

(19)



(10) **LT 6426 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **6426**

(51) Int. Cl. (2017.01): **C12N 15/00**

(21) Paraiškos numeris: **2015 092**

(22) Paraiškos padavimo data: **2015-10-30**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2017-05-25**

(45) Patent paskelbimo data: **2017-07-10**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: —

(72) Išradėjas:

Juozas STANAITIS, LT
Austė KIŠKIENĖ, LT

(73) Patent savininkas:

UAB „Bioseka“, Saulėtekio al. 15, LT-10224 Vilnius, LT

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

Vaclovas KIŠKIS, Bebrų g. 20, Adomaičiai, LT-15234 Vilniaus raj., LT

(54) Pavadinimas:

Priešprasminis oligonukleotidas bakterinių bioplėvelių ir atsparumo antibiotikams prevencijai

(57) Referatas:

Išradimas yra mikrobiologijos srities ir yra konkrečiai susijęs su streptokokų sukeltų bakterinių infekcijų, pasižyminčių bakterinių bioplėvelių formavimusi ant žmogaus audinių, prevencija ir gydymu, taip pat streptokokų atsparumo antibiotikams prevencija, panaudojant priešprasminį oligonukleotidą ir farmacines kompozicijas jo pagrindu. Išradimas parodo naują būdą, skirtą bioplėvelių, tokių kaip bioplėvelė, besiformuojanti iš burnos streptokokų, ypač *S. mutans* ir *S. sobrinus*, ir bioplėvelių junginių ant kietų paviršių, pavyzdžiui stiklo ir žmogaus audinių, formavimosi mažinimui, slopinimui ar kelio tam užkirtimui.

LT 6426 B

Šis išradimas yra mikrobiologijos srities ir yra susijęs su bakterinių bioplėvelių atsiradimu ir augimu ant žmogaus audinių. Šis išradimas konkrečiai susijęs su streptokokų sukeltų bakterinių infekcijų, pasižyminčių bakterinių bioplėvelių formavimusi ant žmogaus audinių, prevencija ir gydymu, taip pat streptokokų atsparumo antibiotikams prevencija, panaudojant priešprasminį oligonukleotidą ir farmacines kompozicijas jo pagrindu.

Išradimo pagrindas

Vienas iš žmogaus infekcijų šaltinių yra normaliąją žmogaus mikroflorą sudarantys streptokokai. Tarp jų išskirtinos rūšys yra *S. mutans* ir *S. sobrinus*, įprastai randami žmogaus burnoje. Šių rūšių streptokokai be kita ko geba suformuoti vandenyje netirpią bakterinę bioplėvelę ant burnos audinių paviršiaus. Šių bakterijų formuojamos biologinės plėvelės struktūrinį karkasą sudaro netirpus polimeras – gliukanas, kurį iš sacharozės sintezuoja kelių tipų gliukoziltransferazės (Gtf) izofermentai, t. y. *S. mutans* GtfB ir GtfC bei *S. sobrinus* GtfI (Bowen ir Koo. *Biology of Streptococcus mutans-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms*. Caries Res. 45 (2011), p. 69-86). Gliukoziltransferazės lokalizuojasi ne tik ant bakterijų sienelės, bet ir yra išskiriamos į aplinką laisvoje formoje. Dėl šių fermentų veiklos *S. mutans*, *S. sobrinus* ir kitos burnos bakterijos gali tvirtintis praktiškai prie bet kokių paviršių, tarp jų žmogaus audinių, nes susidarantis gliukanas savo fizinėmis savybėmis yra labai lipni medžiaga. Todėl Gtf fermentai tapę svarbiu taikiniu kuriant įvairias farmakologiškai aktyvias medžiagas, slopinančias *S. mutans* bei *S. sobrinus* bakterijų adheziją.

Dėl kasdienių burnos audinių pažeidimų, kitų patologinių būsenų, taip pat atliekant medicininės intervencijas burnoje, sukeliančias reikšmingą bakteriemiją, *S. mutans* bei *S. sobrinus* patenka į žmogaus kraują ir kardiovaskulinę sistemą (Nakano ir kt. *Streptococcus mutans and cardiovascular diseases*. J. Dent. Sci. Rev. 44 (2008), p. 29-37).

Burnos streptokokai yra susiję su burnos, nosiaryklės, odos, kardiovaskulinės sistemos ir kitomis žmogaus bakterinėmis infekcijomis.

S. mutans ir *S. sobrinus* infektiškumas susijęs su šių bakterijų išskiriamų gliukoziltransferazių veikla – gliukano sinteze. Tyrimais nustatyta, kad *S. mutans*

padermės, turinčios defektus *gtfB* ir *gtfC* genuose, pasižymi ryškiai mažesnėmis savybėmis sukelti trombocitų agregaciją kraujyje palyginus su normaliomis („laukinėmis“) *S. mutans* bakterijomis (Taniguchi ir kt. *Defect of glucosyltransferases reduces platelet aggregation activity of Streptococcus mutans: Analysis of clinical strains isolated from oral cavities*. Arch. Oral Biol. 55 (2010), p. 410-416). Taigi streptokokų gliukoziltransferazių raiškos slopinimas praktiškai infekcijų prevencijai, tarp jų dantų ėduonies, širdies bei kraujagyslių ligų prevencijai.

Be to, bakterinės bioplėvelės yra susijusios su atsparumu įprastiems antibiotikams. Didesnis bakterinės bioplėvelės kiekis koreliuoja su atsparumo antibiotikams didėjimu, todėl bakterinių bioplėvelių sintezės inhibicija didina bakterijų jautrumą antibiotikams.

Čia aprašytas patentuojamas išradimas pateikia būdą kaip užslopinti ir/arba sumažinti *S. mutans* ir *S. sobrinus* bakterinės plėvelės formavimąsi. Šis metodas remiasi priešprasminių oligonukleotidų (PO), selektyviai slopinančių *S. mutans gtfB* ir *gtfC* bei *S. sobrinus gtfI* genų raišką, panaudojimu. Taip slopinant gliukoziltransferazių ir tolimesnėje pasekoje gliukano sintezę. Gliukano sintezės inhibicija užkerta kelią bakterinės bioplėvelės susidarymui, kurie savo ruožtu sąlygoja *S. mutans* ir *S. sobrinus* sukeltų infekcijų, profilaktiką bei prevenciją, taip pat didina šių bakterijų jautrumą antibiotikams.

Apibendrinant išdėstyta, patentuojamas PO ir būdas kompleksiskai sprendžia streptokokų infekcijų profilaktikos, prevencijos ir atsparumo antibiotikams problemas.

Išradimo esmė

Kaip aptarta aukščiau, yra aktualus poreikis spręsti streptokokų infekcijų profilaktikos, prevencijos ir gydymo problemas, kurias sukelia bakterijos patekusios į kraujotakos sistemą ir kitus objektus, kurie kontaktuoja su gyvais audiniais. Šis išradimas apima medžiagas ir būdą, kurie sprendžia šias problemas.

Pagrindinis patentuojamas išradimo objektas yra medžiaga – izoliuotas priešprasminis oligonukleotidas (PO), atitinkantis šiuos požymius:

- a) PO sudarytas iš nukleotidų sekų pagal SEQ ID nr. 1;
- b) PO sudaryti iš nukleotidų sekų, kurie yra SEQ ID nr. 1 fragmentas.

