HU 0 0 0 0 2 2 5 2 4 4 B 1

(19) **HU**

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG
Magyar Szabadalmi Hivatal

(11) Lajstromszám: **225 244** (13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 98 00729**
(22) A bejelentés napja: **1996. 04. 19.**

(40) A közzététel napja: **1998. 07. 28.**
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlöny és Védjegyértesítőben: **2006. 08. 28.**

(51) Int. Cl.: ***A61K 48/00*** *(2006.01)*

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:
PCT/US 96/05334
(87) A nemzetközi közzétételi szám: **WO 9632966**

(30) Elsőbbségi adatok:
08/424,991 1995. 04. 19. US

(72) Feltalálók:
Zalewski, Andrew, Elkins Park, Pennsylvania (US);
Shi, Yi, Cheltenham, Pennsylvania (US)

(73) Jogosult:
Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania (US)

(74) Képviselő:
ifj. Szentpéteri Ádám, S. B. G. & K. Szabadalmi Ügyvivői Iroda, Budapest

(54) **Antiszensz oligonukleotidok alkalmazása vaszkuláris graft kezelésére, az ezt tartalmazó készítmények, és eljárás egy véna ex vivo graftként való alkalmazására**

(57) Kivonat

A találmány *c-myc*-re vagy *c-myb*-re specifikus antiszensz oligonukleotid alkalmazása vaszkuláris graft kezelésére szolgáló gyógyászati készítmény előállítására. A vaszkuláris graft prosztetikus fisztula, arteriovénás sönt, natív fisztula, vénás graft, immunszuppresszív allograft, immunszuppresszív xenograft vagy vénás autograft.

A találmány továbbá olyan készítményre is vonatkozik, amely egy izolált vaszkuláris graftot és a vaszkuláris graft legalább egy rétegében elhelyezkedő antiszensz oligonukleotidot tartalmaz, ahol az antiszensz oligonukleotid *c-myc*-re vagy *c-myb*-re specifikus.

Ezenfelül a találmány eljárás egy véna *ex vivo* graftként való alkalmazására.

HU 225 244 B1

A jelen találmány tárgyát oligonukleotidok, valamint ezek terápiás ágensként való alkalmazása, pontosabban oligonukleotid antiszensz és antigén vegyületek felhasználása képezi az extracelluláris mátrixfehérjék, főleg a fibroblasztokból és simaizomsejtekből származók szintézisének gátlására.

Az arteriovénás söntök és fisztulák hemodialízis-hozzáférési helyek a hemodialízisbetegek keringési rendszere számára. Sajnos az arteriovénás söntök és fisztulák idővel tönkremennek, ami komoly orvosi komplikációt jelent a világ több mint 300 000 hemodialízisbetege számára [Newman, G. E., in Vascular Disease: Surgical and Interventional Therapy, szerk.: E. Strandness (1994)]. A vizsgálat szerint az arteriovénás söntöknek és fisztuláknak 12–45%-a megy tönkre az első évben [Newman, G. E., in Vascular Disease: Surgical and Interventional Therapy, szerk.: E. Strandness (1994)]. A hozzáférési hely tönkremenetelének fő oka a progresszív vénás sztenózis [Sedberg és munkatársai: Circulation *80,* 1726–1736 (1989)]. A tönkrement vagy nem működő hemodialízis-hozzáférési helyeken orvosi beavatkozásra van szükség, vagy arra, hogy sebészeti úton helyettesítsük az arteriovénás söntöt, vagy transzkatéteres beavatkozásra (azaz ballonangioplasztikára vagy stentre) van szükség, hogy kitágítsuk a söntöt vagy a fisztulát elhagyó vénás eret [Newman, G. E., in Vascular Disease: Surgical and Interventional Therapy, szerk.: E. Strandness (1994)]. Ennek következtében az arteriovénás sönt- és fisztulakomplikációkban szenvedő betegek évente körülbelül 30 napot töltenek kórházban azzal a céllal, hogy fenntartsák hozzáférési helyeik nyitottságát.

Ezért van az, hogy a hemodialízis-hozzáférési helyeket tekintik a hemodialízisbetegek „Achilles-sarkának", még akkor is, ha egy arteriovénás söntre vagy fisztulára van szükség a kényelmes hemodialízishez. Az arteriovénás söntöket és fisztulákat általában Brescia–Cimino arteriovénás fisztulákként vagy politetrafluor-etilén (PTFE, Gor-Tex™) graftokként készítik el. A legtöbb esetben a vénát sebészetileg az artériához kapcsolják, vagy közvetlenül vagy közvetve, egy PTFE-grafton keresztül, az alsókaron, a vállon vagy a combon.

Az arteriovénás fisztulák tulajdonképpen az arteriovénás graftok egy olyan példáját képezik, amelyek idővel progresszíven veszélyeztetődnek. Más típusú graftok (azaz például vénás graftok), amelyek kezelést igénylő egészségi állapotokat okoznak, a következők lehetnek: aortokoronáriás bypassgraftok, karotid graftok, iliofemorális graftok és fermoropopliteális graftok. Ezekben a graftokban a véna egy részét az artériás rendszerbe helyezzük. Az összes arteriovénás típusú graftot vagy az artériás rendszerbe helyezett vénás graftot érintő egészségi problémák legnagyobb része az, hogy idővel csökken az ér belső átmérője. Ez általában a véna kilépésénél, vagy ott lép fel, ahol a graft a test részét képezi (a továbbiakban ezt nevezzük a graft „vénás részének"). Az a vélemény alakult ki, hogy ha a vénát magas artériás nyomásnak vetjük alá, akkor ez megváltoztatja a véna morfológiáját; nevezetesen, a graft vénás részének belső átmérője lecsökken. A graftok gyakran okoznak trombózist vagy más orvosi rendellenességet, azaz például fertőzést.

A jelen találmányt megelőzőleg az arteriovénás és vénás graftok kezelése csak korlátozott hatékonyságú volt, és invazív kezelést igényelt. Erőfeszítéseket tettek, hogy mechanikusan növeljék a graft belső átmérőjét a megvastagodott érfalak szekciójában, azaz például a működésképtelen hemodialízis-hozzáférési helyeken. Más módszerek egyszerűen a tönkrement graft helyének sebészeti revízióján alapulnak, ilyen például az arteriovénás sönt kicserélése. A korábbi kezeléseknek ezek a típusai jelentős orvosi figyelmet igényelnek, gyakran kórházi tartózkodásra van szükség, és néhány hemodialízis-hozzáférési hely esetében végül odavezetnek, hogy nem lehet megfelelő hemodialízis-hozzáférési helyet találni, amint azt az alábbiakban tárgyaljuk.

Számos vizsgálatban a tönkrement graftok, azaz az arteriovénás graftok és vénás graftok (azaz például az aortokoronáriás bypassok) vénáinak morfológiájára koncentráltak, és ezek a vizsgálatok információt szolgáltattak ezeknek a rendellenességeknek a patomechanizmusáról. A vékony falú vénák korán reagálnak az artériás véráramlással és vérnyomással való érintkezésre. A vénák elkezdenek neointimát kifejleszteni. A magas artériás nyomásra és áramlásra adott válasz végül az erek belső átmérőjének szűküléséhez vezet, ezzel a véna nyitottságát csökkenti. A vaszkuláris simaizomsejtek elsősorban a közegben és a neointimában találhatók meg. A fibroblasztok az adventiciában és a perivaszkuláris szövetben találhatók meg. A sérülésre adott válaszként mind a simaizomsejtek, mind a fibroblasztok fokozzák a mátrixfehérje szintézisét az érfalban és a perivaszkuláris szövetben. Ennek következtében az ér beszűkül és megmerevedik, az érfal megvastagodása és a perivaszkuláris szövetben levő forradás miatt, ami a graftok visszafordíthatatlan romlását eredményezi, mint az arteriovénás fisztulák vagy vénás graftok esetében.

Az extracelluláris mátrixfehérjék nem megfelelő szintézise és/vagy ezen fehérjék aberráns formáinak a szintézise számos különböző káros állapottal áll kapcsolatban, beleértve számos ritka, örökölhető betegséget, valamint több általános betegséget, azaz például az arteriovénás és vénás graftok nyitottságát [Sedberg és munkatársai: Circulation *80,* 1726–1736 (1989)], a fibrotikus bőrbetegséget, tüdőfibrózist, oszteoartritiszt, vaszkuláris resztenózist és hasonlókat [Weiss és Jayson, szerk.: Collagen in Health and Disease (Churchill Livingstone, Edinburgh, 1982); Gardner, szerk.: Pathological basis of the Connective Tissue Diseases (Lea & Febiger, Philadelphia, 1992)]. Az extracelluláris mátrix főleg kollagénből, proteoglikánokból, elasztinból és fibronektinből áll.

Ezek közül a körülmények közül számos áll kapcsolatban fizikai, kémiai és/vagy biológiai károsításokra adott nagyon komplex biológiai reakciókkal. Ilyen válasz lehet számos különböző sejttípus szaporodása és vándorlása, valamint egy növekedési faktor szintézise,

amely hozzájárul a válaszhoz, vagy módosítja azt. Például az érrendszeri rendellenességek, úgymint az ateroszklerózis és a vaszkuláris resztenózis, kapcsolatban áll a lokális sejtszaporodással és sejtvándorlással, valamint számos különböző csoportba tartozó szerkezeti fehérje és számos növekedési faktor termelődésével, mint amilyen például a vérlemezke-eredetű növekedési faktor (PDGF), bázikus növekedési faktor, tumornekrózis-faktor-α, interleukin–1, prosztaglandinok és számos különböző protoonkogén [Ross: Nature *362,* 801–809 (1993); Morisha és munkatársai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA *90,* 8474–8478 (1993)]. Sajnos ezeknek a faktoroknak nem ismert a pontos szerepe a különböző, kóros folyamatokban.

Az extracelluláris mátrixfehérjék nem megfelelő termelődéséhez kapcsolódó rendellenességek, úgymint a vaszkuláris rendellenességek, hatalmas gazdasági jelentősége komoly lendületet adott olyan gyógyszerek vagy más módszerek kifejlesztésének, amelyekkel ezeknek a rendellenességeknek a káros hatásait gyógyítani vagy enyhíteni lehet. A betegségeknek ebben, valamint más csoportjában, ahol a kóros állapot egy endogén gén nyilvánvalóan rendellenes expressziójával áll kapcsolatban, az úgynevezett antiszensz vegyületek alkalmazása számos előnnyel jár [Milligan és munkatársai: J. Med. Chem. *36,* 1923–1937 (1993); Uhlmann és Peymann: Chemical Reviews *90,* 543–584 (1990); Goodchild: Bioconjugate Chemistry *1,* 165–187 (1990); Crooke: Ann. Rev. Pharmacol, Toxicol. *23,* 329–376 (1992); Stein és munkatársai: Science *261,* 1004–1012 (1993); és más publikációk].

Az antiszensz megközelítési mód egy másik hatalmas előnye, hogy nem kell egy vagy több kiindulási szűrővizsgálati lépést elvégezni azzal a céllal, hogy azonosítsuk azokat a vegyületeket, amelyek képesek egy terápiás célponthoz kötődni. Ha egy gén aberráns expressziójáról ismert, hogy azt a betegséget okozza, ami ellen a gyógyszert keressük, akkor a várhatóan antiszensz tulajdonságú gyógyszerek szerkezetét automatikusan meg lehet határozni a rendellenesen expresszálódó gén nukleotidszekvenciájából. Csak arra van szükség, hogy meghatározzunk egy oligonukleotidot vagy annak egy analógját, amely képes stabil duplexet vagy triplexet képezni egy ilyen génnel, vagy a kapcsolódó célpont polioligonukleotiddal, a Watson–Crick- vagy Hoogsteen-kötődés alapján. Az nyilvánvaló, hogy a találmány nem korlátozódik egy bizonyos hatásmechanizmusra. Ezeknek a vegyületeknek lehet további, nem antiszensz, szekvenciaspecifikus hatásuk, ami más mechanizmuson alapul, azaz például anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, az aptamer hatásokon. A specifikusan megkötött antiszensz vegyület azután a célpontokat vagy érzékenyebbé teszi az enzimatikus lebontással, blokktranszlációval vagy processzálással szemben, vagy másképpen blokkolja vagy gátolja egy megcélzott polinukleotid működését.

Nagyon előnyös lenne, ha lehetne olyan géneket azonosítani, amelyeknek az expressziója kauzálisan kapcsolódik a kóros állapothoz kapcsolódó szerkezeti fehérjék, mint például a kollagén szintéziséhez. Egy ilyennek az azonosítása azonnal megadná a lehetőséget számos különböző, az ilyen fehérjék fölöslegben való szintézisével kapcsolatban álló rendellenesség elleni kezelések kidolgozására, az antiszensz megközelítés alapján.

A jelen találmány tárgya eljárás extracelluláris mátrixfehérjék, főleg a kollagén nem megfelelő szintézisével kapcsolatban álló rendellenességek kezelésére. Az eljárás során egy ilyen kezelésre szoruló betegnek hatékony mennyiséget adunk be egy vagy több, a sejtmag-protoonkogénekre specifikus antiszensz oligonukleotidból. Amint azt az alábbiakban részletesebben meghatározzuk, az „egy sejtmag-protoonkogénre specifikus antiszensz oligonukleotid" szakkifejezés jelentése egy olyan oligonukleotid, amelynek a szekvenciája (i) képes stabil duplexet képezni egy sejtmag-protoonkogén vagy sejtciklusgén mRNS-átiratának egy részével, vagy (ii) képes stabil triplexet képezni egy sejtmag-protoonkogén vagy sejtciklusgén egy részével. Még előnyösebb, ha a találmány szerinti oligonukleotidok specifikusak a *c-myc* protoonkogén mRNS-átirataira.

A *c-myc* antiszensz oligonukleotidokat előnyösen lokálisan adjuk be, azon a ponton, ahol az extracelluláris mátrixfehérje nem megfelelő szintézise lejátszódik.

A találmány tárgya eljárás hemodialízis-hozzáférési helyek és vaszkuláris graftok tönkremenetelének megakadályozására, oly módon, hogy a hemodialízis-hozzáférési helyet vagy a vaszkuláris graftot egy sejtmag-protoonkogén-mRNS-sel komplementer oligonukleotiddal hozzuk érintkezésbe, *ex vivo* vagy *in vivo,* egy emberben. A találmány tárgyát képezik emellett azok a készítmények, amelyek hemodialízis-hozzáférési helyeket, vaszkuláris graftokat vagy kivágott, humánkompatibilis vénákat tartalmaznak, a találmány szerinti oligonukleotidokkal, az ilyen struktúrák komponenseiben vagy szöveteiben.

A találmány tárgya továbbá eljárás sebhely kezelésére egy humán szövetben, terápiásan hatásos mennyiségű protoonkogén specifikus antiszensz oligonukleotidot adva be a szövetbe.

A találmány tárgya továbbá eljárás szálas kötőszövet képződésének megakadályozására emberekben, terápiásan hatásos mennyiségű protoonkogén antiszensz oligonukleotid beadásával.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a mellékelt ábrákat.

Az 1. ábrán egy arteriovénás graftot mutatunk be az arterializáció előtt és után, valamint a graft vénás része átjárhatóságának elvesztését.

A 2a. ábrán egy normális sertésvéna keresztmetszetét mutatjuk be, Verhoff festékkel festve (10-szeres nagyítás).

A 2b. ábrán egy arterializált sertésvéna keresztmetszete látható, Verhoff festékkel festve (5-szörös nagyítás) (fénykép).

A 3a. ábrán egy normális sertésvéna keresztmetszetét mutatjuk be, Sirrius vörös festékkel festve (5-szörös nagyítás) (fénykép).

A 3b. ábrán egy arterializált sertésvéna keresztmetszetét mutatjuk be, Sirrius vörös festékkel festve (5-szörös nagyítás) (fénykép).

A 4a. ábrán egy normális sertésvéna keresztmetszetét mutatjuk be, α-aktin elleni ellenanyaggal festve (5-szörös nagyítás) (fénykép).

A 4b. ábrán egy arteriális sertésvéna keresztmetszetét mutatjuk be, α-aktin elleni ellenanyaggal festve (5-szörös nagyítás) (fénykép).

A 4c. ábrán egy normális sertésvéna keresztmetszetét mutatjuk be, desmin elleni ellenanyaggal festve (5-szörös nagyítás) (fénykép).

Az 5a. ábrán egy arterializált sertésvéna keresztmetszete látható, szaporodó sejt sejtmag antigén (PCNA) elleni ellenanyaggal festve (25-szörös nagyítás) (fénykép).

Az 5b. ábrán egy arterializált sertésvéna keresztmetszete látható, Verhoff festékkel festve (25-szörös nagyítás) (fénykép).

Az 5c. ábrán egy arterializált sertésvéna keresztmetszete látható, Sirrius vörös festékkel festve (25-szörös nagyítás) (fénykép).

A 6a. ábrán egy aortokoronáriás graftból származó humán véna keresztmetszete látható, Verhoff festékkel festve (5-szörös nagyítás).

A 6b. ábrán egy aortokoronáriás graftból származó humán véna keresztmetszete látható, Sirrius vörös festékkel festve (5-szörös nagyítás).

A 6c. ábrán egy aortokoronáriás graftból származó humán véna keresztmetszete látható α-aktin elleni ellenanyaggal festve (5-szörös nagyítás).

A 6d. ábrán egy aortokoronáriás graftból származó humán véna keresztmetszete látható PCNA elleni ellenanyaggal festve (50-szeres nagyítás) (fénykép).

A 7a. ábrán egy PDG-vel (vérlemezke-eredetű növekedési faktor) kezelt és PCNA-val (szaporodó sejt sejtmag antigén) szemben készített ellenanyaggal festett, és hematoxilinnel, valamint eozinnal ellenfestett sertésvéna-szervtenyészet keresztmetszete látható (50-szeres nagyítás) (fénykép).

