassen oder Hinzu-
nahme von Nukleotiden oder Pseudonukleotiden innerhalb der genannten Sequenzen. Im allgemeinen beträgt die Kettenlänge der Oligonukleotide 6-50 Basenpaare. Bevorzugt sind 10-30 und besonders bevorzugt sind 10-20 Basenpaare.

20 Es ist bekannt, daß das tat-Gen mit dem rev-Gen überlappt. Unabhängig vom Namen des Gens gelten die hier angegebenen Sequenzen als Wirkort für die erfindungsgemäßen Antisense-Oligonukleotide und Derivate.

Die in diesem Patent aufgeführten Sequenzen, einschließlich ihrer Komplemente werden als Gensonden zur Diagnostik von HIV-I in Patienten und Gewebeproben sowie in Blutkonserven eingesetzt. Verwendet
25 werden hierzu Diester oder chemisch modifizierte Oligonukleotide in der Weise, daß das Oligonukleotid mit detektierbaren Substanzen gekoppelt wird (radioaktive Isotope, Enzyme, chemoluminierende oder fluoreszierende Farbstoffe, Biotin oder andere durch Antikörper erkennbare Epitope u.a.).

30

35

40

45

50

55

Tabelle 1:

Tabelle der getesteten Oligonukleotide in der Tat-mRNA-Region:		
Oligonukleotid (interne Numerierung)	%-Translation	Oligonukleotide mit guter Hemmwirkung und unbeschrieben
58	10	a
57	30	
56	50	
55	30	
31	15	
34	65	b
35	90	
36	25	c
37	90	
38	35	
39	45	
40	98	d
41	15	
42	40	
43	40	
44	50	
46	10	e
47	55	
48	15	
49	95	
50	10	
51	10	f
Kontrolle (ohne Oligo)		
Phosphorthioatoligonukleotide in der TAR-Region:		
Oligonukleotid (interne Numerierung)	%-Translation	Oligonukleotide mit guter Hemmwirkung
560	20	g
558	5	
559	5	h
561	20	
562	55	

45 Ansprüche

1. Chemisch modifizierte Antisense-Oligonukleotide mit Sequenzen gegen die TAR-Sequenz und Leader-Sequenz nt 21-53, 74-161, 202-279 und das zweite und dritte Exon des Tat-Gens nt 5368-5403, 5421-5548, 5583-5617 und nt 7967-8366, 8385-9183 des HIV-I-Genoms.

2. Antisense-Oligonukleotide gemäß Anspruch 1 gegen die TAR-Sequenz nt 21-53 und Tat-Sequenz 5368-5403, 5421-5548, 5583-5617.

3. Antisense-Oligonukleotide gemäß den Ansprüchen 1 und 2 aus der Gruppe:

a) TAA CGC CTA TTC TGC TAT GTC GAC (5366-5389)

b) TCT AGT CTA GGA TCT ACT GG (5417-5436)

c) GGC TGA CTT CCT GGA TGC TT (5444-5463)

d) GCA ATG AAA GCA ACA CTT TT (5493-5512)

e) GAG TCT GAC TGC CTT GAG GA (5584-5603)

f) CTT TGA TAG AGA AAC TTG AT (5604-5623)

g) GCT CCC AGG CTC AGA TC (21-37)

h) CCA GAG AGC TCC CAG GC (28-44)

4. Antisense-Oligonukleotide gemäß den Ansprüchen 1 bis 3, worin eine, mehrere oder alle Internukleotidphosphordiesterbindungen als Phosphorthioate oder Methylphosphonate oder beide chemischen Modifikationen vorliegen.

5. Arzneimittel enthaltend die Antisense-Oligonukleotide gemäß den Ansprüchen 1 bis 4.

6. Antisense-Oligonukleotide gem. den Ansprüchen 1 bis 4 zur Anwendung zur therapeutischen Behandlung von HIV-Infektionen.

7. Verwendung der Antisense-Oligonukleotide nach Ansprüchen 1 bis 4 einschließlich der komplementären Sequenzen als Gensonde.

8. Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden mit Sequenzen gemäß Anspruch 3 einschließlich deren komplementären Sequenzen als Gensonden, wobei die als Diester vorliegen.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

FIG.1

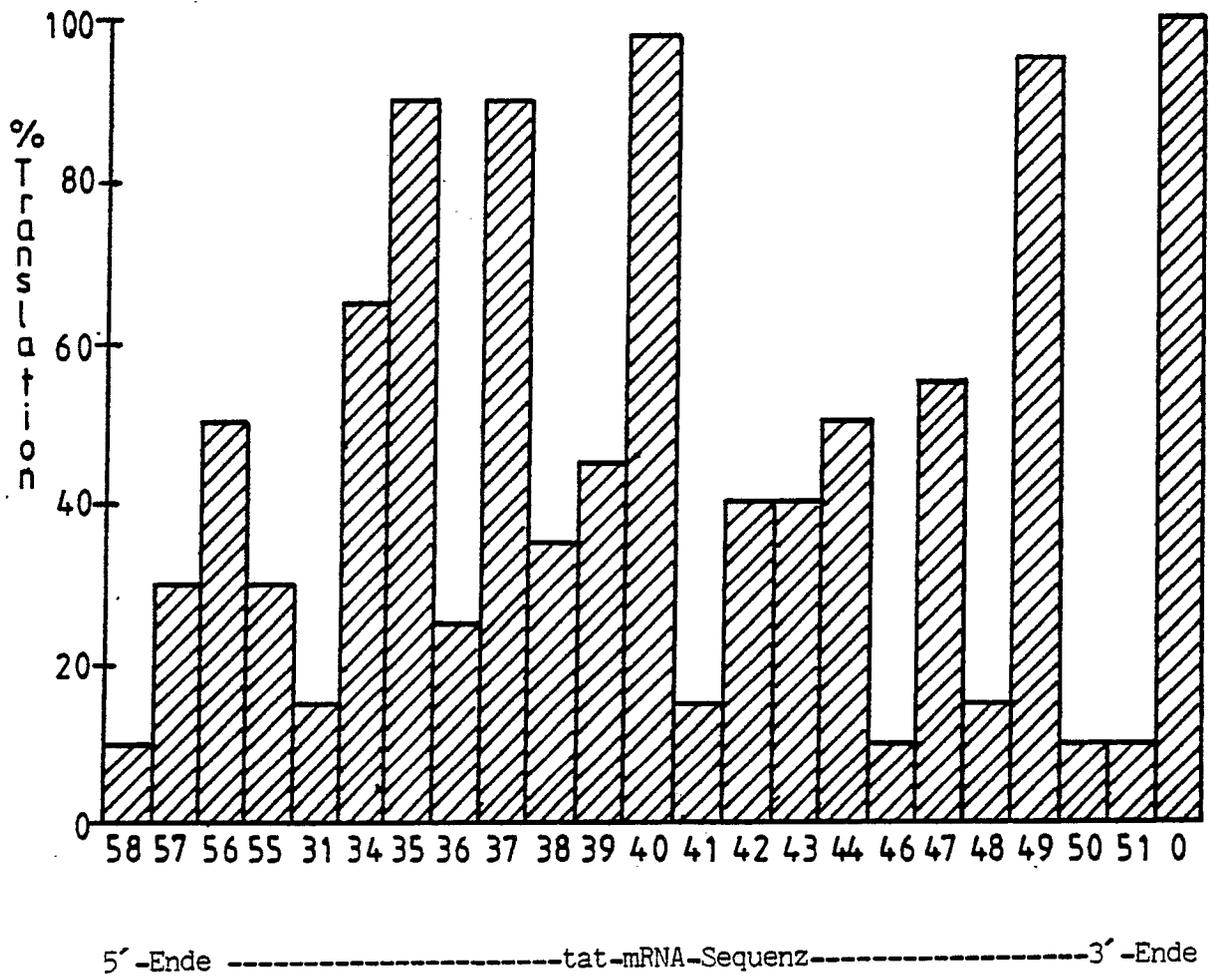


FIG. 2

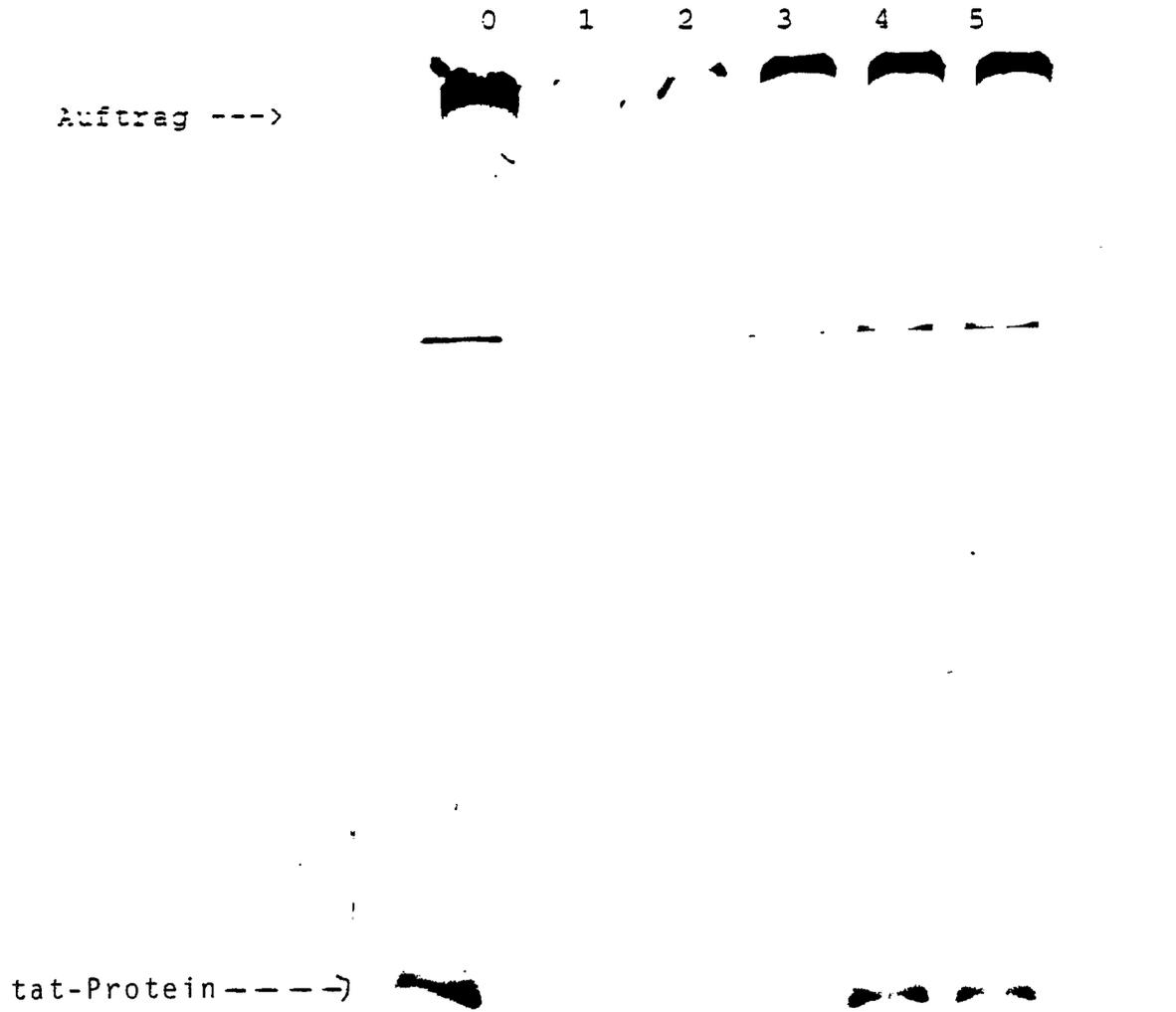


FIG. 2a

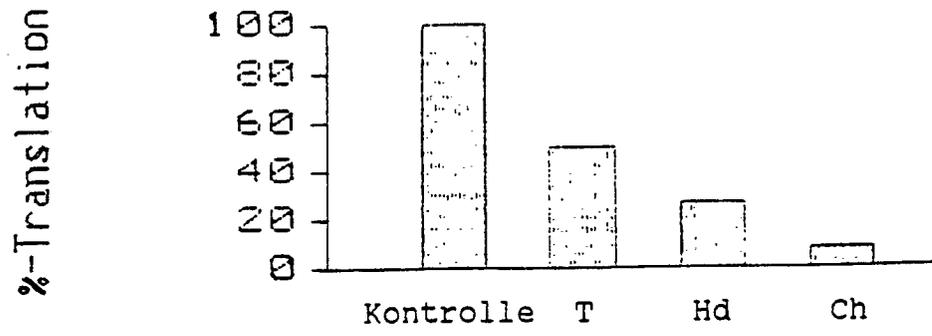


FIG.2b

FIG. 3a

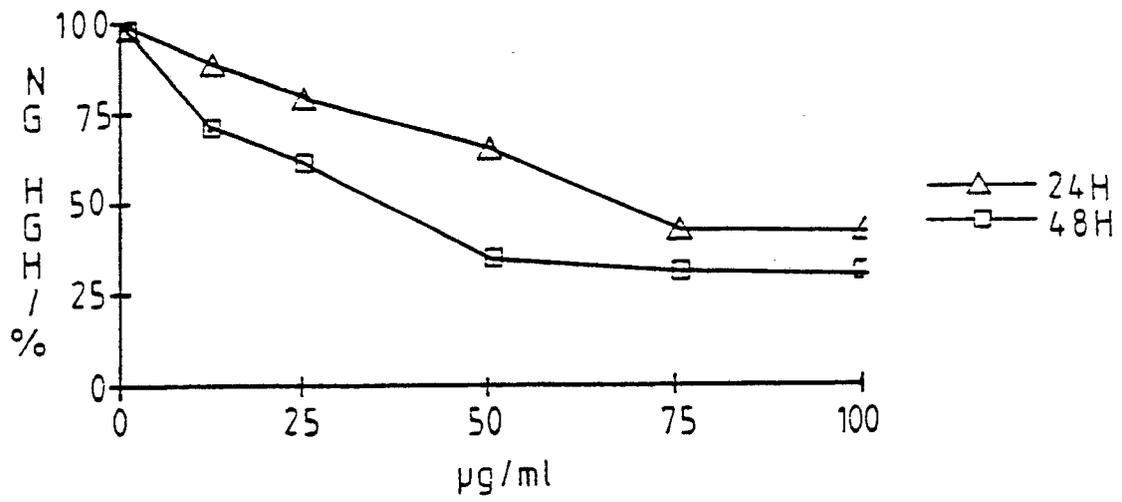
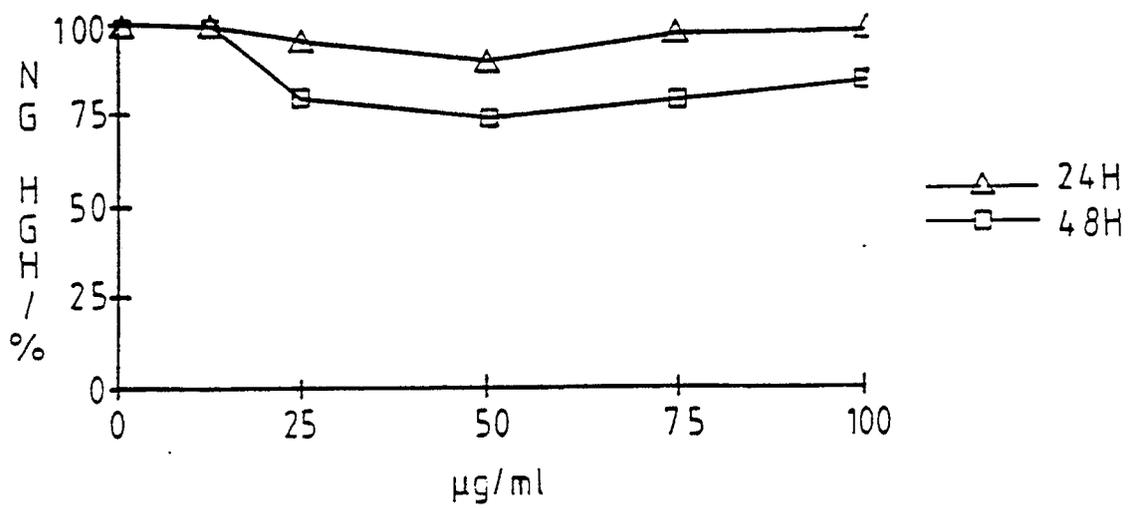


FIG. 3b





EP 90103641.8

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			EP 90103641.8
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.)
D, A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, Band 85, Nr. 20, Oktober 1988, Baltimore, USA P.S.SARIN et al. "Inhibition of acquired immunodeficiency syndrome virus by oligodeoxynucleoside methylphosphonates" Seiten 7448-7451 * Gesamt *	1	C 12 N 15/48 C 07 H 21/04 A 61 K 31/70