Taip pat išradimo objektas yra PO, bet kuria iš aukščiau nurodytų formų, panaudojami atsparumo antibiotikams prevencijai.

Taip pat išradimo objektas yra PO, kurių nukleotidų sekos skiriasi nuo SEQ ID nurodytos SEQ ID nr. 1 vienu, dviem, trimis arba keturiais nukleotidais.

PO, bet kuria iš aukščiau nurodytų formų, gali būti konjuguoti su peptidu palengvinančiu prasiskverbimą per bakterijos ląstelės sienelę.

Taip pat išradimo objektas yra biofarmacinė kompozicija, kurią sudaro PO, bet kuria iš aukščiau nurodytų formų, ir kitos dalys, skirta biofarmaciniam ir medicininiam panaudojimui.

Taip pat išradimo objektas yra biofarmacinė kompozicija, kurią sudaro PO, bet kuria iš aukščiau nurodytų formų, ir kitos dalys, tarp jų biofarmacijoje naudojami adjuvantai ir/ar nešėjai.

Taip pat išradimo objektas yra biofarmacinė kompozicija, kurią sudaro PO, bet kuria iš aukščiau nurodytų formų, ir kitos dalys, kurioje naudojamas nešėjas yra katijoninis polimeras.

Taip pat išradimo objektas yra biofarmacinė kompozicija, kurią sudaro PO, bet kuria iš aukščiau nurodytų formų, ir kitos dalys, skirta aplinkos ir įvairių butinių paviršių apdorojimui, siekiant antibakterinio poveikio nukreipto į *S. mutans* ir *S. sobrinus* ant tokių paviršių.

Taip pat išradimo objektas yra biofarmacinė kompozicija, kurią sudaro PO, bet kuria iš aukščiau nurodytų formų, ir kitos dalys, skirta aplinkos ir įvairių butinių paviršių apdorojimui, siekiant sumažinti bakterinių bioplėvelų atsiradimą ir augimą.

Taip pat išradimo objektas yra biofarmacinė kompozicija, kurią sudaro PO, bet kuria iš aukščiau nurodytų formų, ir kitos dalys, skirta aplinkos ir įvairių butinių paviršių apdorojimui, siekiant padidinti *S. mutans* ir *S. sobrinus* bakterijų jautrumą antibiotikams.

Galiausiai išradimas apima *S. mutans* ir *S. sobrinus* bakterijų kolonijų kontrolės būdą, kuris apima šių bakterijų gebėjimo sintetinti bioplėvelių karkasą sudarančių egzopolisacharidų slopinimą, panaudojant PO, specifiškai ir vienu metu slopinančio *gtfB* ir *gtfC* iRNR raišką *S. mutans* bakterijoje ir *gtfI* iRNR raišką *S. sobrinus* bakterijoje, administravimą, taip vienu metu slopinant šių bakterijų gebėjimą sintezuoti vandenyje

netirpių gliukanų ir dalinai vandenyje tirpių gliukanų polimerus.

Iliustracijų aprašymai

Priedas 1. PO sekų sąrašas ir aprašymas.

Fig. 1. Maišytos *S. mutans* ir *S. sobrinus* kultūrų bioplėvelės profilometrijos kiekybiniai duomenys po 24 val. inkubacijos periodo Todd Hewitt mitybinėje terpėje su tiriamos sekos PO ir kontrole.

Fig. 1A – streptokokų bioplėvelės paviršiaus šiurkštumas (Rq).

Fig. 1B – streptokokų bioplėvelės storis. * $p < 0,05$ palyginus su nepaveiktomis bakterijomis; ** $p < 0,05$ palyginus su kontrole (išmaišytos sekos PO).

Duomenys ($n = 5-6$) yra vidurkiai $\pm$ vidurkio standartinė paklaida.

SPSS programos (versija 20.0) One-Way Anova, LSD Post-Hoc testas.

Fig. 2. Maišytos *S. mutans* ir *S. sobrinus* kultūrų bioplėvelės profilometrijos kiekybiniai duomenys po 24 val. inkubacijos periodo Todd Hewitt mitybinėje terpėje, turinčioje seilių (1:10), su tiriamu PO.

Fig. 2A – streptokokų bioplėvelės paviršiaus šiurkštumas (Rq).

Fig. 2B – streptokokų bioplėvelės storis. * $p < 0,05$ palyginus su nepaveiktomis bakterijomis; ** $p < 0,05$ palyginus su kontrole (išmaišytos sekos PO).

Duomenys ($n = 5-6$) yra vidurkiai $\pm$ vidurkio standartinė paklaida.

SPSS programos (versija 20.0) One-Way Anova, LSD Post-Hoc testas.

Fig. 3. Maišytos *S. mutans* ir *S. sobrinus* kultūrų bioplėvelės profilometrijos kiekybiniai duomenys po 24 val. inkubacijos periodo Todd Hewitt mitybinėje terpėje, turinčioje 10% kraujo serumo, su tiriamos sekos PO.

Fig. 3A – streptokokų bioplėvelės paviršiaus šiurkštumas (Rq).

Fig. 3B – streptokokų bioplėvelės storis. * $p < 0,05$ palyginus su nepaveiktomis bakterijomis; ** $p < 0,05$ palyginus su kontrole (išmaišytos sekos PO).

Duomenys ($n = 5-6$) yra vidurkiai $\pm$ vidurkio standartinė paklaida.

SPSS programos (versija 20.0) One-Way Anova, LSD Post-Hoc testas.

Sąvokų apibrėžimai

Šiame dokumente naudojama sąvoka *“priešprasminis poveikis”* reiškia oligonukleotido poveikį, kuris susidaro po to, kai sudaromas junginys su papildoma seka, esančia iRNR, lemiantis specifinį geno raiškos ir baltymo translacijos slopinimą.

Šiame dokumente naudojama sąvoka *priešprasminiai oligonukleotidai (PO)* reiškia preparatus, kurie yra chemiškai modifikuotos arba nemodifikuotos viengubos nukleorūgšties molekulės (paprastai 15-30 nt ilgio), galinčios selektyviai jungtis su savo taikiniu iRNR sekoje pagal Watson-Crick susiporavimo principą. PO-iRNR heterodupleksų formavimasis sąlygoja šiuos efektus:

- 1) aktyvuojama RNazė H endonukleazė arba bakterijų endoribonukleazės – RNazė III ir RNazė E – lemiančios iRNR degradaciją, tačiau paliekant PO nepažeistą;
- 2) sąlygojama translacijos inhibiciją per ribosomų veiklos sterinį blokavimą;
- 3) slopinamas iRNR susijungimas;
- 4) destabilizuojamas iRNR pirmtakas.

Kuris efektas pasireišk, priklauso nuo PO cheminės struktūros ir hibridizacijos vietos, tačiau vélesni rezultatai yra konkretaus geno-taikinio raiškos ir baltymų translacijos derereguliacija.

“Nukleotidų seka”, “nukleorūgštis”, „nukleorūgšties grandinė“ ir *„nukleorūgšties seka“* reiškia, kad bet kas, kas jungiasi arba hibridizuojasi per bazių susijungimą įskaitant oligomerus arba polimerus, turinčius pagrindą, suformuotą iš natūraliai atsirandančių nukleotidų, tokių kaip DNR (dezoksiribonukleino rūgštis) arba RNR (ribonukleorūgštis) ir/arba nukleorūgšties analogai, susidedantys iš nestandartinių nukleobazių ir/arba nestandartinių karkasų, pavyzdžiui, peptidinė nukleorūgštis (PNR) arba užrakinta nukleorūgštis (UNR), arba be kokia išvestinė arba modifikuota nukleorūgšties forma, tame tarpe ir pakeitimai siekiant padidinti stabilumą ir atsparumą nukleazėms.