A 7b. ábrán egy PDG-vel (vérlemezke-eredetű növekedési faktor) nem kezelt és PCNA-val (szaporodó sejt sejtmag antigén) szemben készített ellenanyaggal festett, és hematoxilinnel, valamint eozinnal ellenfestett sertésvéna-szervtenyészet keresztmetszete látható (50-szeres nagyítás) (fénykép).

A 7c. ábrán PDG-vel (vérlemezke-eredetű növekedési faktor) és egy oligonukleotiddal (1. számú szekvencia) kezelt és PCNA-val (szaporodó sejt sejtmag antigén) szemben készített ellenanyaggal festett, és hematoxilinnel, valamint eozinnal ellenfestett arterializált sertésvéna keresztmetszete látható (50-szeres nagyítás) (fénykép).

A 8a. ábrán egy fluoreszceinnel végjelzett oligonukleotiddal (1. számú szekvencia) 2 másodpercre érintkezésbe hozott humán vénaszervtenyészet keresztmetszete látható (25-szörös nagyítás) (fénykép).

A 8b. ábrán egy fluoreszceinnel végjelzett oligonukleotiddal (1. számú szekvencia) 30 másodpercre érintkezésbe hozott humán vénaszervtenyészet keresztmetszete látható (25-szörös nagyítás) (fénykép).

A 8c. ábrán egy fluoreszceinnel végjelzett oligonukleotiddal (1. számú szekvencia) 1 órára érintkezésbe hozott humán vénaszervtenyészet keresztmetszete látható (25-szörös nagyítás) (fénykép).

A 8d. ábrán egy fluoreszceinnel végjelzett oligonukleotiddal (1. számú szekvencia) 2 órára érintkezésbe hozott humán vénaszervtenyészet keresztmetszete látható (25-szörös nagyítás) (fénykép).

A 9a. ábrán egy fluoreszceinnel végjelzett oligonukleotiddal (1. számú szekvencia) perivaszkulárisan 2 óra hosszat injekciózott sertésvéna-szervtenyészet keresztmetszete látható (50-szeres nagyítás) (fénykép).

A 9b. ábrán egy fluoreszceinnel végjelzett oligonukleotiddal (1. számú szekvencia) perkután 30 percig injekciózott sertésvéna-szervtenyészet keresztmetszete látható (50-szeres nagyítás) (fénykép).

A 9c. ábrán egy fluoreszceinnel és jelzett oligonukleotiddal (1. számú szekvencia) az injekciózás után 2 óra hosszat perkután kezelt sertésvéna-szervtenyészet keresztmetszete látható (50-szeres nagyítás) (fénykép).

A 10. ábrán egy példaként megadott kontroll (tehát olyan, amely értelmes szál oligonukleotid injekciót kapott) sertés-koronáriaartéria keresztmetszete látható, egy hónappal a sérülést követően.

A 11. ábrán egy példaként megadott, antiszensz kezelt sertés-koronáriaartéria fényképe látható.

A 12. ábrán a maximális neointimális terület látható a sérülés mértékének függvényében.

A 13. ábrán a c-myc mRNS transzlációs iniciációs régióját megcélzó antiszensz oligonukleotidoknak a prokollagén I, a prokollagén II, a prokollagén III és a fibronektin extracelluláris szintjére gyakorolt hatását mutatjuk be, összenövés utáni állapotban levő humán simaizomsejtekre. A prokollagén I-et és a prokollagén II-t a kondicionált közegekben Western-blottal határozzuk meg, míg a fibronektint immunprecipitációval mérjük.

A 14. ábrán a *c-myc* antiszensz oligonukleotidoknak az I-es típusú kollagénekre gyakorolt hatását mutatjuk be. A humán simaizomsej-

teket 24 óra hosszat különböző kontrolloligonukleotidokkal inkubáljuk (16 μmol/l), beleértve az értelmes szálú, 4 bázispárban eltérő, összezavart szekvenciájú oligonukleotidokat, valamint antiszensz oligonukleotidokkal (16 μmol/l), amelyek a *c-myc* mRNS különböző régióit célozzák meg. Az I-es típusú kollagén szintjeit a közegekben Western-blottal határozzuk meg, kondicionált pepszines emésztés után.

Felső panel: a blotok a kollagén α-láncait mutatják
1-es sáv: nincs oligonukleotid
2-es sáv: értelmes szálú oligonukleotid
3-as sáv: 4 bázispárban eltérő ODN („oligonukleotid"-ként hivatkozunk rá)
4-es sáv: összezavart szekvenciájú oligonukleotidok
5-ös sáv: a *c-myc* mRNS transzlációs iniciációs régióját megcélzó antiszensz (559–573-as pozíció, AS1)
6-os sáv: az 1-es exont célzó antiszensz (400–419-es pozíció, AS2), és
7-es sáv: a 3-as exonban levő transzlálódó régiót megcélzó antiszensz (1264–1283-as pozíció).
Alsó panel: a kontrollértékek (oligonukleotid nélkül) százalékos változásait bemutató hisztogramok, amiket 3 különböző kísérlet denzitometriás mérésével kapunk (átlag ±SEM).
Mis: 4 bázispárban eltérő oligonukleotidok;
Scr: összezavart szekvenciájú oligonukleotidok.

A 15. ábrán a *c-myc* fehérje antiszensz oligonukleotidokkal (AS1) való gátlását mutatjuk be. Az összenövés utáni állapotban levő simaizomsejteket antiszensz oligonukleotidokkal vagy anélkül inkubáljuk 24 óra hosszat. A p62 *c-myc*-et [^{35}S]-metioninnal jelzett sejtmagkivonattal végrehajtott immunprecipitációval határozzuk meg, és az SDS-poliakrilamid gél autoradiogramján mutatjuk be.

A 16. ábrán a simaizomsejtek metabolikus állapotát mutatjuk be az oligonukleotidok után. A sejteket oligonukleotidokkal vagy azok nélkül 4 óra hosszat előinkubáljuk, majd [^{35}S]-metioninnal jelezzük 16 óra hosszat. A radioaktív fehérjéket TCA-kicsapás után mérjük. Az antiszensz oligonukleotidok nem mutattak hatást a metionin fehérjékbe való beépülésére, ami a simaizomsejtek normális metabolikus aktivitására utal. Az adatok dpm/10^5 sejt dimenzióban vannak megadva (átlag ±SEM, 2 különböző kísérletből).

S: értelmes szál
MIS: rosszul illeszkedő szál
SCR: összezavart szekvenciájú szál
AS1: a *c-myc* mRNS transzlációs iniciációs régióját megcélzó antiszensz oligonukleotidok

A 17. ábrán az I-es típusú kollagén kinyerését mutatjuk be a *c-myc* antiszensz oligonukleotidok (AS1) eltávolítása után. A simaizomsejteket 24 óra hosszat inkubáljuk oligonukleotidokkal (16 μmol/l) vagy anélkül. Három mosás után oligonukleotidokat nem tartalmazó közeget adunk hozzájuk, majd 24 óra elteltével kinyerjük. Az I-es típusú kollagént pepszines emésztés után Western-blottal határozzuk meg. Az I-es típusú kollagén teljes kinyerése a *c-myc* antiszensz oligonukleotidok eltávolítása után észlelhető.

A 18. ábrán a *c-myc* antiszensz oligonukleotidoknak a pro α_1(I) és pro α_2(I) mRNS szintekre gyakorolt hatása látható. 24 óra hosszat oligonukleotidokkal (16 μmol/l) vagy anélkül inkubált simaizomsejtekből össz-RNS-t izolálunk, majd Northern-blottal elemezzük. Az antiszensz oligonukleotidoknak (AS1) nincs hatásuk a prokollagén α_1(I) és a prokollagén α_2(I) mRNS szintekre. Az antiszenszkezelés után 6 órával végzett kísérletek hasonló eredményt adnak. A 7S RNS nem mutatott változást.

A 19. ábrán az extracelluláris és intracelluláris [^{14}C]-prolinnal jelzett fehérjék láthatók. A humán simaizomsejteket oligonukleotidokkal vagy azok nélkül inkubáljuk 16 óra hosszat, majd [^{14}C]-prolinnal jelezzük további 4 óra hosszat szérummentes közegben. A radioaktív izotóppal jelzett fehérjék gátlása látható a kondicionált közegben, amit az intracelluláris prokollagén α_1(I) és prokollagén α_2(I) megnövekedett szintje követ, a *c-myc* antiszenszkezelést követően.

A 20. ábrán bemutatjuk az antiszensz oligonukleotiddal kezelt és kontroll humán simaizomsejtek hidroxi-prolin-tartalmát.

A 21. ábrán a *c-myc* antiszenszkezelés hatása látható az extracelluláris I-es típusú kollagén szintjére, humán bőrfibroblasztokban.

A 22. ábrán a *c-myc* antiszensz oligonukleotiddal kezelt és kontroll humán fibroblasztokkal kapcsolatban levő intracelluláris és extracelluláris prokollagén szint látható.

A 23. ábrán az intracelluláris prokollagén hőstabilitását mutatjuk be humán bőrfibroblasztokban. Az oligonukleotidokkal vagy azok nélkül kezelt sejtekből származó, pepszinnel tisztított prokollagént 2 percig tripszinnel és kimotripszinnel inkubáljuk a jelzett hőmérsékleten, majd poliakrilamid-SDS gélen elektroforetizáljuk. Hasonló olvadáspont (azaz körülbelül 41 °C) figyelhető meg, függetlenül attól, hogy volt-e kezelve, utalva ezzel arra, hogy a prokollagén normális tripla helikális konformációjú a *c-myc* antiszensz oligonukleotidokkal végzett kezelés után is.

A 24. ábrán a prokollagén α_1(I) mRNS szintje látható *c-myc* antiszensz oligonukleotiddal kezelt és kontroll humán bőrfibroblasztokban.

A 25. ábrán az I-es típusú kollagén kinyerése látható *c-myc* antiszensz oligonukleotiddal kezelt

és kontroll humán bőrfibroblasztokban 24 órával az oligonukleotidokkal való kezelés és friss, oligonukleotidokat nem tartalmazó közeggel való érintkezés után.

A 26. ábrán egy sertés-koronáriaartéria és perivaszkuláris szövetek keresztmetszeti képe látható. Megbecsüljük a *c-myc* antiszensz oligonukleotidoknak (1. számú szekvencia) az eloszlását az érfalban és a szomszédos perivaszkuláris szövetekben (20-szoros nagyítás).

A 27. ábrán a *c-myc* antiszensz oligonukleotid (1. számú szekvencia) ODN-eloszlása látható a koronáriaartériákban 30 perccel a transzkatéteres beadás után.

a és b panel: Fáziskontraszt- és fluoreszcenciamikroszkópiás mikrofotográfiák ugyanarról a szekcióról, amik a fluoreszceinnel jelzett oligonukleotidoknak a falakon keresztül való lokalizációját mutatják.

c és d panel: Fáziskontraszt- és fluoreszcenciamikrofotográfiák, amik szubintimális, nem falakon át történő ODN-eloszlást mutatnak. Az oligonukleotidok csak a közegben mutathatók ki.

e és f panel: Fáziskontraszt- és fluoreszcenciamikrofotográfiák, amelyek falközépi, nem falon át történő ODN-jelenlétet mutatnak 6,25-szoros nagyításban.

A 28. ábrán a *c-myc* antiszensz oligonukleotidok jelenlétét mutatjuk be az artériás sejtfalban, 3 nappal a transzkatéteres beadás után.

A 29. ábrán egy oszlopdiagramot láthatunk, amely az érfalhoz kötődő és perivaszkuláris radioaktivitást mutatja be ^{35}S-jelzett foszforotioát *c-myc* antiszensz oligonukleotidok falon át való beadása után. Hasonló össz-ODN-tartalmat lehet megfigyelni 30 perccel (üres oszlop; n=6) és 3 nappal (fekete oszlop; n=4) a beadásuk után, az ODN-nek a perivaszkuláris térből az érfal felé való kicserélődése miatt. Az eredményeket átlag ±SEM formában adjuk meg.

A 30a–d. ábrán a vaszkuláris struktúrák megmaradását mutatjuk be a *c-myc* antiszensz oligonukleotidok transzkatéteres beadása után.

a panel: a fluoreszcenciajelzett oligonukleotidok világosan láthatók az injekció után 30 perccel a koronáriaartéria falában;

b panel: a szomszédos szekciók megőrződött belső elasztikus lapokat és az elasztikus szövetek normális orientációját mutatják, roncsolódás nélkül (Verhoeff festék);

c panel: a citoplazmatikus festődés és a sejtmag-piknózis enyhe csökkenése figyelhető meg az ODN-retenció helyén (hematoxilin- és eozinfesték);

d panel: a 19. ábrán bemutatott szekcióval szomszédos szekció mutatja a fenti változások felbontását, az oligonukleotidok bejuttatása után 3 nappal (hematoxilin- és eozinfesték, 50-szeres nagyítás).

A 31. ábrán a fluoreszceinnel jelzett *c-myc* antiszensz oligonukleotidok intracelluláris lokalizációja látható, a vaszkuláris simaizomsejtek *in vitro* konfokális mikroszkopizálásával megbecsülve.

A 32. ábrán a fluoreszceinnel jelzett *c-myc* antiszensz oligonukleotidok intracelluláris lokalizációja látható 30 perccel az oligonukleotidok *in vivo* falon át történő bejuttatása után, a sejtmag-lokalizáció a mediális simaizomsejtekben látható.

A 33. ábrán a fluoreszceinnel jelzett *c-myc* antiszensz oligonukleotidok intracelluláris lokalizációja látható 30 perccel az oligonukleotidok *in vivo* falon át történő bejuttatása után, a sejtmag-lokalizáció a járulékos sejtekben látható.

A „kollagén" szakkifejezés jelentése a továbbiakban a molekulák egy olyan csoportja, amelyek prokollagénből szintetizálódnak. A kollagén a prokollagénből extracellulárisan szintetizálódik, az N-terminális és a C-terminális sejten kívüli lehasításával. A kollagén tripla helikális régiója elleni ellenanyagok képesek felismerni a tripla helikális régiót a prokollagénben is. Az alábbiakban alkalmazott ellenanyagok vagy a kollagén I-re és a prokollagén I-re specifikusak, vagy a kollagén III-ra és a prokollagén III-ra. A kollagén *in vitro* is szintetizálható prokollagén pepszines emésztésével.

A „graft" szakkifejezés jelentése egy vaszkuláris graft, azaz például egy arteriovénás vagy vénás graft.

A „nukleozid" szakkifejezés jelentése a továbbiakban a természetes nukleozidok, beleértve a 2'-dezoxi- és 2'-hidroxiformákat is [Kornberg és Baker: DNA Replication, 2. kiadás (1992)]. Az „analógok" szakkifejezés jelentése a nukleozidok vonatkozásában lehet szintetikus nukleozid, amelynek lehet módosított bázisa és/vagy módosított cukorrésze [Scheit: Nucleotide Analogs (John Wiley, New York, 1980)]. Ilyen analógok lehetnek szintetikus nukleozidok, amiket úgy terveztünk meg, hogy fokozott kötési tulajdonságokkal rendelkezzenek, azaz ilyen például a duplex- vagy triplexstabilitás, specifitás vagy a hasonlók.

Az „oligonukleotid" szakkifejezés jelentése a továbbiakban természetes vagy módosított monomerek vagy kapcsolatok lineáris oligomerei, beleértve a dezoxiribonukleozidokat, ribonukleozidokat, ezek α-anomerformáit, a poliamid nukleinsavakat és hasonlókat, amelyek képesek specifikusan kötődni egy megcélzott polinukleotidhoz, a szabályos monomer-monomer kölcsönhatások, mint például a Watson–Crick-típusú bázispárosodás, a Hoogsteen- vagy fordított Hoogsteen-típusú bázispárosodás és hasonlók révén. A monomerek általában foszfodiészterkötésekkel vagy azok analógjai révén kapcsolódnak össze, így olyan oligonukleotidok jönnek létre, amelyeknek a mérete néhány (azaz 3-4) monomer egységtől néhány száz monomer egységig terjed. Amikor egy oligonukleotidot betűsorral jellemzünk, mint például „ATGCCTG", akkor az nyilvánvaló, hogy a nuk-

leotidok balról jobbra 5'→3' irányban vannak egymás mellett, és „A" jelentése dezoxiadenozin, „C" jelentése dezoxicitidin, „G" jelentése dezoxiguanozin, „T" jelentése timidin, hacsak az eltérést külön nem említjük. A foszfodiészterkötések analógja lehet például a foszforotioát, foszforoditioát, foszforoszelenoát, foszforodiszelenoát, foszforoanilotioát, foszforoanilidát, foszforamidát, 3'→5' foszforamidát és hasonlók, amint azt az alábbiakban részletesen ismertetjük.

A „stabilitás" a duplex- és triplexképződésre vonatkozólag durván azt jelenti, hogy egy antiszensz oligonukleotid milyen szorosan kötődik a megcélzott célszekvenciához; pontosabban a duplex- és a triplexképződés szabadenergia képződését jelenti fiziológiás körülmények között. Az olvadáspont standardkörülmények között, amint azt például az alábbiakban ismertetjük, a duplex- és/vagy triplexstabilitás kényelmes mértéke. A találmány szerinti antiszensz oligonukleotidokat előnyösen úgy választjuk meg, hogy olvadáspontjuk legalább 50 °C legyen, az alábbiakban ismertetett standardkörülmények között; tehát fiziológiás körülmények és az előnyben részesített koncentrációk mellett a duplex vagy triplex képződés részesül előnyben azzal az állapottal szemben, amelyben az antiszensz oligonukleotid és célpontja disszociálódik. Az nyilvánvaló, hogy néhány megvalósítási módban egy stabil duplex vagy triplex képződése bázispárok, és/vagy triplexek esetében triplettek közötti néhány helytelen illeszkedés mellett is létrejöhet. Ilyen például az 1. számú szekvencia esete, ami egy humán szekvencia, az összehasonlítható sertésszekvenciához viszonyított egy bázis eltéréssel az utolsó nukleotidban. A találmány szerinti antiszensz oligonukleotidok tökéletesen illeszkedő duplexeket és/vagy triplexeket képeznek a megcélzott polinukleotidokkal.