D, A	JOURNAL OF VIROLOGY, Band 62, Nr. 10, Oktober 1988, Washington, DC J.A.ZAIA et al. "Inhibition of Human Immunodeficiency Virus by Using an Oligonucleoside Methylphosphonate Targeted to the tat-3 Gene" Seiten 3914-3917 * Gesamt *	1	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.)
A	WO - A1 - 88/07 544 (UNITED STATES OF AMERICA, represented by THE UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE) * Seite 1; Ansprüche *	1	C 12 N C 07 H A 61 K
D, A	ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, Band 172, 1988, San Diego, USA C.J.MARCUS-SEKURA "Techniques for Using Antisense Oligodeoxyribonucleotides to Study Gene Expression" Seiten 289-295 * Gesamt *	1	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort WIEN		Abschlußdatum der Recherche 14-05-1990	Prüfer WOLF
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN		E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet		D : in der Anmeldung angerührtes Dokument	
Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie		L : aus andern Gründen angeführtes Dokument	
A : technologischer Hintergrund			
O : nichtschriftliche Offenbarung			
P : Zwischenliteratur		& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze			



EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	
D, A	<p style="text-align: center;">---</p> <p>CANCER RESEARCH, Band 48, Nr. 10, 1988, Chicago A. STEIN et al. "Oligodeoxy-nucleotides as Inhibitors of Gene Expression: A Review" Seiten 2659-2668 * Gesamt *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort WIEN		Abschlußdatum der Recherche 14-05-1990	Prüfer WOLF
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze		E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	