Šiame dokumente naudojama sąvoka *“peptidinė nukleorūgštis”* arba *„PNR“* reiškia sintetinį oligomerą arba polimerą, turintį poliamido pagrindą su prisijungusiomis

nukleobazėmis (atsirandančiomis natūraliai arba modifikuojamomis), įskaitant, bet neapsiribojant, bet kokie oligomerų ar polimerų segmentai nurodyti ar įvardinti kaip peptidinės nukleorūgštys JAV Pat. Nr. 5539082, 5527675, 5623049, 5714331, 5718262, 5736336, 5773571, 5766855, 5786461, 5837459, 5891625, 5972610, 5986053, 6107470 6201103, 6228982 ir 6357163, WO96/04000, kurie visi yra įtraukti kaip nuorodos arba yra naudojami kaip nuorodos kituose cituotuose dokumentuose. Prisijungusi nukleobazė, pavyzdžiui, purino ar pirimidino bazė PNR gali būti prijungta prie karkaso naudojantis viena iš jungčių apibūdintų PCT/US02/30573 ar bet kurioje kitoje nuorodoje, esančioje šiame dokumente. Jame PNR turi N-(2-aminoetilo)-glicino pagrindą. PNR gali būti susintetinta (ir vizualiai paženklinta) kaip minima PCT/US02/30573 arba jame cituotose nuorodose. PNR stipriai jungiasi ir tai atlieka specifinio eiliškumo tvarka, su DNR ir RNR, nes PNR karkasas neturi krūvio. Taigi, trumpi PNR zondai gali demonstruoti panašią specifiką su ilgesniais DNR ir RNR zondais. PNR zondai taip pat gali rodyti didesnę detalumą prisijungiant prie papildomos DNR ar RNR.

Šiame dokumente naudojama sąvoka „užrakinta nukleorūgštis“ arba „UNR“ reiškia oligomerą arba polimerą, sudarytą bent iš vieno ar kelių UNR subvienetų.

Šiame dokumente naudojama sąvoka „UNR subvienetas“ reiškia ribonukleotidą, kuriame yra metileno tiltas, jungiantis 2'-deguonies ribozę su 4'-anglimi (žr. Kurreck *Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications*. (Eur J Biochem 270 (2003). 1628-1644 p.)).

Nukleino rūgščių ir nukleino rūgščių analogų pavyzdžiai, naudojami kaip izoliuotas PO, taip pat apima oligomerų ir nukleotidų monomerų polimerus, tarp jų dvigubi ir viengubi deoksiribonukleotidai (DNR), ribonukleotidai (RNR) tarp jų natūraliai susiformuojančios priešprasminės RNR molekulės, tokios kaip mikroRNR (miRNR) ir mažos trukdančios (interferuojančios) RNR (siRNR), randamos eukariotinėse ląstelėse, taip pat mažos priešprasminės RNR, randamos prokariotinėse ląstelėse (bakterijose), anomerinės jų formos, natūralūs ir sintetiniai analogai ir kita. Nukleorūgšties grandinė gali būti sudaryta vien tik iš deoksiribonukleotidų, ribonukleotidų, peptidinių nukleorūgščių (PNR), užrakintų nukleorūgščių (UNR), natūralių ar sintetinių analogų, tokių kaip fosfordiamidato morfolino ir tiofosforoamidato oligonukleotidai, ar jų mišiniai. DNR, RNR ir kitos natūralios ar šiame dokumente apibūdintos sintetinės nukleorūgštys gali būti naudojamos metoduose ir

išradimo kompozicijose.

Naudojant terminą „*farmaciškai tinkamas*“, pavyzdžiui, percituojant „*farmaciškai tinkamas nešėjas*“ arba „*farmaciškai tinkamas priedas*“ šiame dokumente norima pasakyti, kad medžiaga, kuri nėra biologiškai ar kaip nors kitaip nepageidaujama, t.y. medžiaga gali būti inkorporuota į farmacines kompozicijas, skiriamas pacientui, nesukeliant nepageidaujamų biologinių poveikių ar reaguojant į kitus komponentus, esančius kartu sudėtyje nesielgia žalingai. Be to, priedai ir nešėjai, esantys minimose sudėtyse, yra tinkami taikyti žmogaus audinių aplinkoje ir/ar kraujo terpėje nesukeliant jokio nepageidaujamo biologinio poveikio bei niekaip žalingai nereaguojant. Šiame dokumente yra pateikti tinkamų nešėjų ir priedų pavyzdžiai, kurių tarpe yra vanduo be nukleazijų ar bet koks kitas reagentas, kurio pagalba yra suformuojamas kompaktiškas, stabilus, teigiamai įkrautas kompleksas su oligonukleotidu, skirtas saugoti nuo degradacijos ir padėti oligonukleotidui lengviau įsiskverbti į bakterijų ląsteles, pavyzdžiui, komerciškai prieinamas TurboFect™ transfekcijos reagentas ir katijoninis polimeras (Thermo Fisher Scientific, Fermentas).

Šiame dokumente vartojama sąvoka „*nukleazijų neturintis vanduo*“ reiškia sterilų dejonizuotą vandenį, kuriame nėra jokio tipo nukleazijų, galinčių skaidyti oligonukleotidus.

Šiame dokumente vartojamas terminas „*bioplėvelė*“ reiškia bioplėvelę, sudarytą iš polisacharidų matricos, kurią sudaro daugiausia vandenyje netirpūs ir dalinai tirpūs gliukanai ir bakterijos, galinčios iš gliukozės monomerų sintezuoti polisacharidinius polimerus, sudarančius egzopolisacharidinę matricą.

Išsamus išradimo aprašymas

Išradimas parodo naują būdą, skirtą bioplėvelių, tokių kaip bioplėvelė, besiformuojanti iš burnos streptokokų, ypač *S. mutans* ir *S. sobrinus*, ir bioplėvelių junginių ant kietų paviršių, pavyzdžiui stiklo ir žmogaus audinių, formavimosi mažinimui, slopinimui ar kelio tam užkirtimui.

Šiam naujam būdui taikomas efektyvus priešprasminių oligonukleotidų (PO) poveikis, siekiant vienu metu nusitaikyti ir slopinti gliukoziltransferazės iRNR išraišką kelių rūšių streptokokuose, ypač *S. mutans* ir *S. sobrinus*, tokių kaip *gtfB* ir *gtfC* gliukoziltransferazės iRNR, esančias *S. mutans* ir *gtfI* iRNR *S. sobrinus*, lemiančių vandenyje netirpių ir iš dalies vandenyje tirpių gliukano polimerų gamybos ir bakterijų

ląstelių sukibimo slopinimą *S. mutans* ir *S. sobrinus* kultūrose taip lemiant bioplėvelių mažinimą, slopinimą arba kelio užkirtimą jų formavimuisi. Minėtos kultūros gali būti *in vitro* kultūros arba *in vivo* kultūros, pvz., ant kitų kietų paviršių kontaktuojančių su žmogaus audiniais ir krauju.

Išradime patentuojamų naujų PO sekų sąrašas ir aprašymas pateiktas 1 priede.