A „szintézis" szakkifejezés a továbbiakban biológiai szövegkörnyezetben egy olyan eljárásra utal, amely biológiai molekulák, mint például extracelluláris mátrixmolekulák és extracelluláris mátrixfehérjék termelődésében játszik szerepet. A „szintézis" szakkifejezés mind a sejtben, mind a sejten kívül lejátszódó folyamatokra vonatkozik, amelyek biológiai molekulákat eredményeznek, azaz például anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, mRNS-transzkripció, mRNS-transzláció, poszttranszlációs fehérje módosítás, glikozilezés, peptidázhasítás, extracelluláris peptidázhasítás, intracelluláris peptidázhasítás, fehérjetranszport, fehérjeszekréció és fehérjefoszforilezés. A találmány szerinti eljárás előnyösen gátolja az extracelluláris mátrixmolekulák fehérjetranszlációját, a poszttranszlációs fehérje processzálást, a fehérje szekrécióját vagy az intracelluláris peptidázhasítást.

A találmány tárgyát képezik bizonyos antiszensz vegyületek, amelyek gátolják az extracelluláris mátrixfehérjék, különösen a kollagén, pontosabban az I-es típusú és III-as típusú kollagén nem megfelelő szintézisét egy szövetben. Az extracelluláris mátrixfehérjék nem megfelelő és/vagy fölösleges szintézise kóros állapotok kialakulását eredményezi, ami például nem kívánt szálas kötőszövet képződésében mutatkozik meg. Ilyen kóros állapot például a szklerotikus rendellenesség, vaszkuláris resztenózis, ateroszklerózis, aterogenezis, keloidbetegség, májcirrózis, az ízületek reumás rendellenességei, az arteriovénás és vénás graft átjárhatósága, a sebészeti beavatkozás utáni sebhelyképződés, rekonstruktív sebészeti beavatkozás és hasonlók, amik általában megtalálhatók az emberekben. Számos különböző szövettípus lehet egy ilyen nem megfelelő szintézis helye, beleértve a vaszkuláris simaizomsejteket, az endoteliális sejteket, a bőr- és szervfibroblasztokat, például a keloidbetegségben vagy poszttraumatikus vagy sebészeti beavatkozás utáni sebhelyképződés, szinoviális sejtek és más ízületi komponensek. A jelen találmány egy megvalósítási módja különösen jól használható az arteriovénás és vénás graftok átjárhatósága csökkenésének vagy megszűnésének megelőzésében. A jelen találmány egy másik megvalósítási módja különösen jól használható a resztenózis, egy akut vaszkuláris sérülés kezelésében, ami emberekben általában angioplasztikát követően lép fel. A resztenózis kapcsolatban áll a simaizomsejteknek a vaszkuláris intimához való vándorlásával, a szaporodással és az extracelluláris mátrixkomponensek szintézisével [Holmes és munkatársai: PTCA 12. fejezet, szerk.: Vlietstra és munkatársai (Davis Company, Philadelphia, 1987)].

Egy antiszensz vegyület terápiásan hatásos mennyiségének egy megcélzott polinukleotiddal rendelkező szövetbe való beadásával az extracelluláris fehérje nem megfelelő (azaz fölösleges) szintézise gátolható. A megcélzott polinukleotid lehet egyszálú vagy kétszálú DNS vagy RNS; azonban az egyszálú DNS- vagy RNS-célpontokat részesítjük előnyben. A találmány szerinti sejtmag antigének genomiális nukleotidszekvenciája és mRNS-átirata a szakirodalomból ismert, idetartozik például a *c-myc, c-myb,* c-fos, N-myc, L-myc, p53, c-rel, c-ski, c-ets-1, c-ets-2 és a hasonlók [Oncogenes, szerk.: Glover (IRL Press, Oxford, 1989)]. Pontosabban, a *c-myc* és *c-myb* szekvenciákat az alábbi publikációkban ismertetik: *[c-myc* protoonkogén szekvenciák: Marcu és munkatársai: Annu. Rev. Biochem. *61,* 809–860 (1992); Watt és munkatársai: Nature *303,* 725–728 (1983); Battey és munkatársai: Cell *34,* 779–787 (1983); Epstein és munkatársai: NTIS publikáció PB93–100576; *c-myb* protoonkogén szekvenciák: Gewirtz és munkatársai: 5,098,890 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés; Majello és munkatársai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA *79,* 9636–9640 (1986)]. Emellett a szaporodó sejt nukleáris antigén, a ciklin (D_1 és B_1), a cdc2 kináz, a vdk kináz és az E2F is szerepelhet célpontként (a továbbiakban mint „sejtciklus"-génekre hivatkozunk rájuk). A jelen találmány szerinti antiszensz oligonukleotidokkal megcélzott nukleáris protoonkogén előnyösen a *c-myc* és/vagy a *c-myb.*

Az nyilvánvaló, hogy a célpont, amire a találmány szerinti *c-myc* antiszensz oligonukleotidok irányulnak, lehetnek a protoonkogének allélformái. A szakirodalomban nagy mennyiségű információ található arra nézve, hogy miként kell kiválasztani egy bizonyos

szekvenciát az antiszensz oligonukleotidokhoz, feltéve, hogy ismerjük a megcélzott polinukleotid szekvenciáját [Uhlmann és Peymann: Chemical Reviews *90,* 543–584 (1990; Crooke: Ann. Rev. Pharmacol, Toxicol. *23,* 329–376 (1992); Zamecnik és Stephenson: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA *75,* 280–284 (1974)]. A *c-myc* antiszensz vegyületek szekvenciáját előnyösen úgy választjuk meg, hogy G-C-tartalmuk legalább 60% legyen. A szekvenciákat előnyösen úgy választjuk meg, hogy az 1., 5–7. vagy 8–11. számú szekvenciák 12–15 egybefüggő nukleotidját tartalmazzák. Az előnyben részesített. mRNS-célpontok közé tartozik az 5' cap hely, a tRNS primer kötőhely, az iniciációs kodon hely, az mRNS donor illesztési hely, az mRNS akceptor illesztési hely és a hasonlók [Goodchild és munkatársai: 4,806,463 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés].

Ha azzal a céllal szelektáljuk az antiszensz oligonukleotidokat, hogy a humán *c-myc* második exonján levő ATG iniciációs helyet célozzák meg, konszekutív szekvenciájú oligonukleotidokat adhatunk be 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 28, 30, 31, 32, 33, 34 vagy 35 bázisból álló oligonukleotidokat alkalmazva, és az ATG hely bármelyik oldalán levő 25 bázispár nagyságú régiójából választhatjuk meg [a Gazin és munkatársai által megadott humán szekvencia; Gazin és munkatársai: EMBO Journal *3:*2, 383–387 (1987), amely szekvenciát a továbbiakban referenciának tekintünk]:

5' cccgc tccagcagcc tcccgcgacg ATG cccctcaacg ttagcttcac caaca 3'

Az antiszensz oligonukleotidok előnyösen tartalmazzák az ATG kodont. A 6. és 7. számú szekvencia bármelyik oldalán levő 25 bázispár méretű régió is használható, hogy az ebben a fejezetben tárgyalt méretű oligonukleotidokat ki tudjuk választani.

A találmány szerinti antiszensz oligonukleotidok tartalmazhatnak bármilyen olyan polimer anyagot, amely képes specifikusan kötődni egy megcélzott polinukleotidhoz, a szokásos monomer-nukleozid kölcsönhatások révén, mint amilyen például a Watson–Crick-típusú bázispárosodás, a Hoogsteen- vagy reverz Hoogsteen-típusú bázispárosodás és a hasonlók. A találmány szerinti antiszensz vegyületek tartalmazhatnak oldalláncokat vagy egységeket, vagy a polimer alapvető ismétlődő egységének részeként, vagy attól függetlenül, hogy ezzel fokozzuk a specifitást, a nukleázrezisztenciát, a bejuttatást, vagy más, a hatékonysághoz tulajdonságot, azaz például koleszterinegységeket, duplex interkalátorokat, mint például akridint, poli-L-lizint, „véglezáró" egységeket, egy vagy több nukleázrezisztens kapcsolócsoporttal, mint amilyen például a foszforotioát és a hasonlók. A jelen találmányban jól használható néhány jellemző oligonukleotid szekvenciáját a mellékelt szekvencialistában adjuk meg.

A találmány szerinti antiszensz vegyületek lehetnek a találmány szerinti vegyületek gyógyászatilag elfogadható sói, beleértve az alkálifémsókat, azaz például a nátrium- vagy magnézium-, ammónium- vagy NX_4^+-sókat, ahol is X jelentése 1–4 szénatomszámú alkilcsoport. Más, gyógyászatilag elfogadható sók lehetnek a szerves savak sói, mint az ecetsav, tejsav, borostyánkősav, almasav, izetionsav, laktobionsav és a borkősav; valamint a szervetlen savak, mint például a sósav, kénsav, foszforsav és szulfámsav sói. Egy hidroxilcsoportot tartalmazó vegyület gyógyászatilag elfogadható sója lehet ennek a vegyületnek az anionja, egy megfelelő kationnal, mint például Na^+-, NH_4^+-kationnal és hasonlókkal.

A találmány szerinti antiszensz vegyületek nukleázrezisztenciáját úgy biztosítjuk, hogy nukleázrezisztens kötéseket építünk beléjük. Számos különböző kötés ismert a szakirodalomban. Ilyen például a foszforotioát [Zon és Geiser: Anti-Cancer Drug Design *6,* 539–568 (1991); Stec és munkatársai: 5,151,510 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés; Hirschben: 6,166,387 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés; Bergot: 5,183,885 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés]; foszforoditioátok [Marshall és munkatársai: Science *259,* 1564–1570 (1993); Caurathers és Nielsen: WO/89/11486 (1989. 11. 30) számú nemzetközi bejelentés]; foszforamidátok, például $-OP(=)(NR^1IR^2)-O-$, ahol R^1 és R^2 jelentése hidrogénatom vagy 1–3 szénatomszámú alkilcsoport [Jager és munkatársai: Biochemistry *27,* 7237–7246 (1988); Froehler és munkatársai: WO/90/15065 (1990. 12. 13.)], 3'→5' foszforamidátok [Gryaznov és munkatársai: WO/95/27136 (1995. 10. 12.) a benne ismertetett vegyületekre és módszerekre referenciaként hivatkozunk]; peptid nukleinsavak [Nielsen és munkatársai: Anti-Cancer Drug Design *8* 53–63 (1993); WO/92/20703 (1992. 11. 26.) számú nemzetközi bejelentés]; metil-foszfonátok [Miller és munkatársai: 4,507,433 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés; Ts'o és munkatársai: 4,469,863 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés, Miller és munkatársai: 4,757,055 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés]; különböző típusú P-királ kötések, főleg a foszforotioátok [Stec és munkatársai: 92301950.9 számú európai szabadalmi bejelentés; Lesnikowski: Bioorganic Chemistry *21,* 127–155 (1993)]. További nukleázkötés lehet a foszforoszelenoát, a foszforodiszelenoát, a foszforoanilidát, az alkil-foszfotriészter, úgymint a metil- és etil-foszfotriészter, a karbamát, a morfolino-karbamát, a 3-tioformacetál, a szilil, úgymint a dialkil-(C_1–C_6)- vagy difenil-szilil, a szulfamát-észter és hasonlók. Ezeket a kötéseket, valamint az oligonukleotidokba való bejuttatásuk módszereit számos publikációban ismertetik [Uhlmann és Peymann: Chemical Reviews *90,* 543–584 (1990); Milligan és munkatársai: J. Med. Chem. *36,* 1923–1937 (1993); Matucci és munkatársai: WO/92/05186 (1992. 04. 02.) számú nemzetközi bejelentés]. A találmány szerinti vegyületekben előnyösen a foszfodiészterkötések foszforanalógjait használjuk, azaz például a foszforotioát-, foszforoditioát-, foszforamidát- vagy metil-foszfonát-kötéseket. Még előnyösebb, ha nukleázrezisztens kötésként a foszforotioátkötést alkalmazzuk. Az

nyilvánvaló, hogy az előnyben részesített kapcsolócsoportok mellett a találmány szerinti vegyületek tartalmazhatnak további módosításokat, azaz például boronozott bázisokat [Spiegelvogel és munkatársai: 5,130,302], koleszterinegységeket [Shea és munkatársai: Nucleic Acids Research *18,* 3777–3783 (1990); Letsinger és munkatársai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA *86,* 6553–6556 (1989)], pirimidinek 5-propenilmódosításait [Froehler és munkatársai: Tetrahedron Lett. *33,* 5307–5310 (1992)] és hasonlókat.

A találmány szerinti antiszensz vegyületeket előnyösen szokványos módszerekkel szintetizáljuk meg, kereskedelmi forgalomban levő automatizált DNS-szintetizátorokkal, azaz például egy Applied Biosystems (Fosters City) 380B, 392 vagy 394 DNS/RNS szintetizátorral. Előnyösen a foszforamiditkémiát alkalmazzuk, a szakirodalomban szereplő leírások szerint [Beaucage és Iyer: Tetrahedron *48,* 2223–2311 (1992); Molko és munkatársai: 4,980,460 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés; Koster és munkatársai: 4,725,677 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés; Caruthers és munkatársai: 4,415,732, 4,458,055 és 4,973,679 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés; és hasonlók].

Azokban a megvalósítási módokban, amelyekben triplexképződésre van szükség, a megcélzott szekvenciák megválasztásában megszorításokat kell alkalmazni. A harmadik lánc asszociálódása Hoogsteen-típusú kötéssel akkor a legstabilabb, ha egy kétszálú célpontban egy homopiridin-humopurin részhez kötődik. A bázistriplettek általában a T-A*T vagy C-G*G motívumokban alakulnak ki (ahol a „–" jelentése Watson–Crick-típusú párosodás, a „*" jelentése Hoogsteen-típusú kötés), azonban más motívumok is lehetségesek. A Hoogsteen-típusú bázispárosodás például lehetővé teszi a parallel és antiparallel orientációt a harmadik szál (a Hoogsteen-szál) és a duplex purinban gazdag szála között, amelyhez a harmadik szál hozzákapcsolódik, a szálak állapotától és összetételétől. A szakirodalomban részletes tájékoztatás található a megfelelő szekvenciák, az orientáció, a körülmények, a nukleozid típusa (azazhogy ribóz vagy dezoxiribóz nukleozidokat használunk), a bázismódosítások (azaz metilezett citozin és hasonlók) megválasztásáról, azzal a céllal, hogy maximalizáljuk vagy más módon szabályozzuk a triplex stabilitását, amint arra bizonyos megvalósítási módokban szükség van [Roberts és munkatársai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA *88,* 9397–9401 (1991); Roberts és munkatársai: Science *258,* 1463–1466 (1992); Distefano és munkatársai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA *90,* 1179–1183 (1993); Mergny és munkatársai: Biochemistry *30,* 9791–9798 (1991); Cheng és munkatársai: I. Am. Chem. Soc. *114,* 4465–4474 (1992); Beal és Dervan: Nucleic Acids Research *20,* 2773–2776 (1992); Beal és Dervan: I. Am. Chem. Soc. *114,* 4976–4982 (1992); Giovannangeli és munkatársai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA *89,* 8631–8635 (1992); Moser és Dervan: Science *238,* 645–650 (1987); McShean és munkatársai: Journal of Biological Chemistry *267,* 5712–5721 (1992); Yoon és munkatársai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA *89,* 3840–3844 (1992); Blume és munkatársai: Nucleic Acids Research *20,* 1777–1784 (1992); és hasonlók].

Az oligonukleotidok hossza elég nagy ahhoz, hogy a specifikus kötés csak a megcélzott polinukleotidokon történjen meg, és ne egyéb, véletlenszerű területeken, amint azt számos referenciában ismertetik [Rosenberg és munkatársai: PCT/US92/05305 nemzetközi bejelentés; Szostak és munkatársai: Methods in Enzymology *68,* 419–429 (1979)]. A hossz felső határát számos faktor határozza meg, beleértve a 30–40 nukleotidnál többet tartalmazó oligomerek szintézisének és tisztításának kényelmetlenségét és költségességét, a hosszabb oligonukleotidok nagyobb toleranciáját a helytelen illeszkedéssel szemben, azt, hogy a kötődés vagy specifitás fokozására vannak-e jelen módosítások, azt, hogy duplex- vagy triplexkötésre van-e szükség stb. A találmány szerinti antiszensz vegyületek hossza általában 12–60 nukleotid. Még előnyösebb, ha a találmány szerinti antiszensz vegyületek hossza 15–40 nukleotid; legelőnyösebb, ha a hosszuk 18–30 nukleotid.