Minėti PO gali būti chemiškai sintetinami PNR formos nukleotidai, savo sekomis atitinkantys nukleotidų SEQ ID nr. 1 seką, priešprasminio efekto eksponavimui, kaip parodyta pavyzdyje, arba išradimo specifikacijoje nurodytas sąlygas atitinkantys PO fragmentai ar modifikacijos.

Gliukanų, sudarančių bioplėvelės egzopolisacharidinę matricą, matavimas gali būti atliktas kaip aprašyta pavyzdžiuose, kur rezultatai aiškiai parodo, kad bakterijų adhezija prie stiklo paviršiaus yra stipriai sumažinama su PO molekulėmis, kurių nukleotidų seka atitinka SEQ ID nr. 1.

Bioplėvelės formavimosi mažėjimas rodo gliukano polimerų sintezės mažėjimą, nes gliukanai yra būtini bioplėvelių formavimuisi, o gliukanų nebuvimas lemia bioplėvelės nesiformavimą.

Taikiniai minėtuose *S. mutans* ir *S. sobrinus* genuose bei atitinkamai iRNR yra konservatyvūs – koduojančios nukleotidų sekos šių bakterijų genuose yra nekintančios. Todėl PO panaudojimas sumažina bakterijų gebėjimą kitais būdais sintetinti vandenyje netirpius ir dalinai tirpius gliukanus, kad būtų galima sukurti bioplėvelės polimerinę matricą.

Pagal šį išradimą nauji PO, kurie pasiekia priešprasminį efektą, gali bet kokia kita šiame dokumente apibūdinta PO forma, ar jų fragmentai ar modifikacijos.

Trumpesnės sekos turi gali būti savarankiškai naudojamos nustatytiems bakterijų genomo taikiniams tarp *gtfB* ir *gtfC* *S. mutans*, taip pat *S. sobrinus gtfI* genų ir iRNR. Dėl termodinaminių savybių (tokių pačių kaip ir su PO SEQ ID nr. 1), šie trumpesni fragmentai atitinkamoje bakterijų genomo srityje gali formuoti heterodupleksus.

Gausus literatūroje pristatytų tyrimų, atliktų *in vitro* ir *in vivo* sąlygomis, skaičius demonstruoja, kad nuo 8 nt iki 30 nt ilgio nukleotidų sekų PO būdingas priešprasminis

poveikis. Net ir PO su vienu nesutampančiu nukleotidu taip pat būdingas stiprus priešprasminis poveikis (žr. Hamel ir kt. „*Inhibition of gene expression by anti-sense C-5 propyne oligonucleotides detected by a reporter enzyme*“ (Biochem J 339 (1999), 547-553 p.); Wagner ir kt. „*Potent and selective inhibition of gene expression by an antisense heptanucleotide*“ (Nat Biotechnol 14 (1996), 840-844 p.); Fakler ir kt. „*Short antisense oligonucleotide-mediated inhibition is strongly dependent on oligo length and concentration but almost independent of location of the target sequence*“ (J Biol Chem 269 (1994), 16187-16194 p.); Woolf ir kt. „*Specificity of antisense oligonucleotides in vivo*“ (Proc Natl Acad Sci USA 89 (1992), 7305-7309 p.)).

PO sintezė

Šiame išradime nurodytos naujos PO sekos gali būti sintetinės ir modifikuojamos įvairiais būdais aprašytais literatūroje.

PO nešėjai

Šiame dokumente minimi PO gali būti efektyviau transportuojami į *S. mutans* ir *S. sobrinus* bakterijas (t.y., įsiskverbti per bakterijų ląstelės sienelę) naudojant nešėjus. Nešėjas gali būti transfekcijos reagentai ir katijoniniai polimerai, kurie yra žinomi. Visų PO formų su nešėju ar transfekcijos reagentu, sudarytu iš katijoninio polimero, pavyzdžiui, TurboFect™ (Thermo Fisher Scientific) gali būti naudojama tam, kad padidinti bakterijų PO įsisavinimą ir efektyviai padidinti bioplėvelės formavimosi *S. mutans* ir *S. sobrinus* inhibiciją.

PNR formos PO SEQ ID nr. 1, naudojami bioplėvelės formavimosi slopinimui pademonstruoti ant kieto paviršiaus, parodant jų dėka pasiekiamą priešprasminį efektą.

Kiti nešėjai, naudojami įvairioms PO formoms, skirti PO įterpimui į eukariotines ir prokariotines ląsteles, gali būti įvairios cheminės medžiagos, galinčios sudaryti kompleksus su izoliuotais oligonukleotidais tam, kad apsaugoti juos nuo degradacijos ir pagerinti jų skvarbą į ląsteles. Šios medžiagos apima, bet neapsiriboja, kalcio druskos (pvz., kalcio fosfatas, kalcio chloridas), katijoniniai lipidai (pvz., N-(2,3dioleoiloksipropyl) N, N, N-trimetilamoniochloridas;

dioleoilfosfatidiletanolaminas; cholesterolis),

katijoniniai polimerai (pvz., dietilaminoetilo dekstranas, polietileniminas,

chitozanas, ciklodekstrinas, poliamidoamino dendrimera, polipropilenimino dendrimera), į ląsteles prasiskverbiantys peptidai (peptidai, paprastai turintys mažiau nei 30 amino rūgščių (pvz., penetratinas) ir skirtingų tipų nanodalelės (žr. D. Liu ir kt. „*Chemical Methods for DNA Delivery*“, Ed., E. C. Heiser, Volume 1 of Gene Delivery to Mammalian Cells (Methods Mol Biol 245 (2004), 3-23 p., Humana Press Inc., Totowa, NJ); Zhu ir Mahato „*Lipid and polymeric carrier-mediated nucleic acid delivery*“ (Expert Opin Drug Deliv 7 (2010), 1209-1226 p.); Bai ir kt. „*Antisense antibiotics: a brief review of novel target discovery and delivery*“ (Curr Drug Discov Technol 7 (2010), 76-85 p.); Yu ir kt. „*Targeted delivery systems for oligonucleotide therapeutics*“ (AAPS J 11 (2009), 195-203 p.); Aalinkel ir kt. „*Quantum rods as nanocarriers of gene therapy*“ (Drug Deliv 19 (2012), 220-231 p.). Visi šie transfekcijos reagentai, išskyrus kalcio fosfatą, kuris formuoja kalcio-fosfato-DNR nuosėdas, veikia panašiai – jie sudaro junginius su oligonukleotidais per elektrostatinę sąveiką tarp neigiamo krūvio oligonukleotidų molekulių ir teigiamo krūvio reagento molekulių. Kadangi tokie kompleksai išlaiko teigiamą krūvį, jie gali susijungti su neigiamo krūvio eukariotinių ląstelių plazminė membrana ar bakterijos ląstelės sienoje ir gali būti įsisavinti ląstelių.

Plačiausiai naudojama transfekcijos reagentai PO pristatymui į bakterines ląsteles yra katijoniniai polimerai ir į ląsteles įsiskverbiantys peptidai, kurie yra naudojami visiems šiame dokumente minimiems PO, skirtingoms šiame dokumente minimoms PO formoms ir modifikacijoms. Svarbu akcentuoti, kad į ląsteles prasiskverbiantys peptidai yra pajėgūs įsiskverbti į ląsteles ne tik elektrostatinės sąveikos dėka, bet ir formuojant trumpalaikes poras ląstelių plazminėje membranoje (žr. Guo ir kt. „*Treatment of Streptococcus mutans with antisense oligodeoxyribonucleotides to gtfB mRNA inhibits GtfB expression and function*“ (FEMS Microbiol Lett 264 (2006), 8-14 p.) efektyviam fosforotioatų formos PO pristatymas iki *S. mutans* bakterijų naudojant katijonų polimerą – So-Fast™ (Taiyangma).

Panaudojimas

Šis išradimas visomis savo išraiškomis suteikia priemones ir būdus bioplėvelės formavimosi ant audinių slopinimui be žymios įtakos *S. mutans* ir *S. sobrinus* bakterijų gyvybingumui. Išradime nurodytas būdas ir PO suteikia galimybę administruoti PO, atitinkančius SEQ nr. 1, į bakterinę kultūrą naudojant efektyvią koncentraciją tam, kad sumažinti *S. mutans* ir *S. sobrinus* adheziją, tarpusavio sukibimą ir bioplėvelės formavimąsi, bet be baktericidinio (bakterijas naikinančio)

poveikio, kaip tai aiškiai pademonstruota su maišytomis *S. mutans* ir *S. sobrinus* kultūrų, Fig. 1A ir 1B.

Išradimas leidžia naudoti PO, kurių seka yra SEQ ID nr. 1, arba šiame dokumente apibūdinto PO fragmentus, arba PO modifikacijas, pasiekiant priešprasminį efektą, bioplėvelių bei atsparumo antibiotikams prevencijai ir kontrolei, be reikšmingo poveikio žmogaus mikrobiomui.

Kaip matoma, (Fig. 1A ir 1B), efektyvi PO koncentracija sumažina *S. mutans* ir *S. sobrinus* adheziją, bakterijų sukibimą ir bioplėvelės formavimąsi be išreikšto bakteriostatinio ir baktericidinio poveikio. Fig.3A ir 3B specifiškai parodyta efektyvios PO koncentracijos poveikį terpėje su kraujo serumu, tokiu būdu parodant poveikį gyviems žmogaus audiniams artimoje sistemoje.

Visų šiame dokumente nurodytų poveikių atžvilgiu šis išradimas atskleidžia naują būdą kontroliuoti ir užkirsti kelią bioplėvelių židiniams, naudojant PO, kurių sekos yra SEQ ID nr. 1, arba jo fragmentus ar modifikacijas, ir taip pasiekiant priešprasminį poveikį *S. mutans* ir *S. sobrinus* gliukoziltransferazių atžvilgiu. Šis naujas būdas suteikia įrankį bioplėvelės formavimosi slopinimui ant įvairių kietų paviršių. Kadangi bioplėvelės yra kliūtis antibiotikams paveikti bioplėvelę sintetinančias bakterijas, atitinkamai šis išradimas užkerta kelią ir atsparumui antibiotikams, kadangi dėl mažesnės bioplėvelės didėja antibiotikų poveikis bakterijoms.

Išrastas naujas PO, kurio sekos SEQ ID nr. 1, arba visų šiame dokumente nurodytų PO fragmentai ar PO modifikacijos, gali būti naudojami kaip biofarmacinių kompozicijų (tirpalų, suspensijų ir pan.) dalys, gali būti įtraukti į biofarmacinių kompozicijų formules, suteikiant tiek vietinį, tiek sisteminį aktualų poveikį gyvam organizmui - žmogui, arba negyviems paviršiams kontaktuojantiems su gyvo organizmo audiniais ir krauju.

Šiame išradime atskleistas naujas PO, kurio SEQ ID nr. 1, arba jo fragmentai ar PO modifikacijos, geba susijungti su atitinkamomis *Streptococcus mutans* genomo dalimis koduojančiomis gliukoziltransferazę B ir gliukoziltransferazę C, ir šių gliukoziltransferazių iRNR vienu metu, taip pat su gliukoziltransferaze I iRNR *S. sobrinus* ir tokiu būdu slopinti gliukanų gamybą, sumažinant bioplėvelės formavimąsi, taip užkertant kelią bioplėvelės formavimuisi. Tikslas pasiekiamas veikiant šiame išradime apibrėžtą PO molekulėms, kurios slopina gliukanų gamybą *S. mutans* ir *S.*

sobrinus, vienu metu taikantis į abiejų rūšių bakterijų gliukanų sintezės mechanizmus, su vieno tipo PO molekule.

Be to, šiame išradime atskleisti nauji PO, kurių sekos SEQ ID nr. 1, arba visi šiame dokumente nurodytų PO fragmentai ar PO modifikacijos, užkerta kelią bakterijų adhezijai ir prikibimui prie kietų paviršių, tuo pačiu metu nesumažinant bakterijų gyvybingumo. Šis aspektas suteikia galimybę naudoti pateiktus PO kaip medžiagą kovai su infekcijomis, kuri reikšmingai nepaveikia žmogaus organizme esančios bakterijų ekosistemos - mikrobiomo.

Šio išradimo rezultate sukurto naujo PO, kurių sekos SEQ ID nr. 1, bei jo fragmentų ar modifikacijų, efektas *in vitro* atitiko *in silico* sumodeliuotą poveikį į *S.mutans* ir *S.sobrinus*. Minėtas PO slopina *S.mutans* ir *S.sobrinus* gebėjimą sintezuoti bioplėvelės formavimuisi reikalingus gliukanus. Ne bioplėvelėje esančios bakterijos yra lengviau atpažįstamos ir eliminuojamos natūraliu keliu žmogaus imuninės sistemos, taip pat yra labiau paveikios įprastoms antibiotikų koncentracijoms.

Atitinkamai, šis išradimas suteikia būdą ir priemones bioplėvelės slopinimui, mažinimui, taip pat užkerta kelią bioplėvelės židinių ant kietų paviršių *in vitro* ir *in vivo* atsiradimui bei atsparumo antibiotikams vystymuisi.

Technologija

Priešprasminė technologija suteikia keletą privalumų, lyginant su kitomis antibakterinėmis technologijomis, tarp jų pagrindiniai privalumai yra:

- 1) specifinis ir sinchroninis *gtf* iRNR *S. mutans* ir *S. sobrinus* slopinimas;
- 2) šiame išradime atskleistos PO sekos naudojimas analogiškiems taikiniams dviejų rūšių streptokokuose (*S. mutans* ir *S. sobrinus*);
- 3) išorinis panaudojimas siekiant *S. mutans* ir *S. sobrinus* bioplėvelių inhibicijai ant negyvų paviršių, tokių kaip aplinkos ir buitiniai paviršiai, siekiant sumažinti patogeninių bakterijų paplitimą aplinkoje.

Šiame išradime atskleistas PO panaudojimo būdas ir PO, kurio seka yra SEQ ID nr. 1, arba visi šiame dokumente nurodyto PO fragmentai ar PO modifikacijos slopina bioplėvelės formavimąsi ir tuo pačiu ligų ir patologijų, sukeltų bioplėvelės formavimosi, atsiradimą.

Šio išradimo PO vienu metu ir lygiagrečiai slopina gliukoziltransferazės iRNR ir *gtf* genų raišką *S. mutans* ir *S. sobrinus*.