A találmány szerinti antiszensz oligonukleotidok hőstabilitását előnyösen olvadási vagy láncdisszociálódási görbék alapján határozzuk meg. Az ötvenszázalékos száldisszociálódáshoz tartozó hőmérséklet az olvadáspont (T_m), ami előnyös eszköze a stabilitás meghatározásának. A T_m-méréseket általában sóoldatban végezzük semleges pH-n, a megcélzott és antiszensz oligonukleotidkoncentrációk körülbelül 1,0–2,0 μmol/l között vannak. A tipikus körülmények az alábbiak: 150 mmol/l nátrium-klorid és 10 mmol/l $MgCl_2$ egy 10 mmol/l nátrium-foszfát-pufferben (pH=7,0) vagy egy 10 mmol/l-es TRIS-HCl pufferben (pH=7,0), és hasonló körülmények. Az olvadáspontadatokat úgy állítjuk össze, hogy az antiszensz oligonukleotid/megcélzott polinukleotid komplexből vett mintát szobahőmérsékletről körülbelül 85–90 °C-ra melegítjük. Ahogy a minta hőmérséklete nő, 1 °C-onként követjük a 260 nm-en mérhető fényelnyelést, Cary (Ausztrália) 1E modellel vagy Hewlett-Packard (Palo Alto, CA) HP 8459 UV/VIS spektrofotométerrel és HP 89100A hőmérséklet-szabályozóval vagy hasonló berendezésekkel. Az ilyen technikák kényelmes módszerei a különböző hosszúságú és összetételű antiszensz oligonukleotidok kötési erősségének mérésére és összehasonlítására.

A jelen találmány tárgya továbbá egy gyógyászati készítmény, amely jól használható az extracelluláris mátrixfehérjék szintézisének gátlására, amely egy gyógyászatilag elfogadható töltőanyagot és egy, a sejtmag-protoonkogénre specifikus antiszensz oligonukleotidot tartalmaz, elegendő mennyiségben ahhoz, hogy gátoljuk az extracelluláris mátrixfehérjék szintézisét, ha az ilyen kezelésre szoruló betegnek adják be. Tehát a találmány szerinti antiszensz oligonukleotidokat egy ilyen gyógyászati készítmény egy vagy több komponenseként alkalmazzuk. A találmány szerinti gyógyászati

készítmények komponensei számos faktortól függnek, beleértve a kezelendő betegség vagy állapot természetét, a betegségléziók lokalizációját, a gyógyszer bejuttatásának és/vagy beadásának megfontolt módját, amely utóbbi lehet *in vivo* beadás egy katéterrel, a megcélzott lézió vagy szerv területére, topikális alkalmazás, intranazális alkalmazás, implantált vagy transzdermális, lassú felszabadulású rendszer és hasonlók.

A találmány szerinti gyógyászati készítmények tartalmaznak egy gyógyászatilag elfogadható hordozót, amely számos különböző komponenst tartalmazhat, amelyek számos különböző funkciót látnak el, beleértve a gyógyszer koncentrációjának szabályozását, az oldhatóság szabályozását, a kémiai stabilizációt, a viszkozitás szabályozását, az abszorpció fokozását, a pH szabályozását és hasonlókat. Vízoldható kiszerelési formában a gyógyászati készítmények például előnyösen tartalmaznak egy puffert, mint például egy foszfátpuffert vagy szerves sót, előnyösen 7 és 8 közötti pH-értéken. Azoknál a készítményeknél, amelyek gyengén oldódó antiszensz vegyületeket tartalmaznak, mikroemulziók alkalmazhatók, például nemionos felületaktív anyag, úgymint Tween 80 használatával 0,04–0,05 tömeg/térfogat %-ban, az oldhatóság fokozására. Más komponensek tartalmazhatnak antioxidánsokat, azaz például aszkorbinsavat, hidrofil polimereket, azaz például monoszacharidokat, diszacharidokat és más szénhidrátokat, beleértve a cellulózt vagy származékait, a dextrint, a kelátképző ágenseket, úgymint az EDTA-t és a hasonló vegyületeket, amelyek jól ismertek a gyógyszer-technológiai szakirodalomban [Remington's Pharmaceutical Science, legújabb kiadás (Mack Publishing Company, Easton, PA)].

A találmány szerinti gyógyászati készítményekben használható szabályozott kibocsátású rendszer közé tartoznak a féligáteresztő polimer mátrixok, film formájában, a mikrokapszulák és hasonlók, amelyek polilaktidok, L-glutaminsav és gamma-etil-L-glutamát, poli(2-hidroxi-etil-metakrilát) és hasonló anyagok kopolimereiből állnak [Rosenberg és munkatársai: PCT/US92/05305 nemzetközi szabadalmi bejelentés]. A szabályozott felszabadulású rendszerek tartalmaznak liposzómákba zárt antiszensz vegyületeket [Liposome Technology, *II,* Incorporation of Drugs, Proteins and Genetic Material (CRC Press)].

A *c-myc* antiszensz oligonukleotidnak adott alkalmazásokban való hatékony mennyisége számos faktortól függ, beleértve az antiszensz oligonukleotid kémiai természetét, a kezelt rendellenességet, a beadás módját és hasonló faktorokat. A hatékony mennyiség előnyösen a *c-myc* antiszensz oligonukleotidból 1–100 μmol/l koncentrációt biztosít a megcélzott polinukleotidnál; még előnyösebb, ha a hatékony mennyiség 1–10 μmol/l antiszensz oligonukleotidkoncentrációt biztosít a megcélzott polinukleotidnál.

A vaszkuláris rendellenességek, úgymint a vaszkuláris resztenózis esetében a sejtmag-protoonkogénekre specifikus antiszensz oligonukleotidokat előnyösen lokálisan adjuk be a traumatizált artériához, egy katéter segítségével. A resztenózislézióhoz bevitt antiszensz oligonukleotidok előnyösen *c-myc*- és/vagy *c-myb*-specifikusak; még előnyösebben a *c-myc*-re és *c-myb*-re is specifikus antiszensz oligonukleotidok kombinációját alkalmazzuk, hogy ezzel csökkentsük a resztenózishoz kapcsolódó extracelluláris mátrixfehérje szintézisét. A resztenózis általában egy eljárás után lép fel, mint például a perkután transzluminális koronáriaangioplasztika (PTC) után, ami egy artéria falán lokális roncsolást vagy sérülést okoz. Egy ilyen sérülésre adott válaszként egy okkluzív lézió gyakran a következő jelenségből fakad: az artéria gyulladása a sérülés helyén, trombózis, a simaizomsejtek akkumulációja vándorlással és szaporodással, valamint az extracelluláris mátrix simaizomsejt és fibroblaszt szintézise.

A vaszkulárisgraft-rendellenességek esetében az oligonukleotidokat előnyösen a graftot körülvevő kötőszövetbe juttatjuk be, a graft tönkremenetelének megelőzésére. A graft általában akkor megy tönkre, ha átjárhatóságának 50%-át vagy még többet elveszíti. Az nyilvánvaló, hogy az oligonukleotid bejuttatását, ahogy azt az alábbiakban ismertetett technikákkal leírjuk, az olyan arteriovénás graftokba irányíthatjuk, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, mint például a prosztetikus fisztulák [beleértve a PTFE (Gortex vagy Impra), a poli(éter-uretán), dakron, humán köldökzsinór, génsebészeti úton módosított vénák és immunszuppresszált sertés- vagy szarvasmarhaerek], arteriovénás söntök, natív vénafisztulák [beleértve a radiális fejvivőér (Brescia–Cimino), a singcsonti vagy radiális artériás könyökhajlati gyűjtőér, kari artériakoponya- vagy karverőér- és a combcsontiartéria-, rózsaérgraftokat] és a vénás graftok, úgymint anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a vénagraftokat, immunszuppresszált rózsaérallograftokat, immunszuppresszált köldökzsinór-allograftokat, génsebészeti úton módosított vénákat, immunszuppresszált xenograftokat és vénás autograftokat, valamint bármely más vénát, amely kompatibilis az emberrel, azaz a graftoló szövet és anyag képes graftolni a humán szövettel.

A vaszkuláris graft tönkremenetelének, azaz különösen az arteriovénás graft tönkremenetelének megelőzésére perivaszkulárisan beadott oligonukleotidokat, azaz a találmány szerinti oligonukleotidokat általában a megcélzott alkalmazást körülvevő perivaszkuláris szövetbe injekciózzuk. Azokban az esetekben, amelyekben az oligonukleotid folyamatos infúziójára van szükség, azaz olyan betegekben, akiknek a kórtörténetében előfordul az arteriovénás graft átjárhatóságának gyors és súlyos elvesztése, más bejuttatórendszerek alkalmazhatók, azaz például szubkután infúziós szivattyúk, a graftra illesztett gélek és biológiailag lebontható mátrixok, előnyösen humán szérumalbuminnal 1:10–1:100 oligonukleotid:fehérje arányban összekeverve, gélek [azaz pluron-, Hydron vagy etilén-vinil-acetát gélek], Edelman és munkatársai szerinti gélek [Edelman és munkatársai: Circulation Research *76,* 176–182 (1995); Edelman és munkatársai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA *87,* 3773–3777 (1990); amely módszereket a továbbiakban referenciának tekintünk], benn maradó katéterrendsze-

rek (Broviac-katéterek vagy teljesen benn maradó katéterrezervoár-rendszerek, azaz olyanok, amilyeneket Poletti és munkatársai írtak le) [Poletti és munkatársai: J. Neurosurg. *55,* 581–584; amely módszereket a továbbiakban referenciának tekintünk], impregnált biokompatibilis anyagok, valamint más hatóanyag-bejuttató készítmények és rendszerek, amelyeket az alábbiakban ismertetünk. Az nyilvánvaló, hogy egy rezervoár készíthető, hogy az oligonukleotidot a felhasználás helyéhez közel szabadítsuk fel, azzal a céllal, hogy meghosszabbítsuk az oligonukleotid bejuttatásának idejét. A rezervoárt egyszerűen úgy állíthatjuk elő, hogy a sebészeti beavatkozás során vagy után, de a seb bezárása előtt az oligonukleotidot a perivaszkuláris szövetbe injekciózzuk, vagy az arteriovénás graft után végrehajtott perivaszkuláris injekcióval, mint például az arteriovénás fisztula esetében, vagy az injekciót a szakterületen jártas szakember számára ismert módszerekkel, például szonogrumokkal vezetve. Az injekciók megismételhetők a meghosszabbított kezelésekhez, azaz például a hemodialízis-hozzáférési helyeknél. Arra sem szükség nincs, sem nem kívánatos, hogy eltávolítsuk az adventiciákat az érből, mivel a perivaszkuláris szövet az oligonukleotid raktáraként vagy tárolójaként működhet, amiből viszonylag lassan diffundál ki. A tárolóban levő oligonukleotidot is lassabban viszi el a keringési rendszer, mint ha intraluminális katéterrel adjuk be. A perkután vagy perivaszkuláris beadáshoz a beadott dózis 0,1–100 mg per, előnyösen 0,25–50 mg, még előnyösebben 0,5–10 mg per egy beadás.

A graft tönkremenetelének megakadályozására a perivaszkuláris szövetbe való beadás mellett más anatómiai struktúrák, azaz például az endoteliális réteg, közeg és az adventicia használható tárolóhelyként, főleg akkor, ha az oligonukleotidot nem az ér lumenéből alkalmazzuk. Az ilyen természetesen előforduló tárolóhelyek, beleértve a perivaszkuláris szövetet, különösen jól használhatók az arteriovénás graftok, főleg arteriovénás söntök kezelésére, ahol a közeg vagy az elasztikus lamina érintetlen és nincs elvágva, a sebészeti sérülés ellenére. Az különösen előnyös, ha az arteriovénás graft vénarészéhez közel levő helyeket használunk, főleg egy arteriovénás fisztula vagy sönt vénarészét. Az arteriovénás fisztula alkotja a fisztula vénás részét, amint azt az 1. ábrán nyíllal jelöljük. Az nyilvánvaló, hogy a nem természetes tárolóhelyek is képesek egy elromlófélben levő graftot oligonukleotidokkal ellátni, amint azt az 1. ábrán a szürke területek mutatják, amire a példákat az alábbiakban tárgyaljuk. Ha a természetben elő nem forduló tárolóhelyeket alkalmazzuk, akkor az az előnyös, ha vagy biológiailag lebonthatók, vagy biológiailag lebonthatók vagy újratölthetők. Az újratölthető tárolóhelyeknek előnyösen két típusuk van:

1. egy újratölthető tárolóhely, amit az arteriovénás graft vénás része előtt rögzítünk, és amelyben vagy amely mellett a PTFE-csövet vagy más biokompatibilis anyagot használunk egy arteriovénás graft kialakítására;
2. egy tárolóhely, amit az arteriovénás graftot körülvevő perivaszkuláris szövetben rögzítettünk, előnyösen az arteriovénás graft vénás részének 5 cm-én belül, még előnyösebben 2 cm-én belül, és perkután injekcióval újratölthető.

Az ilyen, természetben elő nem forduló perivaszkuláris tárolóhelyeket az arteriovénás graft készítésére végzett sebészeti beavatkozás során lehet beépíteni. Az újratölthető perivaszkuláris tárolóhelyek a mellimplantátumok készítésénél használt anyagokból készíthetők, és előnyösen egy féligáteresztő membránnal együtt alkalmazzuk, amely lehetővé teszi az oligonukleotidnak a perivaszkuláris szövetbe való diffúzióját.

A vénákkal készített vaszkuláris graftok, főleg a bypasseljárásokhoz készítettek, tönkremenetelének megakadályozására az oligonukleotid *ex vivo* alkalmazásához a vénákat *ex vivo* érintkezésbe hozzuk egy olyan oligonukleotiddal, amely komplementer a sejtmag-protoonkogén-mRNS-sel. A vénákat általában legalább 10 percig inkubáljuk 20–37 °C között egy steril és fiziológiásan elfogadható pufferben. Rövidebb időtartamot is alkalmazhatunk különösen magas koncentrációk esetében. A hosszabb, 30–90 közötti inkubációs idők is megfelelőek és kompatibilisak az ilyen eljárásoknál kialakuló, a véna eltávolítása és a graftolás között eltelt időeltolódással. Alacsonyabb inkubációs hőmérsékletek is alkalmazhatók, azaz például 4 °C, főleg akkor, ha a vénát egy távoli donorhelyről kell szállítani, általában magasabb oligonukleotidkoncentrációkkal együtt. A koncentráció általában 5–500 μmol/l között változik, az inkubálás idejétől, az oligonukleotid típusától és a hőmérséklettől függően. Az inkubációs idő előnyösen 30–60 perc között változik, a hőmérséklet pedig 22–37 °C között. Az oligonukleotidkoncentráció előnyösen 10–100 μmol/l, még előnyösebben 25–100 μmol/l között változik. Az nyilvánvaló, hogy számos különböző típusú puffer használható mindaddig, ameddig fiziológiásan elfogadhatók, azaz például 0,9% sóoldat (NaCl) vagy foszfáttal pufferelt sóoldat, valamint más, az alábbiakban ismertetett pufferek és sók. Az nyilvánvaló, hogy számos különböző típusú véna alkalmazható a találmányban, beleértve a nem emberből származó vénákat, a génsebészeti úton megváltoztatott emlősökből, főleg sertésekből származó vénákat, és számos humán vénát, amelyek lehetnek allograftok és autograftok is (azaz például rózsaér, fejvivőér, könyökhajlati gyűjtőér, karvéna és combcsontvéna).

Az intravaszkuláris alkalmazásokhoz (azaz azzal a céllal, hogy megakadályozzuk angioplasztia után a resztenózist) az antiszensz oligonukleotidokat előnyösen a lézió szomszédságába juttatjuk el, katéteren keresztül a lumen belsejéből, vagy az adventicián (azaz az érfal legkülső rétegén) keresztül, olyan anyagokkal, amelyek elősegítik az antiszensz vegyületek lassú felszabadulását, azaz például plurongélrendszerekkel [Simons és munkatársai: Nature *359,* 67–70 (1992)], porózus vagy iontoforetikus ballonnal [Fernandez-Ortiz, A. és munkatársai: Circulation *89,* 1518–1522 (1994)], amely publikációkat a továbbiakban referenciaként kezelünk. A lokális bejuttatáshoz alkalmazott

más lassú felszabadítási technikák közé tartozik az antiszensz vegyülettel borított stent, azaz például egy kötőanyagot vagy gélt alkalmazva [Wilensky és munkatársai: Trends in Cardiovascular Med. *3,* 163–170 (1993)]. A megcélzott lézióba eljuttatott dózis 1 μg és 10 mg között van, a gyógyászati készítményben alkalmazott mindegyik vagy mindkét antiszensz vegyületnél. A dózis előnyösen 1 μg és 1 mg között van; még előnyösebb, ha a dózis 1 μg és 10 μg között van. A bejuttatási idő előnyösen 30 másodperc és 60 perc között lehet, még előnyösebben körülbelül 30 másodperc és körülbelül 1-2 perc között [Zalewski és munkatársai: Coronary Angioplasty (szerk.: Goldberg), 79–87. oldal (Davis, Philadelphia, 1988)].

A katéteres beadásnál a beadott dózis 0,1 mg és 10 mg között változik artériánként, előnyösen 0,25–4 mg per artéria, még előnyösebben 0,5–2 mg per artéria. A beadott dózis a szövetben alkalmazott gyógyszermennyiség, ahol „a megcélzott lézióba bejuttatott dózis" szakkifejezés jelentése a gyógyszermennyiség a szövetben a szövetbe való bejuttatás után.

A koronáriaangioplasztia jól ismert a szakterületen jártas szakember számára, és részletesen ismertetik a szakirodalomban [Clark: Coronary Angioplasty (Liss, New York, 1987); Vlietstra és munkatársai; (Davis Company, Philadelphia, 1987) és hasonlók].

A bőrben való túl nagy sebhelyek kialakulása, azaz például a sebészeti beavatkozás utáni forradások, keloidbetegség és hasonlók esetében a topikális beadást részesítjük előnyben a bőrfibroblasztokban való extracelluláris mátrixfehérje fölösleges szintézisének, főleg a kollagén szintézisének gátlására.