Gliukoziltransferazės iRNR ir *gtf* genų raiškos inhibicijos efektas, taip pat vandenyje netirpių ir dalinai tirpių gliukanų sintezės slopinimo efektas ir atitinkamai bioplėvelės formavimosi slopinimo efektas pasiekiamas, panaudojant tokios sekos PO:

SEQ ID nr. 1 (5'- TTGGCAGACCATTGCTTAA -3'), kurios veikimo išdava yra vandenyje netirpių gliukanų gamybos ir rezultate bioplėvelės formavimosi slopinimas.

Taip pat analogiškas efektas kaip nurodyti aukščiau pasiekiamas veikiant PO sekos fragmentams ir modifikuotoms sekoms aprašytoms šiame patente.

PO, kurio seka yra SEQ ID nr. 1, yra optimizuota 20 nukleotidų molekulė, atsižvelgiant į termodinamines savybes reikalingas *S. mutans gtfB* ir *gtfC*, *S. sobrinus gtfI* iRNR slopinimui. Bet koks PO fragmentas, net ir trumpesnis nei 20 nt seka atitinkantis SEQ ID nr. 1, apimantis ar atitinkantis šiame dokumente apibrėžtus gliukoziltransferazių kodavimo regionus, turi priešprasminį poveikį ir patenka į šiuo išradimu apibrėžiamas (ir pareiškiamas patentavimui) PO formas, būdą ir priemones.

Šiame išradime nurodyti izoliuoti PO gali būti izoliuoti iš natūralaus ar gamtinio šaltinio per išsgrynintą restrikcijos reakciją, taip pat gaminami sintetiniais būdais, t.y., sintetinami chemiškai arba gaminamas rekombinantiniu būdu ar naudojant genų inžineriją, ar polimerizacijos ir amplifikacijos metodus, pvz., polimerazės grandininę reakciją (PGR) ir PGR amplifikaciją ar kurį nors kitą metodą. PO taip pat gali būti paruoštas atliekant žinomus veiksmus ar kitus metodus, aprašytus šiame dokumente atsižvelgiant į šį išradimą.

Šiame išradime nurodytais PO gali būti bet kokios molekulės, pagrįstos atitinkamomis nukleotidų sekomis, kurios jungiasi ar jungiasi naudojant bazinį nukleotidų suporavimą, įskaitant oligomerus arba polimerus, turinčius pagrindą, suformuotą iš natūraliai paplitusių nukleotidų ir/arba nukleino rūgščių analogų, sudarančių nestandartines nukleobazes ir/arba nestandartinius pagrindus, pvz., peptidinę nukleorūgštį (PNR) arba užrakinta nukleorūgštį (UNR), arba bet kokios išvestinės nukleorūgščių formas, kaip parodyta šiame dokumente. PO gali turėti dalinį, pvz., 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ar netgi 90% natūraliai paplitusių nukleotidų, o likusieji, t.y. 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 ar netgi 10% yra nukleorūgšties analogai, sudaryti iš nestandartinių nukleobazių ir/arba nestandartinių pagrindų, kaip nurodyta

Pavyzdžiai

Bioinformaciniai metodai ir rezultatai

S. mutans ir *S. sobrinus* štamai atrinkti tolesnei analizei BLAST algoritmu (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi):

S.mutans – UA159, LJ23, GS---5, NN2025, Asega, Leo, UA140, UA174, CH638, CH639, BV24, JP9-4, UA96, UA545, UA113, AF199, UA318, UA114, BZ15.
S.sobrinus – TCI-194, ATCC33478, ATCC27607, OMZ176, NIDR6715 bei gtf-I gene for glucosyltransferase, complete cds.

Analizė atlikta 2014 m. gruodžio mėn.

GtfB, GtfC, GtfI baltymus sudarančios aminorūgščių sekos buvo atrinktos ir daugybinė sekų palyginamoji analizė buvo atlikta naudojant MAFFT programos internetinį serverį, esantį Max-Planck Institute for Development Biology (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/mafft>, atlikta 2015 m. sausio mėn.).

Taikant tokį metodą, buvo nustatyta konservatyvi 26nt sritis GtfB, GtfC, GtfI baltymų aminorūgščių DNR seka: 5'-CCTTACCTTCATGATGATGGCGACAA-3' (SEQ ID nr. 5), kuri yra homologiška *S. mutans* ir *S.sobrinus* baltymuose.

Šios sekos iRNR pagal Rfold programos rezultatus (Consensus sritis pažymėta pilkai):

ACAACGACACUCCU **UAGCQUUCAGGATGAGUGGCGA** CAAUAUGAUUAAUAUGGA-
3' (SEQ ID nr. 3).

Atitinkamas koduojantis iRNR segmentas šiai sričiai turi šią 20 nukleotidų (nt) seką:

5'-UACCUUCAUGAUGAUGGCGA-3' (SEQ ID nr. 2).

Programų JalView; Srna; Soligo pagalba išanalizavus PO kandidatų termodinamiką ir kitus ypatumus heteroduplekso formavimosi metu, atlikta 2015 m. vasario mėn.) rezultatais, buvo parinkta 20 nt seka, komplementari aukščiau tekste nurodytai koduojančiai sričiai:

5'-UACCUUCAUGAUGAUGGCGA-3' koduojančios srities seka [SEQ ID nr.2]

||||||||||||||||

3'-TCGCCATCATCATGAAGGTA-5' komplementari seka [SEQ ID nr. 1]

Eksperimentiniame darbe, atliktame remiantis šiais bioinformaciniais rezultatais, buvo panaudotas žemiau nurodytos sekos oligonukleotidas:

5'-TCGCCATCATCATGAAGGTA-3' (SEQ ID nr. 1)

2 pavyzdys – Priešprasminių oligonukleotidų poveikis į bioplėvelės formavimąsi *S. mutans* kultūrose

Laboratoriniai metodai ir rezultatai

Tiriamas PO (5'-TCGCCATCATCATGAAGGTA-3' SEQ ID nr 1) sumažina streptokokų maišytos kultūros (*S. mutans* ir *S. sobrinus*) adheziją *in vitro* prie stikliukų paviršiaus jų maišytoje kultūroje, augančioje Todd Hewitt mitybinėje terpėje su 1% sacharoze.

Remiantis optinio profilometro Sensofar P Lu 2300 ir kompiuterinės programos Gwyddion (versija 2.27) apskaičiuotais duomenimis nustatyta, kad tiriamos sekos nukleorūgštis 39 % sumažina maišytos *S. mutans* ir *S. sobrinus* bioplėvelės paviršiaus šiurkštumą (parametras – Rq) palyginus su nepaveiktomis bakterijomis ($p < 0,05$) bei 27 % palyginus su išmaišytos sekos nukleorūgštimi (neigiama kontrolė: 5'-AACTCGTATGCTACAGCTAG-3') ($p < 0,05$) (fig.1A). Taip pat nustatyta, kad tiriamos

sekos nukleorūgštis 38 % sumažina maišytos *S. mutans* ir *S. sobrinus* bioplėvelės storį palyginus su nepaveiktomis bakterijomis ($p > 0,05$) bei 23 % palyginus su išmaišytos sekos nukleorūgštimi ($p > 0,05$) (fig. 1B).

Nustatyta, kad tiriamos priešprasminės sekos nukleorūgštis Todd Hewitt mitybinėje terpėje, turinčioje 1 % sacharozės ir seilių (1:10), 51 % sumažina maišytos *S. mutans* ir *S. sobrinus* bioplėvelės paviršiaus šiurkštumą (Rq) palyginus su nepaveiktomis bakterijomis ($p < 0,05$), bei 39 % palyginus su išmaišytos sekos nukleorūgštimi ($p < 0,05$) (fig. 2A). Taip pat nustatyta, kad tiriamos sekos nukleorūgštis 27 % sumažina maišytos *S. mutans* ir *S. sobrinus* bioplėvelės storį palyginus su nepaveiktomis bakterijomis ($p < 0,05$) bei 34 % palyginus su išmaišytos sekos nukleorūgštimi ($p < 0,05$) (fig. 2B).

Nustatyta, kad tiriamos priešprasminės sekos nukleorūgštis Todd Hewitt mitybinėje terpėje, turinčioje 1 % sacharozės ir 10 % kraujo serumo, 10 % sumažina maišytos *S. mutans* ir *S. sobrinus* bioplėvelės paviršiaus šiurkštumą (Rq) palyginus su nepaveiktomis bakterijomis ($p > 0,05$), bei 25 % palyginus su išmaišytos sekos nukleorūgštimi ($p < 0,05$) (fig. 3A). Taip pat nustatyta, kad tiriamos sekos nukleorūgštis 44 % sumažina maišytos *S. mutans* ir *S. sobrinus* bioplėvelės storį palyginus su nepaveiktomis bakterijomis ($p < 0,05$) bei 41 % palyginus su išmaišytos sekos nukleorūgštimi ($p < 0,05$) (fig. 3B).

Tyrimo metu gauti duomenys rodo, kad tiriamos priešprasminės sekos nukleorūgštis PO ženkliai sumažina streptokokų (*S. mutans*, *S. sobrinus*) adheziją prie stikliukų paviršiaus *in vitro* sistemoje, ir todėl – statistiškai reikšmingai sumažina streptokokų (*S. mutans*, *S. sobrinus*) bioplėvelės formavimąsi ir jos kiekius.

Nustatyta, kad tiriamas PO (5'- TCGCCATCATCATGAAGGTA-3' SEQ ID Nr 1) 27 % sumažina streptokokų (*S. mutans* ir *S. sobrinus*) agregaciją palyginus su nepaveiktomis bakterijomis bei 16 % palyginus su išmaišytos sekos nukleorūgštimi (neigiama kontrolė: 5'-AACTCGTATGCTACAGCTAG-3') Todd Hewitt mitybinėje terpėje su 1 % sacharoze.

Taip pat, įgyvendindama šio laikotarpio darbų planą UAB Bioseka nustatė, kad tiriamas PO (5'- TCGCCATCATCATGAAGGTA-3' SEQ ID Nr 1) 58 % sumažina streptokokų (*S. mutans* ir *S. sobrinus*) polisacharidinių polimerų susidarymą palyginus

su nepaveiktomis bakterijomis Todd Hewitt mitybinėje terpėje su 1 % sacharoze, o atlikus statistinius skaičiavimus su SPSS programos 20 versija nustatyta, kad šis sumažėjimas yra statistiškai reikšmingas ($p < 0,05$; One-Way Anova, LSD Post-Hoc testas). Be to, tiriamos optimizuotos priešprasminės sekos nukleorūgštis 53 % sumažina *S. mutans* ir *S. sobrinus* polisacharidinių polimerų susidarymą lyginant su išmaišytos sekos nukleorūgštimi (neigiama kontrolė: 5'-AACTCGTATGCTACAGCTAG-3') Todd Hewitt mitybinėje terpėje su 1 % sacharoze, o atlikus statistinius skaičiavimus su SPSS programos 20 versija nustatyta, kad šis sumažėjimas yra statistiškai reikšmingas ($p < 0,05$; One-Way Anova, LSD Post-Hoc testas).

Tyrimu metu gauti rezultatai rodo, kad tirtas PO (5'-TCGCCATCATCATGAAGGTA-3' SEQ ID nr. 1) ženkliai sumažina streptokokų (*S. mutans* ir *S. sobrinus*) agregaciją, o taip pat statistiškai reikšmingai sumažina streptokokų (*S. mutans* ir *S. sobrinus*) gaminamų polisacharidinių polimerų koncentraciją *in vitro* bakterinėje sistemoje.

PO sekų sąrašas ir aprašymas

Seka Nr. 1

(SEQ ID nr.1): 5'- TCGCCATCATCATGAAGGTA -3'

Ilgis: 20 nukleotidų (nt)

Cheminė struktūra: deoksiribonukleorūgštis (DNR)

Kilmė: dirbtinai susintetinta izoliuota priešprasminė nukleotidų seka

Funkcija: ši seka pagal komplementarumo principą jungiasi su atitinkama sritimi *S. mutans* *gtfB* ir *gtfC* iRNR bei *S. sobrinus* *gtfI* iRNR, sukeldama priešprasminį efektą. Esamuose eksperimentuose tai yra testuojama seka.

Seka Nr. 2

(SEQ ID nr.2):

5'-

ACAACGACACUCCUUACCUUCAUGAUGAUGGCGACAAUAUGAUUAAUAUGGA -
3'

Ilgis: 52 nt

Cheminė struktūra: RNR

Kilmė: natūrali seka, esanti *S. mutans gtfB* ir *S. mutans gtfB*

iRNR

Funkcija: koduoja *S. mutans gtfB* ir *S. mutans gtfB*. Prie šios sekos atitinkamos srities gali jungtis priešprasminiai oligonukleotidai, turintys seką Nr. 1, sukeldami priešprasminį efektą.

Seka Nr. 3

(SEQ ID nr. 3): 5'-UACCUUCAUGAUGAUGGCGA-3'

Ilgis: 20 nt

Cheminė struktūra: iRNR

Kilmė: natūrali seka, esanti esanti *S. mutans gtfB* ir *S. sobrinus gtfB*

iRNR

Funkcija: pasirinkta DNR taikinio seka. Prie šios sekos atitinkamos srities gali jungtis priešprasminiai oligonukleotidai, turintys seką Nr. 1, sukeldami priešprasminį efektą.

Seka Nr. 4

(SEQ ID nr. 4): 5'- AACTCGTATGCTACAGCTAG -3'

Ilgis: 20 nt

Cheminė struktūra: DNR

Kilmė: dirbtinai susintetinta izoliuota priešprasminė nukleotidų

seka

Funkcija: naudota kaip kontrolinė seka laboratoriniuose tyrimuose.

Seka Nr. 5

(SEQ ID nr. 5): 5'- CCTTACCTTCATGATGATGGCGACAA -3'

Ilgis: 26 nt

Cheminė struktūra: DNR

Kilmė: natūrali seka, esanti *S. mutans gtfB* ir *S. sobrinus gtfI*

DNR

Funkcija: koduoja *S. mutans gtfB* ir *S. sobrinus gtfI*.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Priešprasminis oligonukleotidas (PO) streptokokų bioplėvėlių ir atsparumo antibiotikams prevencijai, atitinkantis šiuos požymius:

- a) PO sudarytas iš nukleotidų sekos pagal SEQ ID nr. 1;
- b) PO sudarytas iš sekos SEQ ID nr. 1 fragmentų.

2. PO pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad nukleotidų sekos skiriasi nuo nurodytos SEQ ID nr. 1, vienu, dviem, trimis arba keturiais nukleotidais.

3. PO pagal bet kurį iš 1-2 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad PO gali konjuguoti su peptidu prasiskverbiančiu per ląstelės membraną.

4. Biofarmacinė kompozicija, kurios sudedamoji dalis yra PO pagal bet kurį iš 1-3 punktų, skirta biofarmaciniam ir medicininiam panaudojimui.