Topikális alkalmazásnál a beadott dózis (azaz a gyógyszernek a szövetbe bevitt mennyisége) általában 0,01 μg–10 mg gyógyszer per cm^2, előnyösen 0,2 μg–7 mg gyógyszer per cm^2, és előnyösebben 0,5–5 mg gyógyszer per cm^2. A sebészeti beavatkozás utáni kezelésnél beadott dózis előnyösen 0,2–4 mg gyógyszer per cm^2. A bőrhorzsolásoknál, bőrlézióknál, aknénál és sebészeti beavatkozásoknál alkalmazott topikális krémekben a dózis előnyösen 0,05–3 mg gyógyszer per cm^2.

A húgycső-, húgyvezeték- vagy húgyhólyagsebhelyeket vagy beszűkülést eredményező urológiai rendellenességek esetében a katéteren keresztül való beadást vagy antiszensz oligonukleotiddal borított implantumokat részesítjük előnyben.

A simaizomsejteket és fibroblasztokat tartalmazó szervek, mint például a gasztrointesztinális szervek, az epevezeték, tüdő és máj súlyos forradásai esetében az antiszensz vegyületek beadása lehet szisztémás vagy lokális. A lokális beadás magában foglalja az antiszensz oligonukleotidok direkt injekciózását a megcélzott szervbe, a beültetett gélekkel vagy polimerekkel való bejuttatást, vagy a beborított stentekről vagy más protetikus anyagokról való felszabadulást.

Az előzőkben ismertetett mindegyik rendellenesség esetében a betegek kezelésre való kiválasztásának és a terápiás végpontnak való meghatározása a specifikus rendellenességek esetében jól ismertek a szakirodalomban. Például a vaszkuláris sztenózis esetében a körülményre való érzékenységhez kapcsolódó faktor a hímnem, a bypassgraftok sztenózisra való tágulása, Canadian Hart 3-as és 4-es osztály az alapvonalnál és a szívizominfarktus előfordulása [Holmes és munkatársai: PTCA 12. fejezet, szerk.: Vlietstra és munkatársai (Davis Company, Philadelphia, 1987)]. A kezelés hatékonyságát ugyanúgy becsüljük meg, mint minden más PTCA-technikánál. Az eredményeket általában vizuálisan becsüljük meg, de vannak más technikák is. A hemodialízis-hozzáférési helyek elromlására használt módszerek közé tartozik a Doppler-ultrahang, a kontrasztangiográfia és az ultrahang [Dousset és munkatársai: Radiology *181,* 89 (1991); Nonnast-Daniel és munkatársai: Lancet *339*(8786), 143 (1992); Davidson és munkatársai: Kidney International *40,* 91–95 (1991)], amely publikációkat a továbbiakban referenciaként kezelünk, valamint a fizikai megfigyelések (azaz éles zaj a hozzáférési hely fölött vagy vízkalapácspulzus). A sztenózis vagy resztenózis súlyosságának felbecslése (egy PTCA-jelölt meghatározására vagy a PTCA eredményének meghatározására) különböző módszerek használhatók, amelyek a lézió vizuális megfigyelésétől a kérdéses artéria méretének számítógépes elemzéséig terjedhetnek, azaz például tomográfiai adatok, a disztális vaszkuláris ágyban való áramlás, a sztenózis denzitometriai jellemzői vagy a regionális falmozgás változásai a lézió zónájában [Bove: PTCA 9. fejezet, szerk.: Vlietstra és munkatársai (Davis Company, Philadelphia, 1987)].

1. példa

Az arterializált sertésvéna remodellezése – egy *in vivo* modell az arteriovénás graftok átjárhatóságának elvesztésére

Ahhoz, hogy igazoljuk egy, a találmány szerinti oligonukleotid hatékonyságát egy arteriovénás graft vénás részében az extracelluláris mátrixfehérje termelődésének csökkentésében, először egy *in vivo* modellt fejlesztettünk sertésben. Ez a modell lehetővé teszi egy arteriovénás graft átjárhatóságának követését, beleértve a graft vénás részét is.

A sertés arterializált véna modellben a rózsaereket kivágjuk, majd karotid artériákhoz anasztomizáljuk, vég a véghez. Miután készen vagyunk a sebészeti beavatkozással, hagyjuk, hogy az artériás vér áramlása újra létrehozza a normális artériás nyomást [Violaris és munkatársai: Ann. Thorac. Surg. *53,* 667–71 (1995); Angelini és munkatársai: J. Thorac. Cardiovas. Surg. *99,* 433–9 (1990)], amely publikációkat a továbbiakban referenciaként kezelünk. A magas artériás nyomás a vég a véghez rózsaérgraftban serkenti egy vénának a magas artériás nyomással való érintkezését egy arteriovénás graftban vagy vénás graftban. A vénás graftok vénás részeit (n=7) a graft elkészítése után nyolc nappal eltávolítjuk, majd a hisztológiai elemzéshez metszeteket készítünk, hacsak az eltérést külön nem említjük. A normális koronáriaereket, amelyeket nem hoztunk érintkezésbe az artériás nyomással, és nem graftoltak, használjuk összehasonlítási alapnak.

A normális vénák, amiket nem hoztunk érintkezésbe az artériás nyomással, és nincsenek graftolva, nem mutatnak megvastagodott perivaszkuláris szövetet, egy perivaszkuláris teret kis mennyiségű kötőszövettel és laza zsírszövettel, és egy vékony, nem megtört közeget, amint azt a 2a. ábrán bemutatjuk (Verhoeff festék). A graftok vénarészei a perivaszkuláris szövet növekedését mutatják, amely gallérként veszi körül a közeget, nagy mennyiségű granulációs szövettel. Ezt Verhoeff festéssel mutattuk ki, amint az a 2b. ábrán látható. Ugyanez a metszet intakt és meg nem tört közeget mutat, amelyben nincs darabolás. Néhány metszetben neointima figyelhető meg a sebészeti beavatkozás után 8–14 nappal.

A normális vénák, amiket nem hozunk érintkezésbe az artériás nyomással, és nincsenek graftolva, kis mennyiségű laza perivaszkuláris és közegfestődést mutatnak Sirrius vörös festékkel, amint az a 3a. ábrán látható. Ezzel ellentétben a graftok vénarészei megnövekedett kollagénlerakódást mutatnak a perivaszkuláris szövetben, már a nyolcadik napon. Nagy mennyiségű sűrű perivaszkuláris kollagént festünk Sirrius vörös festékkel, ami a fibrilláris kollagénre (beleértve az I-es és III-as típust is) specifikus festék, amint az a 3b. ábrán látható. A közeg gyengébb festődést mutat, mint a perivaszkuláris szövet. A neointimás metszetekben a kollagén világosan jelen van.

A normálvénák, amiket nem hozunk érintkezésbe az artériás nyomással, és nincsenek graftolva, nem mutatnak α-aktint a perivaszkuláris és adventiciarétegekben, α-aktin ellenanyagokat használva. Csak a közegben levő simaizomsejtek mutattak pozitív α-aktinfestődést, amint az a 4a. ábrán látható. Ezzel ellentétben a graftok vénarészei fokozott α-aktinszintézist mutattak a közegben és az adventiciában. Az α-aktin nagy mennyisége a közegben az α-aktinra specifikus ellenanyagokkal festődnek, amint az a 4b. ábrán látható. A közegben való festődés olyan simaizomsejtek jelenlétét mutatja, amelyek α-aktint szintetizálnak a közegben. Az adventicia is mutat α-aktinfestődést, mutatva, hogy a miofibroblasztok α-aktint szintetizálnak. A perivaszkuláris szövet is mutat valamennyi α-aktinfestődést.

A vénákat desminre is megfestettük, amit a vaszkuláris simaizomsejtek expresszálnak, antidesmin ellenanyagok felhasználásával. Egy normális véna, amit nem hozunk érintkezésbe artériás nyomással, és nincs graftolva, csak a közegben mutat desminfestődést, amint az a 4c. ábrán látható. Hasonlóképpen a vénás graftok vénarészei csak a közegekben mutatják a simaizomsejtek desminfestődését. A közegekben nagy mennyiségű simaizomsejt festődik pozitívan desmin ellenanyaggal (nem közölt adatok). Nem figyelhető meg desminfestődés a perivaszkuláris szövetben vagy az adventiciában, jelezve ezzel, hogy az α-aktint szintetizáló sejteknek két populációja van: az egyik populáció a közegben található (simaizomsejtek; desminpozitívak, α-aktinpozitívak), a másik populáció az adventiciában található (fibroblasztok és miofibroblasztok; desminnegatív, α-aktinpozitív).

A graftok vénarészei a sejtszaporodás növekedését mutatják a közegekben és a perivaszkuláris szövetben. A közegekben és a perivaszkuláris szövetben nagyszámú szaporodó sejt festődik a szaporodó sejt sejtmag antigénre (PCNA) specifikus ellenanyagokkal, ami a sejtszaporodás jelzője, amint az az 5a. ábrán látható. Összehasonlítás céljából egy hasonló metszetet festettünk Verhoff festékkel (5b. ábra) és Sirrius vörös festékkel (5c. ábra). Ebben a metszetben korai neointimaképződés figyelhető meg az 5b. ábrán, egy vékony sötét rétegben, a graftolt véna lumenéből néhány sejt vastagságban. A neointima normális esetben nem található meg a vénában. A perivaszkuláris szövetben a közeghez viszonyítva erősebb kollagénfestődés sokkal nyilvánvalóbb erősebb nagyításnál, amint az az 5c. ábrán látható. A PCNA-festődést mennyiségileg is értékeljük: a graftolt sejtek 30%-a pozitívan festődik PCNA-ra, míg a nem graftolt vénákban a sejteknek kevesebb mint egy százaléka festődik pozitívan PCNA-ra.

Ezek az eredmények megerősítik a fibroblasztok, miofibroblasztok és simaizomsejtek extracelluláris mátrixtermelésének növekedését a kötőszövetben és a magas artériás nyomásra reagáló graftolt vénák érfalában. A szövet vastagodásának és a sejtszaporodásnak a növekedése a véna körül, beleértve a kötőszövetet a perivaszkuláris térben (hegképződés), megakadályozhatja a véna előnyös kitágulását az artériás vérnyomásra adott válaszként.

Az extracelluláris mátrixtermelődés, azaz például a kollagénszintézis gátlását a vaszkuláris sejtekben (azaz például a simaizomsejtekben és fibroblasztokban) specifikusan bemutatjuk a 6., 9. és 13. példákban.

2. példa

Humán arterializált véna – az arteriovénás graftok átjárhatósága elvesztésének modellje

Ahhoz, hogy igazoljuk az extracelluláris mátrix termelődésének növekedését, mint a véna arterializálódásának következményét emberekben, tanulmányoztuk a bypassműtétekből származó arterializálódott humán vénákat. Az emberekből származó eredmények meglepőek, mivel lényegében nem mutatható sejtszaporodás, azonban jelentős kollagénfestődés van az érfalban.

A humán rózsaereket, amelyek aortokoronáriás bypassgraftként szolgáltak, eltávolítottuk a betegekből, körülbelül két évvel azután, hogy okklúziót lehetett diagnosztizálni. Az artériás véráramlás a vénát normális artériás nyomásnak teszi ki. Az aortokoronáriagraftok vénarészeiből metszeteket készítünk a további hisztológiai elemzéshez.

Az aortokoronáriás graftok humán vénarészei növekedést mutatnak a perivaszkuláris szövetben és a neointimális vastagságban. Ezt Verhoeff festéssel lehet kimutatni, amint azt a 6a. ábrán bemutatjuk. Meg kell jegyeznünk, hogy a megvastagodott neointima helyettesíti a közeget, és a véna elveszti átjárhatóságát. Ez a bizonyos véna részlegesen összecsapzódott, a véna belső átmérőjének eltűnése miatt. Ezzel ellentétben a normál humán rózsaér, amely nincs kitéve arté-

riás nyomásnak, és nincs graftolva, nem mutat megvastagodott perivaszkuláris szövetet, és egy vékony, nem sérült és nem hasadt közeget mutat (nem közölt adatok).

Az aortokoronáriás graftok humán vénarészei is nagy mennyiségű kollagént mutatnak a perivaszkuláris szövetben és a közegben. Nagy mennyiségű kollagén festődik pozitívan Sirrius vörös festékkel, amely a fibrilláris kollagénnek (beleértve az I-es és III-as típust is) egy specifikus festéke a perivaszkuláris szövetben és közegben, amint az a 6b. ábrán látható.

A graftok humán vénarészei kis mennyiségű α-aktint mutatnak a neointimában, nincs α-aktin a perivaszkuláris szövetben, kivéve a pozitív festődést a vasa vasorumban, az α-aktinra specifikus ellenanyagokkal, amint az a 6c. ábrán látható. A festődés hiánya a közegben és a perivaszkuláris szövetben azt mutatja, hogy kevés sejt termel α-aktint. Ahelyett, hogy α-aktinra pozitívnak festődnének, ezek a metszetek, amint az a 6b. ábrán látható, erősebben festődnek kollagénre, jelezve ezzel, hogy a hegszövet kitöltötte mind a perivaszkuláris szövetet, mind az érfalat.

Az arteriovénás graftok humán vénarészei nem mutatnak sejtszaporodást a közegben és a perivaszkuláris szövetben. A közegben és a perivaszkuláris szövetben egyetlen sejt sem festődik a szaporodó sejtmagantigénre (PCNA) specifikus ellenanyagokkal, ami a sejtszaporodás jelzője, amint az a 6d. ábrán látható. Még 25-szörös nagyítás mellett is csak nagyon kevés megfestődött sejt található. A PCNA-festődést mennyiségileg is meghatároztuk, és megállapítottuk, hogy a graftolt humán vénákban a sejteknek kevesebb mint 1 százaléka festődött meg PCNA-ra.

3. példa

Humán és sertésvéredény-szervtenyészetek – az oligonukleotid nem luminális bejuttatása hatékonyságának és a sérülésre adott érválasz gátlásának modellje

Ahhoz, hogy igazoljuk egy, a találmány szerinti oligonukleotid hatékonyságát az extracelluláris mátrix termelődése és az arteriovénás sönt- vagy bypasseljárások utáni vaszkuláris romlás csökkentésében, először egy szervtenyészetmodellt fejlesztettünk ki. Ez a modell lehetővé teszi az oligonukleotidfelvétel követését, a vaszkuláris sejtek serkentését vérlemezke-eredetű növekedési faktor B-lánccal (a továbbiakban ezt mint „PDGF" említjük) és a vaszkuláris PDGF-fel való serkentése gátlását a találmány szerinti oligonukleotidokkal.

A sertésér-szervtenyészeteknél a belső emlő vagy karotid artériákat vágjuk ki (n=3), majd körülbelül 5–15 mm vastag gyűrűkre vágjuk. A gyűrűket szervtenyésztési körülmények között tartjuk különböző ideig, amint azt az alábbiakban közöljük. A humán érmodellben rózsaereket vágunk ki bypassműtéten áteső betegekből. Miután teljes a kivágás, a nem használt vénaszegmenseket körülbelül 515 mm vastag gyűrűkre vágjuk.

Hogy megbecsüljük a *c-myc* oligonukleotidok hatását a sejtszaporodásra, sertés-vaszkulárisgyűrűket inkubálunk 37 °C-on szérummentes közegben (DMEM, azaz Dulbecco-féle módosított Eagle-féle közeg, kiegészítve antibiotikumokkal és 1% Neutrodomával) négy napig 100 ng/ml PDGF-fel vagy anélkül, hacsak az eltérést külön nem jelezzük. A PDGF normális esetben serkenti a vaszkuláris sejteket, azaz például a simaizomsejteket és a fibroblasztokat, hogy szaporodjanak, és ismert, hogy vérlemezkék bocsátják ki a szövet sérülése után, hogy ezzel elősegítsék a seb gyógyulását. A PDGF-fel indukált sejtszaporodást PCNA-festődéssel mérjük, amint azt az alábbiakban ismertetjük. Még négy nap elteltével is megtartották a gyűrűk a morfológiájukat.

A sertésvérerek reagáltak a PDGF-serkentésre a szervtenyészetben. A sertésvérerek a szervtenyészetben PCNA-ra festődő sejteket mutatnak az adventiciában és a közegben, amint az a 7a. ábrán látható. A barna sejtmagfestődés PCNA-ra festődött sejteket jelent, míg a bíborszínűre festődött sejtek hematoxilinnel és eozinnal, mint ellenfestékkel festődtek. A PCNA-ra pozitívan festődő sejtek százaléka 15±5 százalék (n=3). A kontroll, csak szérummentes közegben, PDGF nélkül inkubált vérerek nem mutattak jelentős festődést. A sejteknek kevesebb mint egy százaléka festődött PCNA-ra, amint az a 7b. ábrán látható.

A találmány szerinti oligonukleotidok gátolják a sertésér-szervtenyészet PDGF-fel indukált serkentését. Oligonukleotid 16 μmol/l koncentrációban való hozzáadása (1. számú szekvencia) gátolja a PDGF-fel indukált szaporodást, amint az a 7c. ábrán látható. Az oligonukleotiddal való négynapos inkubálás után a PCNA-festődés a sejtek 2±2 százalékára vonatkozott (n=3; P<0,001, azzal szemben, ha csak a PDGF-et alkalmazzuk).

Azzal a céllal, hogy elérjük az oligonukleotid diffúzióját humán vénák érfalába, humán rózsaeret inkubáltunk az oligonukleotiddal. A találmány szerinti oligonukleotidok gyorsan diffundálnak a humán érszervtenyészetbe. A molekula végén fluoreszceinnel jelzett oligonukleotid (1. számú szekvencia) 100 μmol/l-ben való hozzáadása a szervtenyészet közegéhez a jelzett oligonukleotid gyors, időtől független diffúzióját okozza a humán vénákba 2 másodperces (szobahőmérsékleten), 30 perces (37 °C), 1 órás (37 °C) és 3 órás (37 °C) inkubációs idővel, amint az a 8a–8d. ábrákon látható. A jelzett oligonukleotidok mind a vénák luminális felszínén, mind a perivaszkuláris felszínén átdiffundálnak. Az oligonukleotidok bizonyos idő elteltével lokalizálhatók mind a sejtekben, mind a sejtmagokban. A kontroll humán vénák, amiket oligonukleotid nélkül inkubálunk, csekély autofluoreszcenciát mutatnak, még akkor is, ha 2-3-szor hosszabb ideig inkubáljuk, mint az oligonukleotiddal inkubált vénákat.