5. Biofarmacinė kompozicija, kurią sudaro PO pagal bet kurį iš 1-4 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad į ją įeina ir kitos dalys, tarp jų biofarmacijoje naudojami adjuvantai ir (arba) nešėjai.

6. Biofarmacinė kompozicija pagal 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad joje naudojamas nešėjas yra katijoninis polimeras.

7. Biofarmacinė kompozicija, kurios sudedamoji dalis yra PO pagal bet kurį iš 1-6 punktų, skirta aplinkos ir įvairių buitinių paviršių apdorojimui, siekiant antibakterinio poveikio nukreipto į *S. mutans* ir *S. sobrinus* ant tokių paviršių.

8. Biofarmacinė kompozicija, kurios sudedamoji dalis yra PO pagal bet kurį iš 1-6 punktų, skirta aplinkos ir įvairių buitinių paviršių apdorojimui, siekiant sumažinti bakterinių bioplėvelų atsiradimą ir augimą.

9. Biofarmacinė kompozicija, kurios sudedamoji dalis yra PO pagal bet kurį iš 1-6 punktų, taip pat biofarmacijoje naudojami adjuvantai ir (arba) nešėjai, skirta padidinti *S. mutans* ir *S. sobrinus* bakterijų jautrumą antibiotikams.

10. *S. mutans* ir *S. sobrinus* bakterijų kolonijų kontrolės būdas, apimantis PO pagal bet kurį iš 1-6 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad specifiskai ir vienu metu slopina *gtfB* ir *gtfC* iRNR raišką *S. mutans* bakterijoje ir *gtfI* iRNR raišką *S. sobrinus* bakterijoje, taip pat vienu metu slopina šių bakterijų gebėjimą sintezuoti vandenyje netirpių gliukanų ir dalinai vandenyje tirpių gliukanų polimerus ir mažina šių bakterijų gebėjimą sintetinti bioplėvelių karkasą sudarančius egzopolisacharidus.

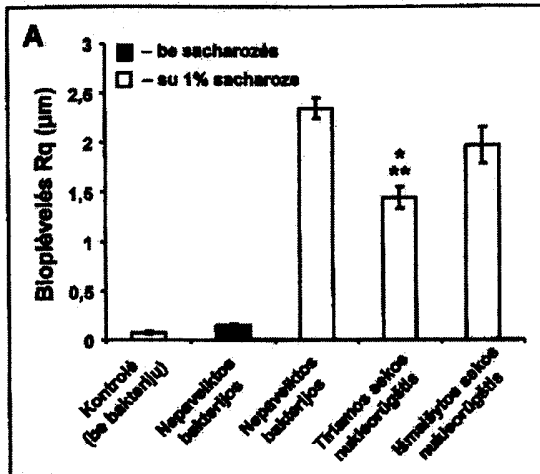


Fig. 1A

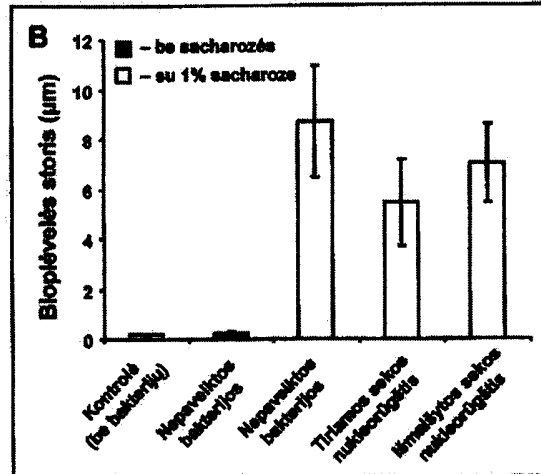


Fig.1B

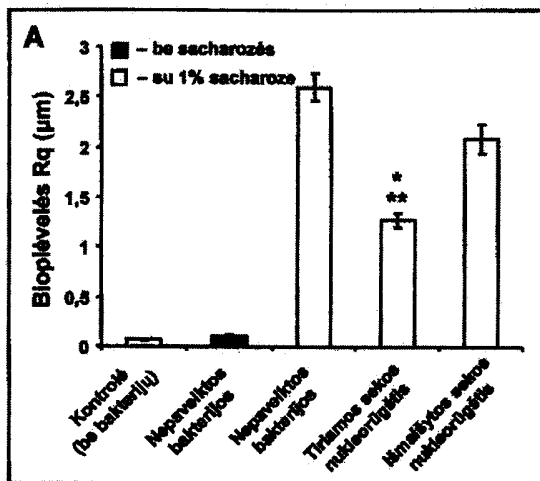


Fig.2A

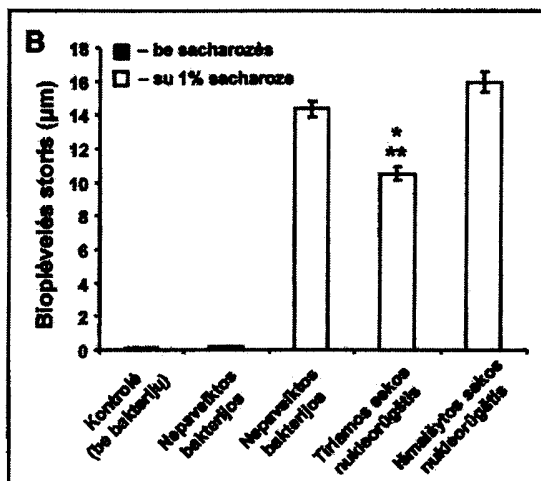


Fig. 2B

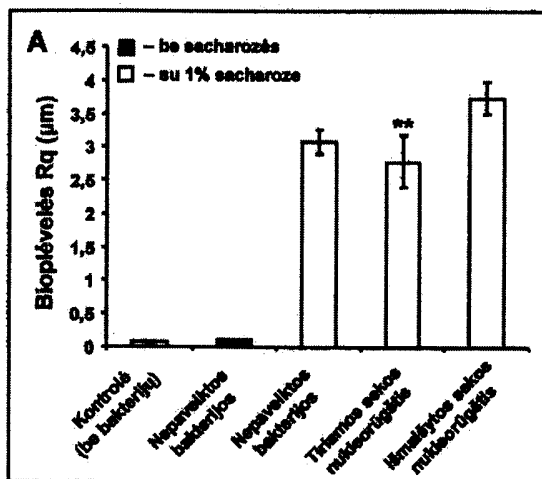


Fig.3A

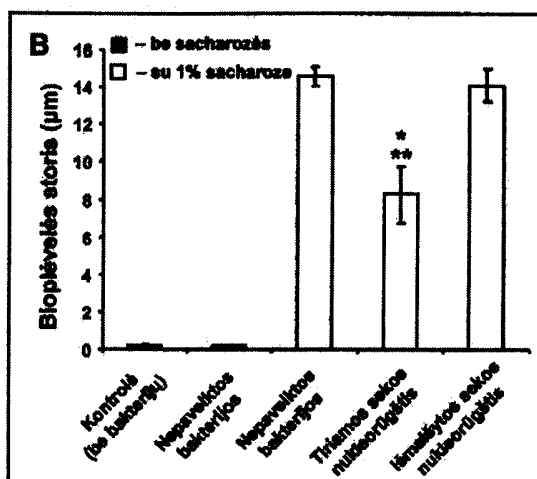


Fig. 3B