Ezek az adatok összhangban vannak azzal, hogy a találmány szerinti oligonukleotidok gátolják a vaszkuláris sejtek PDGF-fel indukált serkentését az érfalban. Ezek az adatok igazolják emellett az oligonukleotid bejuttatásának hatékonyságát a vérerek perivaszkuláris szövetéből, az oligonukleotidok luminális bejuttatásának alkalmazásával szemben. Pontosabban, az oligo-

nukleotidnak a perivaszkuláris szövetből való bejuttatása használható *ex vivo* arra a célra, hogy az oligonukleotidokat bejuttassuk a vénás graftokhoz használt kivágott vénákba és graftokba, valamint más típusú vaszkuláris graftokba. Emellett a perivaszkuláris szövet kezelhető *in vivo* a találmány szerinti oligonukleotidokkal, lehetővé téve az oligonukleotid transzferét az érfalba, azzal a céllal, hogy megakadályozzuk az érfal és a perivaszkuláris szövet vastagodását.

4. példa

Két in vivo *sertésmodell igazolja a perivaszkuláris oligonukleotid bejutását*

Azzal a céllal, hogy igazoljuk a találmány szerinti oligonukleotidok perivaszkuláris bejuttatásának hatékonyságát, két *in vivo* sertésmodellt vizsgálunk. Az első modellben a sertés combcsonti vénát műtétileg feltárjuk, majd oligonukleotidot injekciózunk köré a perivaszkuláris szövet kötőszövetébe. A második modellben nem végzünk műtétet, és a sertésvénák körül levő kötőszövetet perkután beinjekciózzuk az oligonukleotiddal. Ezek a modellek lehetővé teszik az oligonukleotidfelvétel ellenőrzését a beadás után, a következő módszerekkel:

1. perivaszkuláris injekció az arteriovénás graft készítése előtt vagy után, de a műtét helyének bezárása után, vagy
2. perkután injekció a perivaszkuláris szövetbe, ha a műtét után ismételt beadásra van szükség.

A fluoreszceinnel végjelzett oligonukleotidokat (1. számú szekvencia) 100 μmol/l koncentrációban (10 mg) injekciózzuk mindkét modellben, egy 22-es tű alkalmazásával.

Az *in vivo* oligonukleotidfelvétel gyors az oligonukleotid közvetlen, perivaszkuláris alkalmazása után a műtétileg feltárt vénába. A fluoreszcencia megfigyelhető az érben és a perivaszkuláris szövetben található sejtek magjaiban harminc percen belül (nem közölt adatok) és két óra elteltével (9a. ábra), jelezve ezzel, hogy az oligonukleotidok átdiffundáltak az érfal diffúziós gátjain és a perivaszkuláris szöveten.

Az *in vivo* oligonukleotid felvétele a perkután injekció után is gyors. A fluoreszcencia megfigyelhető az érben és a perivaszkuláris szövetben található sejtek magjaiban harminc percen belül (nem közölt adatok) és két óra elteltével (9a. ábra), jelezve ezzel, hogy az oligonukleotidok átdiffundáltak az érfal diffúziós gátjain és a perivaszkuláris szöveten.

Ezek az eredmények igazolják, hogy a perivaszkuláris bejuttatás a találmány szerinti oligonukleotidoknak a graftokba való bejuttatásának eszköze lehet, pontosabban, az oligonukleotid perivaszkuláris bejuttatásának az arteriovénás és vénás graftokba. Általában az oligonukleotidokat az itt bemutatott módon lehet beinjekciózni, vagy az oligonukleotidok más eszközökkel is bejuttathatók, azaz például olyanokkal, amelyek lehetővé teszik az oligonukleotid eljuttatását a perivaszkuláris szövetbe; ilyenek például a beültethető tárolók, a lassú kibocsátású gélek és mátrixok és az oligonukleotiddal impregnált szövet vagy eszköz, azaz például a PTFE-cső, amint azt az alábbiakban tárgyaljuk. A perivaszkuláris bejuttatási módoknak ezek a típusai használhatók arra, hogy a találmány szerinti oligonukleotidokat beadjuk azzal a céllal, hogy megakadályozzuk a perivaszkuláris szövet vagy érfal vastagodását az arteriovénás graftokban, különösen a hemodialízisbetegeknél használt hemodialízis-hozzáférési helyek vénás részében. A perkután injekciók sikere mutatja az oligonukleotidok egy arteriovénás graftokba való ismételt bejuttatásának hatékonyságát, különösen a hemodialízisbetegeknél használt hemodialízis-hozzáférési helyekbe. Amellett, hogy sikertelen oligonukleotidbejutás figyelhető meg a vénák perivaszkuláris oldalára, az artériákba való luminális bejuttatást is bemutatjuk a 8., 18. és 19. példákban.

5. példa

Hemodialízis-hozzáférési hely klinikai protokollja

Azokat a betegeket, akiknek első ízben, vagy már tönkrement hemodialízis-hozzáférési helyek pótlására hemodialízis-hozzáférési helyet alakítunk ki, a találmány szerinti oligonukleotidokkal kezeljük. Mind a PTFE típusú, mind a Brescia–Cimino-fisztulákat kezeljük.

A betegek az 1., 5. vagy 6. számú szekvenciának megfelelő oligonukleotidokat kapnak. Az oligonukleotidok foszforotioát- vagy amidátkötéseket tartalmaznak. A foszforotioátkötéseket tartalmazó liofilezett oligonukleotidokat egy, az alábbiakban ismertetett pufferben szuszpendáljuk. A foszforotioát- vagy amidátkötéseket tartalmazó oligonukleotidokat az alábbiakban ismertetett eljárásokkal szintetizáljuk, és steril körülmények között tartjuk. A különböző szekvenciájú oligonukleotidokat külön adjuk be, és a betegek csak egy szekvenciát kapnak a kezelés során.

A betegeknek 1–10 oligonukleotidot adunk be a hemodialízis-hozzáférési hely kialakítására végzett műtét során. Az oligonukleotidokat az arteriovénás sönt vénás oldalára injekciózzuk a perivaszkuláris szövetbe, standard 22-es vagy kisebb tűt használva. Az injekció beadása után befejezzük a műtétet. A betegeket ismételten, hetenként kezeljük 1–10 μg oligonukleotiddal, perkután injekció formájában, hat hónapig. Azoknál a betegeknél, akiknél nehezen lehet kitapintani a vénákat, a perkután injekciókat szonogramok felhasználásával vezetjük. Egyébként az injekciókat az arteriovénás söntterület, pontosabban a sönt vénás részének tapintásával irányítjuk.

A betegeknél az első évben követjük a hemodialízis-hozzáférési hely funkcionális átjárhatóságát. A hemodialízis-hozzáférési helyről a szonogramokat vagy angiogramokat 1 hét, valamint három, hat és tizenkét hónap elteltével vesszük fel.

A kezeléshez használt oligonukleotidot az alábbiakban ismertetett módon, és a szakterületen ismert módon választjuk ki és szelektáljuk. Az ebben és egyéb példákban tárgyalt tárgyalt szekvenciákat és módszereket nem tekintjük a találmány oltalmi köre korlátozásának, hanem csak a találmány specifikus megvalósítási módjának. Más oligonukleotidoknak csak az alábbiakban ismertetett struktúrákkal kell összhangban len-

nie. Nem szükséges, hogy az oligonukleotidok az alábbiakban javasolt hatásmechanizmussal működjenek, mindaddig, amíg az oligonukleotidok előnyösen működnek az *in vitro* és *in vivo* modellekben.

6. példa

A kollagén szintézisének gátlása humán simaizomsejtekben

Ebben a példában kollagénszintézist végző, explantált humán simaizomsejteket *c-myc* vagy *c-myb* antiszensz oligonukleotidokkal kezelünk, majd a kezeletlen és/vagy az „értelmes szállal" kezelt kontrollokkal hasonlítjuk össze.

A humán simaizomsejtek (SMC-k) rutin bypass műtéten áteső betegek rózsaeréből származnak. A sejteket explantummódszerrel izoláljuk. Az explantumokat szövettenyésztő edényekbe tesszük, amelyek 20% hővel inaktivált borjúmagzatszérummal (FBS), 100 NE/ml penicillinnel, 100 μg/ml sztreptomicinnel és 2 mmol/l glutaminnal kiegészített Dulbecco-féle módosított Eagle-közeget (DMEM) tartalmaznak. A tenyészeteket 37 °C-on tartjuk egy nedvesített, 5% CO_2-ot tartalmazó inkubátorban. A sejtek a vaszkuláris simaizomsejtek tipikus morfológiai jellemzőivel rendelkeznek, azaz orsó alakúak és hegy-völgy a mintázatuk. A vaszkuláris simaizomsejtek azonosítását *in situ* végzett simaizom α-aktinfestéssel végeztük. A sejteket összenövésig szaporítjuk, majd minden 7. napon átoltjuk. Csak a 3. vagy 4. átoltás utáni humán simaizomsejteket használjuk a kísérletekben.

A kísérleteket egybenövés előtti és egybenövés utáni simaizomsejtekkel végezzük. A sejteket 10 000/cm^2 (egybenövés előtti) vagy 25 000 cm^2 (egybenövés utáni) állapotban szélesztjük, CM–20-szal kiegészítve. Három nappal a szélesztés után friss CM–20-at adunk hozzá, ami 50 μg/ml aszkorbinsavat tartalmaz. A különböző kísérletekben az alábbi oligonukleotidokat adjuk 16 μmol/l koncentrációban a tenyészetekhez:
antiszensz
(5'-AACGTTGAGG GGCAT) (1. számú szekvencia);
értelmes szál oligomer
(5'-ATGCCCCTCA ACGTT) (2. számú szekvencia);
4 bázispárnál helytelenül illeszkedő oligomer
(5'-AACGTGGATT GGCAG) (3. számú szekvencia);
összekevert szekvenciájú oligomer
(5'-GAACGGAGAC GGTTT) (4. számú szekvencia);
vagy *c-myb* antiszensz
(5'-TATGCTGTGC CGGGGTCTTC GGGC) (5. számú szekvencia).

Huszonnégy órával később a tenyésztő táptalajt Western-blot-készítéshez összegyűjtjük, a sejtekből pedig RNS-elemzést végzünk. Az egyes kísérletekben tripánkék kizárási vizsgálatokat végzünk.

A kollagént az alábbiak szerint mérjük: mind pepszinnel kezelt (az I-es típusú kollagén tripla helikális része), mind pepszinnel nem kezelt mintákat Western-blot-elemzésnek vetünk alá, a kollagén mérése céljából. Röviden, a mintákat 4 °C-on éjszakán át inkubáljuk pepszinnel (1 mg/ml) és ecetsavval (0,5 mol/l). A minták azonos térfogatú aliquot részeit azután vákuumcentrifugával töményítjük, majd a mintákat SDS gélfelvivő pufferben oldjuk (50 mmol/l TRIS-HCl, pH=6,8, 100 mmol/l ditiotreitol, 2% SDS, 0,1% bróm-fenolkék és 10% glicerin), majd 10 percig forraljuk. Tíz percig 11 000×g-vel centrifugáljuk, majd a mintákat 7,5%-os SDS-poliakrilamid gélen elektroforetizáljuk és nitro-cellulóz-membránra visszük át. Blokkolóoldatban való inkubálás után a mintát tartalmazó szűrőmembránokat 1 óra hosszat szobahőmérsékleten biotinnal jelzett, humán kollagén I és III elleni primer ellenanyaggal inkubáljuk (Southern Biotech. SC.). A szűrőlapokat mossuk, majd tormaperoxidázzal jelzett sztreptavidinnel inkubáljuk. A reakciószubsztrát hozzáadása után a szűrőlapokat röntgenfilmre exponáljuk. A kísérleteket legalább kétszer megismételjük.

A kísérletekben használt simaizomsejtek mind 3-4 átoltáson estek át. Ezeknek a sejteknek a fenotípusát irreverzíbilisen szintetikusnak tartjuk, és ez különböző kóros állapotokkal áll kapcsolatban. Igazoltuk, hogy az érfalban az abnormális kollagénfelhalmozódást főleg ezek a szintetikus sejtek okozzák. Mind az összenövés utáni, mind az összenövés előtti simaizomsejtek I-es és III-as típusú kollagént termelnek, szérumserkentés hatására.

Az összenövés előtti simaizomsejtekben az I-es típusú kollagén szintézisében 80%-os csökkenés volt megfigyelhető *c-myc* antiszensz oligonukleotiddal való kezelés után, a kontrollal (nincs hozzáadott oligonukleotid) és a *c-myc* oligonukleotiddal való kezelést kapott sejtekkel összehasonlítva. Az egybenőtt simaizomsejtekben a Coulter számlálóban megszámlált sejtszámok hasonlóak mind a kontroll-, mind az antiszensz, mind az értelmes szállal kezelt sejtekben. A sejtek életképessége 97%, 96% és 95% a kontroll-, az antiszensz és az értelmes szállal kezelt sejtekben, tripánkék kizárási vizsgálat felhasználásával. Az I-es típusú kollagén nem mutatható a *c-myc* antiszensz oligonukleotiddal kezelt sejtekben. Az értelmes *c-myc* oligomerrel kezelt sejtekben a kontrollal összehasonlítva nincs különbség az I-es típusú kollagén szintjében. A tripla helikális típusú kollagént emésztés után mérjük, és az eredmények ugyanazt a trendet mutatják, mint a pepszinnel nem kezelt minták.

Az összenövés előtti simaizomsejtekben 80%-os csökkenés tapasztalható az I-es típusú prokollagén szintézisében, 16 μmol/l *c-myc* antiszensz oligonukleotiddal való kezelés után, a kontrollal (nincs hozzáadott oligonukleotid) és a *c-myc* értelmes oligonukleotidszállal kezelt sejtekkel összehasonlítva. A *c-myc* értelmes szálú oligonukleotidjával és a 4 bázispárban helytelenül illeszkedő oligonukleotiddal kezelt sejtekben nem csökken az I-es típusú kollagén szintje, a kontrollal (nincs hozzáadott oligonukleotid) összehasonlítva. Az I-es típusú kollagén szintjének csökkenése mind a szaporodó, mind az egybenövés utáni sejtekben azt sugallja, hogy a kollagén szintézisének gátlása független a sejtek növekedésének antiszensz vegyületekkel való gátlásától. Különböző dózisú (4, 8 és 16 μmol/l) antiszensz oligonukleotidok a prokollagén szintézisének dózisfüggő csökkenését okozzák. A különböző oligo-

nukleotidkezeléseket követően a sejtek életképessége összehasonlítható, amit egy tripánkék kizárási vizsgálattal lehet elemezni. A sejteknek több mint 90%-a életképes maradt mindegyik csoportban.

Az egybenövés utáni humán simaizomsejtekben a *c-myb* antiszensz oligonukleotid 16 μmol/l koncentrációban teljesen megszünteti az I-es típusú kollagén szintézisét. A kontroll- (oligonukleotiddal nem kezelt) sejtekben, valamint az összezavart szekvenciájú oligonukleotiddal kezelt sejtekben az I-es típusú kollagén szintje hasonló volt.

Ezeket az eredményeket megerősítik a 9., 13. és 17. példák.

7. példa

A kollagén szintézisének gátlása humán bőrfibroblasztsejtekben

Ebben a példában explantált humán bőrfibroblasztsejteket (humán FBC-k) kezelünk *c-myc* vagy *c-myb* antiszensz oligonukleotiddal, és összehasonlítjuk a kezeletlen és/vagy „értelmes szálú" oligonukleotiddal kezelt sejtekkel. A humán FBC-ket bőrátültetésen áteső betegekből nyerjük ki, és explantátummódszerrel izoláljuk. Az explantált FBC-ket az előzőkben a humán simaizomsejtekre ismertetett módszerekkel tenyésztjük, majd az antiszensz és kontrolloligonukleotidokat azonos módon alkalmazzuk. A kísérletekben a 3–10. átoltásból származó humán FBC-ket használjuk. A kollagén szintézisét a 6. példában ismertetett módon mérjük.

Az egybenövő humán FBC-ben a *c-myc* antiszensz oligonukleotidok (8 és 16 μmol/l) dózisfüggő módon csökkentik a prokollagén szintézisét. A *c-myc* antiszensz oligonukleotiddal, a 4 bázispáros helytelen illeszkedést tartalmazó oligonukleotiddal vagy az összezavart szekvenciájú oligonukleotiddal kezelt sejtek a kontrollsejtekhez (nincs hozzáadott oligonukleotid) hasonló I-es típusú kollagén fehérje szintet mutattak.

Ezeket az eredményeket tovább erősítik a 13. példa eredményei.

8. példa

A neointimaképződés csökkenése a koronária lecsupaszításának sertésmodelljében

A *c-myc* antiszensz vegyületeknek a neointimaképződés gátlására gyakorolt hatását úgy vizsgáljuk, hogy *cmyc*-specifikus antiszensz (1. számú szekvencia) és placebo (2. számú szekvencia) oligonukleotid foszforotioát oligonukleotidokat adunk be a koronáriaangioplasztika helyére egy standard sertésmodellben, szokványos protokollokat alkalmazva [Karas és munkatársai: J. Am. Coll. Card. *20,* 467–474 (1992); Schwartz és munkatársai: Circulation *82,* 2190–2200 (1990)]. Keresztezett házisertéseket *(Sus scrofa)* előzőleg begyógyszerezünk, a vizsgálat előtt 650 μg aszpirint adva be nekik orálisan. Az általános érzéstelenítés során 12 mg/kg ketamin- és 8 mg/kg xilazininjekciót kaptak az állatok. A további érzéstelenítőszert intravénásan adjuk be a kísérlet során. Miután a jobb külső karotid artériát műtétileg feltártuk, a sertéseknek 10 000 E heparint adunk be intravénásan, majd 10 mg nifedipint adunk be nekik a szájüregbe. Egy 8 French SAL 1 vezetőkatéter (Medtronic Intervantional Vascular, Inc., Danvers, MA) alkalmazásával a koronáriaostiát kanülözzük fluoroszkópiás vezetéssel. 100 μg nitroglicerin intrakoronáriás injekciózását követően, és a *c-myc* antiszensz oligonukleotid, valamint a placebo beadása előtt egy túlméretezett angioplasztiás ballont használunk (6–10 atmoszférára fújva) az artéria falai intimális és mediális rétegeinek felsértésére, az artéria méretének megfelelően, ami 2,0–3,5 mm között változik, majd háromszor egymás után 30 másodpercig az adott helyen tartjuk. Közvetlenül azután, hogy az angioplasztiás ballont eltávolítottuk, a koronáriás artériákba intramurális injekciókat adunk be (1 mg/ér), egy másik, porózus ballon alkalmazásával. Azt előzőleg meghatároztuk, hogy az intramurális gyógyszerbeadási mód biztonságos, ha az injekciós nyomás nem haladja meg a 4 atmoszférát, a perfuzátum térfogata 2 ml, és a ballon-artéria arány kb 1,4:1. A *c-myc* antiszensz (13 másolat) vagy a placebo (12 másolat) oligomereket 4 atmoszféra nyomással injekciózzuk, és a bejuttatás átlagosan 27 másodperc alatt játszódik le. Az oligomerek dózisa 1 mg per megsérült koronáriaartéria. Az oligomerek bejuttatásához nem kapcsolódik káros mellékhatás. Egy hónappal a bejuttatás után az állatokat leöljük, és morfometriával meghatározzuk a sérülés helyén a maximális neointimális területet (NA max.), a neointimális vastagságot (NT max.) és a maradék lument (RL). Az eredményeket (átlag ±SEM) az alábbi 1. táblázatban mutatjuk be.

1. táblázat

Oligomer (%)	Másolatok	Na max. (mm^2)	Mt max. (mm)	RL
Placebo ±6	12	0,80±0,17	0,48±0,09	64
Antiszensz ±5	13	0,24±0,06	0,20±0,04	81
p<0,05	<0,01	<0,01		

A 10. ábrán egy fénykép látható egy példaként megadott kontroll (azaz amely értelmes szálú oligomer injekciót kapott) koronáriaartéria metszetéről, egy hónappal a sérülés után. Jelentős neointimális vastagodás figyelhető meg (nyilak). A 11. ábrán egy fénykép látható egy példaként megadott, antiszensz oligonukleotiddal kezelt koronáriaartéria metszetéről. A neointima jelentős csökkenése figyelhető meg. Ha a maximális neointimális területet vizsgáljuk a sérülés mértékének függvényében (12. ábra), akkor a neointima és a

sérülés mértékszáma (azaz a sérülés súlyossága) közötti kapcsolatot bemutató regressziós egyenesek meredeksége jelentős eltérést mutat ($p<0,01$). Amint az a 12. ábrán látható, az antiszensz oligonukleotidok jelentősen csökkentik a neointima képződését, különösen az előrehaladott állapotú sérülések esetében.

9. példa

Az extracelluláris mátrix képződésének gátlása humán simaizomsejtekben, c-myc *oligonukleotid kezeléssel*

Ebben a példában tovább igazoljuk a *c-myc* antiszensz oligonukleotid kezelés hatékonyságát az extracelluláris mátrixfehérje, főleg az I-es és III-as típusú prokollagén humán simaizomsejtekben való szintézisének gátlásában. Az antiszenszkezelés jelentősen csökkenti az extracelluláris prokollagén szintet a serkentett humán simaizomsejtekben (20% FBS-sel kezelve).

A) A prokollagén I és prokollagén III mérése Western-blottal

Ahhoz, hogy még jobban meghatározzuk, hogy a *c-myc* antiszensz oligonukleotidok mennyire gátolják az extracelluláris mátrixfehérjék szintézisét, a prokollagén I-et és III-at humán simaizomsejtekben mérjük.

Mind az intracelluláris, mind az extracelluláris prokollagént (mind az I-es, mind a III-as típust) Western-blottal mérjük. A pihenő humán simaizomsejteket DMEM-közegben (Dulbecco-féle módosított Eagle-közeg) tartjuk fenn, 5% FBS-sel (borjúmagzatszérum). A humán simaizomsejteket oligonukleotidokkal vagy azok nélkül serkentjük 20% FBS-t és 50 μg/ml aszkorbinsavat tartalmazó közegben. Az FBS-ről ismert, hogy serkenti a prokollagén szintézisét a humán simaizomsejtekben. 20 órával az oligonukleotidok hozzáadása után a sejteket háromszor mossuk foszfáttal pufferelt sóoldattal (PBS), majd szérummentes közeget, amely 0,1% BSA-t, aszkorbinsavat és oligonukleotidokat tartalmaz, adunk a tenyészethez, további 4 órára. A kondicionált közeget (azaz a sejtekkel és az oligonukleotidokkal érintkező közeget) összegyűjtjük, és proteinázinhibitorokat, beleértve a fenil-metil-szulfonil-fluoridot (PMSF, 0,5 mmol/l) is, valamint pepsztatint (1 μg/ml) és leupeptint (1 μg/ml) adunk hozzá. A megfelelő sejtréteget háromszor mossuk hideg PBS-sel, majd 30 percig 4 °C-on lizáltatjuk SDS-PAGE mintafelvivő pufferrel, amely 62,5 mmol/l TRIS-HCl-ot (pH=6,8), 20% glicerint, 2% SDS-t, 5% β-merkaptoetanolt tartalmaz. A sejtlizátumokat azután 5 percig forraljuk, a proteinázok inaktiválása céljából, majd 10 percig 10 000/perc fordulatszámmal 4 °C-on végzett centrifugálás után összegyűjtjük a felülúszókat. A kiválasztott kísérletekben a sejteket 24 óráig folyamatosan inkubáljuk az oligonukleotidokkal 20% FBS-DMEM-ben, majd a tenyészközegből vett mintákat éjszakán át pepszines emésztésnek vetjük alá (0,1 mg/ml) 0,5 mol/l ecetsavban, 4 °C-on. Az egyedi mintákat tízszeresre töményítjük egy Microcon-30 oszlopon keresztül centrifugálva (Amicon, Beverly, MA), majd –20 °C-on tároljuk. Aliquot részeket 65 tömeg/térfogat %-os poliakrilamid-SDS géleken elektroforetizálunk, 4%-os felvivőrégiókkal. A frakcionált fehérjéket azután elektrotranszferáljuk PolyScreen PVDF-membránokra (DuPont NEN, MA), egy transzferpufferben, amely 192 mmol/l glicint, 25 mmol/l TRIS-t, 0,01% SDS-t és 20% metanolt tartalmaz. A blotokat 5%-os zsírmentes tejben blokkoljuk, majd az I-es típusú kollagén ellen készített ellenanyagokkal (biotinnal jelzett poliklonális ellenanyag, Southern Biotechnology Associates, Inc. AL) és III-as típusú kollagén elleni (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) ellenanyagokkal inkubáljuk 2,5% BSA-ban. A membránokat háromszor mossuk PBST-vel (0,1% Tween 20-at tartalmazó PBS), majd biotinilezett szekunder ellenanyagokkal inkubáljuk a (III-as típus esetében). A blotokat mossuk, majd 30 percig sztreptavidin-peroxidáz-konjugátummal inkubáljuk (Boehringer Mannheim, Németország). A mosás után a blotokat Renaissance kemilumineszcencia reagenssel (DuPont NEN, MA) inkubáljuk 10 másodpercig, és Kodak X-Omat filmre exponáljuk 0,5–2 percig. A kapott fluorográfokat lézerdenzitometriával elemezzük (Pharmacia LKB Biotechnology, Inc., Piscataway, NJ).

Az 1. számú szekvenciának megfelelő *c-myc* antiszensz oligonukleotidokat használjuk az összes példában, hacsak az eltérést külön nem jelezzük.

B) Az extracelluláris prokollagén I és prokollagén III szekréció gátlása *c-myc* antiszensz oligonukleotidokkal

A prokollagénszinteket egybenövés utáni, azaz a sűrűség által leállított állapotban levő simaizomsejtekben határozzuk meg azért, hogy minimalizáljuk a kísérleti alcsoportok közötti eltérő növekedési sebességek hatását. Az extracelluláris prokollagén I és az extracelluláris prokollagén III jelentős csökkenése figyelhető meg a kondicionált közegben a *c-myc* antiszensz oligonukleotid kezelést követően, amint az a Western-bloton látható (13. ábra). Ez a hatás nem függ a koncentrációtól 4–16 μmol/l tartományban, és már 3 órával azután fellép, hogy a simaizomsejteket *c-myc* antiszensz oligonukleotidokkal inkubáljuk (nem közölt adatok).

Az extracelluláris prokollagén I-nek az oligonukleotidokkal való kezelés utáni csökkenését β-amino-propionitril hozzáadása nem befolyásolja, ami kizárja, hogy a kollagénben az antiszensz oligonukleotid által elősegített keresztkötések alakulnak ki (nem közölt adatok).

C) Az 1-es, 2-es és 3-as exonok elleni *c-myc* antiszensz foszforotioát oligonukleotidok hatékony inhibitorai az extracelluláris mátrixfehérjék szintézisének

Hogy tovább igazoljuk a *c-myc* antiszensz oligonukleotidok szekvenciaspecifikus hatását, a simaizomsejteket számos kontrollszekvenciával kezeljük, beleértve az értelmes szálú, 4 bázispárban helytelenül illeszkedő és az összezavart szekvenciájú oligonukleotidokat (a továbbiakban foszforotioát oligonukleotidokat használunk, hacsak az eltérést külön nem említjük). Hatásukat a prokollagén I szintjére a kondicionált közegben a *c-myc* mRNS különböző régiója elleni három anti-

szensz szekvencia hatásával hasonlítjuk össze. Amint az a 14. ábrán látható, az extracelluláris prokollagén I szintjének következetes csökkenését a különböző antiszensz oligonukleotidokkal való kezelés után figyelhetjük meg, míg a kontrollszekvenciáknak nincs meg ez a hatásuk.

III. táblázat

A szekvencia azonosító száma	Oligonukleotidszekvencia (5'–3')	A humán c-myc nukleotid lokalizációja; az oligonukleotid típusa
1.	AACGTTGAGG GGCAT	559–573; antiszensz
2.	ATGCCCCTCA ACGTT	559–573; értelmes
3.	AACGTGGATT GGCAG	559–573; négy rosszul illeszkedő bázis
4.	GAACGGAGAC GGTTT	kevert szekvencia
5.	TATGCTGTGC CGGGGTCTTC GGGC	c-myb; antiszensz
6.	GGGAGAGTCG CGTCCTTGCT	400–419; antiszensz
7.	TCATGGAGCA CCAGGGGCTC	1264–2383; antiszensz

D) Az extracelluláris fibronektin és a sejtmag *c-myc* fehérje immunprecipitációja

Ahhoz, hogy meghatározzuk az oligonukleotidok hatását az extracelluláris fibronektin és a *c-myc* fehérje szintézisére, egybenövés utáni simaizomsejteket inkubálunk 4 óra hosszat oligonukleotidokkal vagy azok nélkül, metioninmentes közegben. Ezután [^{35}S]-metionint (25 μCi/ml, DuPont NEN, MA) adunk hozzá 16 órára, majd a sejtszámokat egy Coulter számlálóban határozzuk meg. Az extracelluláris fibronektint a kondicionált közegben és a *c-myc* fehérjét a sejtmagkivonatokban immunprecipitációval mérjük, metabolikus jelzés után.

A kondicionált közeget a proteinázinhibitorok hozzáadása után gyűjtjük össze, majd az azonos beütésszámot tartalmazó aliquot részeket fibronektin elleni ellenanyagokkal (Becton Dickinson, Bedford, MA) inkubáljuk 4 óra hosszat, majd *Staphylococcus* protein A akrilamid gyöngyökkel inkubáljuk további 2 óra hosszat. A centrifugálás után az üledéket háromszor mossuk, SDS-PAGE mintafelvivő pufferben 5 percig forraljuk, majd 6%-os poliakrilamid-SDS gélen elektroforetizáljuk. A jelzett sejtrétegeket a jelzés után háromszor mossuk hideg PBS-sel, majd 0,1% NP–40, 10 mmol/l TRIS (pH=7,9), 10 mmol/l $MgCl_2$, 15 mmol/l nátrium-klorid, 5 mmol/l EDTA, 1 mmol/l PMSF, 1 μg/ml leupeptin és 1 μg/ml pepsztatin összetételű oldatban lizáltatjuk.

Az extracelluláris fibronektin vizsgálattal párhuzamosan a sejtmagokat centrifugálással extraháljuk, a szakterületen eddig még ismeretlen eljárások alkalmazásával. A sejtmagkivonatokban a fehérje koncentrációját megmérjük, és az 500 μg fehérjét tartalmazó aliquot részeket anti-*c-myc* ellenanyaggal (pan-*myc;* G. I. Evan ajándéka) inkubáljuk 12 óra hosszat, majd újabb két óra hosszat *Staphylococcus* protein A akrilamid gyöngyökkel inkubáljuk. Mosás után a gyöngyöket kinyerjük és SDS-PAGE mintafelvivő pufferben forraljuk, és a vízoldható frakciót SDS-PAGE-val elektroforetizáljuk. A gélt megszárítjuk és Kodak-Omat filmre exponáljuk –70 °C-on, 5–7 napig.

E) Az extracelluláris fibronektinszint nem változik a *c-myc* antiszensz oligonukleotidokkal való kezelés hatására, míg a *c-myc* fehérje szintek csökkennek

Hogy még tovább biztosítsuk, hogy az oligonukleotidok nem okoznak egyéb változásokat a simaizomsejtek funkciójában, a sejtmembrán integritására, a sejt metabolizmusára és a kollagén szintézisének vagy lebomlási bioszintézis útjának génjei indukciójával kapcsolatban álló vizsgálatokat hajtottunk végre.

A humán simaizomsejteknek vizsgáltuk a sejtmembrán-integritását, tripánkékfesték felhasználásával. A különböző oligonukleotidokkal (16 μmol/l koncentrációban) végzett kezelés után a sejteknek több mint 50%-a maradt életképes, a tripánkék kizárási technika alkalmazásával.

Ahhoz, hogy meghatározzuk a teljes fehérjeszintézist, a kondicionált közeg aliquot részeit 10%-os klór-ecetsavval (TCA) csapjuk ki 4 °C-on 30 percig, majd az üledékeket kétszer mossuk 5% TCA-val. Az üledékeket Solvable™-ben (DuPont NEN, MA) oldjuk, majd a beépült radioaktivitást egy szcintillációs számlálóval mérjük (Pharmacia LKB Biotechnology Inc. Piscataway, NJ). A teljes fehérjeszintézis, ami az alábbiakban ismertetett módon a [^{35}S]-metionin beépülésével mérhető, összehasonlítható az antiszensz oligonukleotidokkal (1. számú szekvencia) vagy azok nélkül inkubált simaizomsejtekben (16. ábra). Meg kell jegyeznünk, hogy a 20% FBS-sel serkentett sejtekben megnövekedett a fehérjeszintézis, a csak 0,5% FBS-sel kezelt sejtekkel összehasonlítva. A *c-myc* antiszensz oligonukleotiddal végzett kezelés nem csökkenti a fehérjeszintézist az értelmes szálú, összekevert szekvenciájú oligonukleotidokkal végzett, valamint oligonukleotid nélkül végzett kezeléssel összehasonlítva.

Emellett a kondicionált közegben a prokollagén I szintje visszaáll a kontrollszintre 24 órával a *c-myc* antiszensz oligonukleotidokkal végzett kezelés után (17. ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az antiszensz oligonukleotidok (1. számú szekvencia) az extracelluláris prokollagén szelektív, de reverzíbilis

csökkenését okozzák, megőrizve a vaszkuláris simaizomsejtek normális metabolikus aktivitását.

Mivel az antiszensz oligonukleotidok indukálhatják nem megcélzott gének expresszióját, ezért a *c-myc* antiszensz oligonukleotidokkal való kezelés után meghatározzuk a kollagenolitikus aktivitást és az interferon-γ-szintet, hogy kizárjuk ezeket az aspecifikus hatásokat.

Az összenövés utáni simaizomsejteket szérummentes közegben inkubáljuk, oligonukleotidokkal vagy azok nélkül. A közeg aliquot részeit 24 órával később gyűjtjük össze. A mátrix metalloproteináz aktivitásokat a metalloproteináz szöveti inhibitor ditiotreitollal és jód-acetamiddal való szelektív roncsolás után határozzuk meg. A humán simaizomsejtek által termelt latens kollagenázokat amino-fenil-higany-acetáttal aktiváljuk, majd I-es típusú kollagénnel vagy zselatinnal inkubáljuk, és a hasítási termékeket SDS-PAGE alapján becsüljük fel [D. D. Dean és munkatársai: J. Clin. Invest. *84,* 678–685 (1989); P. E. Desrochers és munkatársai: Journal of Biological Chemistry *267* 5005–5012 (1992)], amely publikációkat a továbbiakban referenciaként kezelünk. A metalloproteinázokat SDS-szubsztrát gélelektroforézissel jellemezzük (azaz például zymográfiával) nem denaturáló körülmények között, vagy β-kazein vagy zselatin, mint szubsztrát felhasználásával. Az I-es típusú kollagénnel és zselatinnal szembeni összehasonlítható kollagenázaktivitás mutatható ki kontroll-, értelmes szálú és antiszensz oligonukleotiddal (1. számú szekvencia) kezelt simaizomsejtek kondicionált közegéből (nem közölt adatok), sugallva ezzel, hogy a *c-myc* antiszensz oligonukleotidok nem fokozzák az endogén kollagenolitikus aktivitást.

Annak meghatározására, hogy a *c-myc* interferon-γ-t, ami az I-es típusú kollagén szintézisének hatékony gátlószere, indukáljuk-e véletlenül, az interferon-γ-t mérjük a tenyésztőközegben és a humán simaizomsejtekben. Az interferon-γ nem mutatható ki a kondicionált tenyésztőközegben és a sejtlizátumokban, *c-myc* antiszensz oligonukleotidokkal (1. számú szekvencia) való inkubálás után, ELISA-módszer alkalmazásával.

11. példa

A c-myc *antiszensz oligonukleotidnak nincs hatása a prokollagén $A_1(I)$, $A_2(I)$ és $A_1(III)$ mRNS-ekre a humán simaizomsejtekben*

Ebben a példában azt igazoljuk, hogy a *c-myc* antiszensz oligonukleotiddal való kezelés nem csökkenti a prokollagének mRNS-szintjét a humán simaizomsejtekben.

Ahhoz, hogy mérjük a prokollagén mRNS-ének szintjét, összenövés utáni simaizomsejteket 24 óra hosszat inkubálunk oligonukleotidokkal vagy azok nélkül, majd háromszor mossuk hideg PBS-sel, és 4 mol/l koncentrációjú guanidium-izotiocianátban lizáltatjuk. Az össz-RNS-t fenol-kloroformos extrakcióval, majd izopropanolos kicsapással izoláljuk. Az össz-RNS mennyiségét a 260 nm-en mért elnyelés alapján, spektrofotometriásan határozzuk meg. Azonos mennyiségű RNS-mintákat (10 μg) denaturálunk, majd választunk szét 0,8%-os agaróz/formaldehid géleken, és nitro-cellulóz-membránokra blotoljuk. Az RNS-t keresztkötésekkel a nitro-cellulóz-membránokhoz kötjük, egy UV-keresztkötési ágens felhasználásával (Stratagene, CA). A blotokat 24 óra hosszat 42 °C-on hibridizáljuk humán prokollagén $\alpha_1(I)$ (ATCC), majd humán prokollagén $\alpha_2(I)$ (H. Kuvainemi ajándéka) cDNS próbákkal. Kontrollként a 7S riboszomális RNS-próbát használjuk. A próbákat ^{32}P–CTP-vel jelezzük nicktranszlációval, 10^8 cpm/μg DNS-nél nagyobb specifikus aktivitással. A blotokat azután szekvenciálisan kétszer mossuk 2×, 1×, 0,5× és 0,1×SSC-0,1% SDS összetételű oldattal, 15 percig. Mindegyik mosást kétszer megismételjük. A blotokat Kodak-Omat filmre exponáljuk –70 °C-on egy erősítőfóliával, 6 órától 3 napig terjedő expozíciós idővel.

A *c-myc* fehérje elfojtása az antiszenszkezelés után felveti annak a lehetőségét is, hogy a kollagénexpresszió transzkripciós szinten szabályozódik. Ennek megfelelően a prokollagén $\alpha_1(I)$ és prokollagén $\alpha_2(I)$ mRNS szinteket elemezzük simaizomsejtekben, oligonukleotidokkal vagy azok nélkül végzett inkubálással, Northern-blot-elemzés felhasználásával. Amint az a 18. ábrán látható, az antiszensz oligonukleotidok nem érintik a prokollagén $\alpha_1(I)$ és prokollagén $\alpha_2(I)$ mRNS szinteket. Hasonlóképpen, a prokollagén $\alpha_1(III)$ mRNS hasonló szintjei figyelhetők meg a *c-myc* antiszensz oligonukleotidokkal vagy azok nélkül (nem közölt adatok). A 7S RNS a három kísérleti körülmény közül egyikben sem változik.

12. példa

A prokollagén intracelluláris felhalmozódása c-myc *antiszensz oligonukleotidokkal kezelt humán simaizomsejtekben*

Ez a példa azt igazolja, hogy a *c-myc* antiszensz oligonukleotid növeli a prokollagén mennyiségét a simaizomsejtekben. Ezek az eredmények összhangban vannak azzal, hogy az extracelluláris mátrixprokollagén szintézise csökken a *c-myc* antiszensz oligonukleotidok jelenlétében.

A) Az intracelluláris prokollagénszintek megnőnek a *c-myc* antiszensz kezelés hatására

Az extracelluláris prokollagén szintnek a *c-myc* antiszensz oligonukleotid hatására való csökkenésében szerepet játszó mechanizmus vizsgálatára 4 órával a [^{14}C]-prolin-jelzés után meghatározzuk a szekretált és intracelluláris prokollagén mennyiségét.

Hogy megmérjük az intercelluláris prokollagén mennyiségét a *c-myc* antiszensz oligonukleotid kezelés után, a sejteket oligonukleotidokkal vagy azok nélkül 20 óráig inkubáljuk 20% FBS-DMEM-ben. További négy órára szérummentes közeget adunk a sejtekhez, amely aszkorbinsavat (50 μg/ml) és [^{14}C]-prolint (2,5 μCi/ml, DuPont NEN, MA) tartalmaz, valamint oligonukleotidokat. Összegyűjtjük a tenyészközeget, majd proteinázinhibitort adunk hozzá. A közeg aliquot részeit Microcon-30 oszlopon át centrifugáljuk, azzal a céllal, hogy eltávolítsuk a be nem épült radioaktív izotópot, és az elektroforézishez koncentráljuk a mintákat. A megfelelő

sejtrétegeket azután háromszor mossuk hideg PBS-sel, SDS-PAGE mintafelvivő pufferben lizáljuk, majd 5 percig forraljuk a proteinázok inaktiválására. A töményített közeg, a sejtlizátumok (azonos számú sejtekből) aliquot részeit, valamint humán bőrfibroblasztsejtekből tisztított prokollagén I-et (W. Arnold ajándéka) 6%-os poliakrilamid-SDS gélen elektroforetizáljuk, 3%-os felvivőrégiókkal. A géleket 36 percig fixáljuk 10% ecetsav, 20% metanol összetételű oldatban, megszárítjuk, majd –70 °C-on 7 napig filmre exponáljuk.

c-myc antiszensz kezelés hatására a [^{14}C]-prolinnal jelzett szekretált prokollagén mennyisége lecsökkent, és hasonlított a Western-blot-DNS-hez. A *c-myc* antiszensz kezelés jelentősen növeli a prokollagén intracelluláris koncentrációját, a nem kezelt sejtekhez és összezavart szekvenciájú oligonukleotiddal kezelt sejtekhez viszonyítva (19. ábra).

B) Az intracelluláris prokollagénszint növekedése nem annak a következménye, hogy a humán simaizomsejtek nem képesek hidroxilezni a prolint *c-myc* antiszensz oligonukleotiddal való kezelés után

A prokollagén intracelluláris felhalmozódása tükrözheti azt a poszttranszlációs módosítást, ami a prokollagén-α-láncok tripla helikális konfrontációjának kialakításához szükségesek. Ezért ennek a lehetőségnek a kizárására mérjük a *c-myc* antiszensz oligonukleotiddal való kezelés hatását a prolil 4-hidroxilázaktivitásra és a hidroxi-prolin-tartalomra.

Az összenövés utáni állapotú simaizomsejteket az előzőkben ismertetett módon 24 óra hosszat oligonukleotidokkal vagy azok nélkül inkubáljuk 20% FBS-DMEM-ben. A sejtrétegeket háromszor mossuk hideg PBS-sel, majd lizáltatjuk, 0,2 mol/l nátrium-klorid, 20 mmol/l TRIS-HCl (pH=7,4), 0,1% Triton X–100, 0,1 mol/l glicin és 10 μmol/l ditiotreitol összetételű oldatban [K. J. Kivirikko és munkatársai: Methods in Enzymology *82,* 245–364 (1982)], amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk. A megmaradt sejtlizátumokat 20 percig 4 °C-on centrifugáljuk 13 000/perc fordulatszámmal.

A felülúszó aliquot részeiben vizsgáljuk a prolil 4-hidroxilázaktivitást, a 4-hidroxi-prolin képződésének mérésével, [^{14}C]-prolinnal jelzett prokollagén I-et használva szubsztrátként [K. J. Kivirikko és munkatársai: Analytical Biochemistry *19,* 249–255 (1967)], amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk. A sejtlizátum aliquot részeit hidrolizáljuk, a hidroxi-prolint specifikus kémiai eljárással határozzuk meg.

A poli 4-hidroxilázaktivitás, ami a tripla hélix képződéséhez nélkülözhetetlen enzim, mindegyik kísérleti alcsoportban hasonló volt. Értéke 11,7±0,1 (dpm/μg fehérje, átlag ±SD két külön kísérletből) volt az oligonukleotidokkal nem kezelt kontroll-simaizomsejtekben. 12±2,3 volt az összekevert nukleotidszekvenciájú oligonukleotidokkal (16 μmol/l) kezelt sejtekben és 10,5+2,0 a *c-myc* antiszensz oligonukleotidokkal (16 μmol/l) való kezelés után.

A hidroxi-prolin-tartalom nagyobb a *c-myc* antiszensz oligonukleotiddal (1. számú szekvencia) kezelt sejtekben, mint a kezeletlen vagy összezavart szekvenciájú oligonukleotidokkal kezelt sejtekben (10. ábra). A hidroxi-prolin-tartalom növekedése tükrözi a prokollagénszintek növekedését, ami a prolil 4-hidroxiláz szubsztrátja.

13. példa

Az extracelluláris mátrix termelődésének gátlása humán bőrfibroblasztsejtekben, c-myc *antiszensz oligonukleotidok felhasználásával*

Ebben a példában tovább igazoljuk a *c-myc* antiszensz oligonukleotid kezelés hatékonyságát a humán bőrfibroblasztsejtek extracelluláris mátrixfehérje (főleg a prokollagén I és III) szintézisének gátlásában. Az antiszenszkezelés erősen lecsökkenti az extracelluláris prokollagénszinteket a serkentett humán bőrfibroblasztsejtekben (20% FBS-sel kezelve). Ebben a példában tovább igazoljuk a 7. példában megfigyelteket.

A) Az extracelluláris és intracelluláris kollagén I és III vizsgálata Western-blottal

Annak további meghatározásához, hogy a *c-myc* antiszensz oligonukleotidok vajon gátolják-e az extracelluláris és intracelluláris prokollagén I és III szintézisét humán bőrfibroblasztokban, meghatározzuk a prokollagénszinteket, amint azt a simaizomsejtek esetében a 9. és 12. példában tárgyaljuk. A humán bőrfibroblaszt-kísérletekben használt humán bőrfibroblasztsejtek összenőtt állapotúak. A sejteket a 7. példában leírtak alapján, valamint a szakirodalomban ismertetett módon nyerjük ki és tenyésztjük.

B) Az extracelluláris kollagén I és III szekréciójának gyors gátlása *c-myc* antiszensz oligonukleotid kezeléssel

Ezek a kísérletek azt mutatják, hogy a *c-myc* oligonukleotidok dózisfüggő és az antiszensz szekvenciától függő módon, valamint a gátlás gyors fellépésével gátolják az extracelluláris kollagén I és III humán bőrfibroblasztok által való szekrécióját.

Ahhoz, hogy pontosabban meghatározzuk a *c-myc* oligonukleotidok dózisválaszát és antiszensz specifitását az extracelluláris mátrix termelődésének gátlásában, az extracelluláris kollagén I-et különböző kezeléseknek alávetett humán fibroblasztsejtekből izolált humán fibroblaszt-sejtfehérje Western-blotjával mérve. A humán fibroblasztsejteket vagy összezavart szekvenciájú oligonukleotidokkal (4. számú szekvencia, 16 μmol/l), rossz illeszkedéseket tartalmazó oligonukleotidokkal (3. számú szekvencia, 16 μmol/l), antiszensz oligonukleotidokkal (1. számú szekvencia, 4, 8 és 16 μmol/l) hozzuk érintkezésbe 24 órára, vagy nem kezeljük oligonukleotidokkal, az ismertetett módon, majd azoknak a sejteknek vizsgáljuk a kollagén I tartalmát Western-blottal, amelyek a 21. ábrán az 1–5-ös sávban láthatók. A dupla csík kollagén α_1(I) és α_2(I) láncokat tükröz (alsó és felső csík). Az antiszensz oligonukleotidokkal kezelt sejtekben a kollagén I a *c-myc* antiszensz oligonukleotidok mennyiségének növekedésével arányosan csökken, míg a kontrollkezelést kapott sejtekben (nincs oligonukleotid, illetve szekvenciája összezavart vagy rosszul illeszkedő) a kolla-

gén szintje magasabb, mint azokban a sejtekben, amelyeket a legkisebb koncentrációjú *c-myc* antiszensz oligonukleotiddal kezeltünk. Az antiszensz oligonukleotid (1. számú szekvencia, 16 μmol/l) gátolja a sejtek szaporodását frissen izolált fibroblasztokban is; a 20%-os FBS-sel és értelmes szállal végzett kísérletekkel összehasonlítva a sejtszaporodás körülbelül 25, illetve 50 százalékban gátlódik négy nap elteltével. Ezek az eredmények, a tárgyalt eredményekkel együtt, főleg azokkal, amelyek azt mutatják, hogy a kollagén- és prokollagéndegracációs bioszintézisút *c-myc* antiszensz kezelés hatására nem erősödik, azt mutatják, hogy az extracelluláris mátrix, főleg a prokollagén I termelődése gátlódik a *c-myc* antiszenszkezelések hatására.

A humán bőrfibroblasztsejt kollagén I szekréciójának időbeli alakulása a *c-myc* antiszensz oligonukleotid kezelés hatására azt mutatja, hogy a de novo keletkező kollagén I szekréciója gyorsan gátlódik. Nulla időpontban a humán bőrfibroblasztsejteket friss közeggel hozzuk érintkezésbe 24 órára (a továbbiakban a „friss közeg" szakkifejezés jelentése olyan közeg, amely 20% FBS-t és 50 μg/ml aszkorbinsavat, valamint más, külön említett komponenseket is tartalmaz), amely vagy nem tartalmaz oligonukleotidokat, vagy összezavart szekvenciájú oligonukleotidokat vagy antiszensz oligonukleotidokat tartalmaz (az oligonukleotidok koncentrációja 16 μmol/l; 1. és 3. számú szekvencia). Három, hat és huszonnégy óra elteltével az egyes sejtek közegéből aliquot részeket veszünk ki, majd Western-blottal vizsgáljuk a kollagén I jelenlétét, amint azt tárgyaltuk. A kontrollsejtekkel (kezeletlen, illetve összezavart szekvenciájú oligonukleotidokkal kezelt) összehasonlítva a kollagén I szintjének csökkenése figyelhető meg az antiszensz oligonukleotidokkal kezelt sejtekben, már három óra elteltével is. Huszonnégy óra elteltével az antiszensz oligonukleotidokkal kezelt sejteknél a kontrollsejtekkel összehasonlítva 5–10-szer kevesebb szekretált kollagén I található. A határás érték köztes eredményt mutat.

A humán fibroblasztsejtek kollagén III szekrécióját is gátolják a *c-myc* antiszensz oligonukleotidok. A humán fibroblasztsejteket 24 óráig friss közeggel kezeljük, amely vagy nem tartalmaz oligonukleotidokat, vagy 16 μmol/l összezavart szekvenciájú oligonukleotidot tartalmaz, vagy 16 μmol/l *c-myc* antiszensz oligonukleotidot tartalmaz, és vizsgáljuk az extracelluláris kollagén III jelenlétét a huszonnégy órás periódus végén. Az antiszensz oligonukleotidokkal kezelt sejteknél nem figyelhető meg extracelluláris kollagén III, míg a kontrollsejteknél (nincs oligonukleotidkezelés, vagy összezavart szekvenciájú oligonukleotiddal történt a kezelés) megfigyelhető az extracelluláris kollagén III jelenléte (a kollagén III szintje legalább 10–100-szor magasabb, mint az antiszensz oligonukleotidokkal kezelt sejtekben).

Tehát ezek az eredmények, a többi, a leírásban tárgyalt eredménnyel együtt azt mutatják, hogy az extracelluláris mátrix, főleg a prokollagén I és III szekrécióját gátolja a *c-myc* antiszenszkezelés.

C) Az intracelluláris prokollagén I felhalmozódása és az extracelluláris prokollagén I ezzel egyidejű csökkenése a *c-myc* antiszensz oligonukleotidokkal való kezelés hatására

A humán fibroblasztsejtek prokollagénszekréciójának gátlása *c-myc*-kezelés hatására kapcsolatban van az intracelluláris prokollagén I felhalmozódásával. Humán fibroblasztsejteket 24 óra hosszat kezelünk friss közeggel, amely vagy nem tartalmaz oligonukleotidokat, vagy 16 μmol/l összezavart szekvenciájú oligonukleotidot, vagy 16 μmol/l *c-myc* antiszensz oligonukleotidot tartalmaz, majd a közeget és a megfelelő humán fibroblasztsejteket megvizsgáljuk, tartalmaznak-e extracelluláris, illetve intracelluláris prokollagén I-et, az előzőkben ismertetett módon elválasztott [^{14}C]-prolinnal jelzett fehérjeszintézis-termékek mennyiségének mérésével. A 22. ábrán az 1–3. sávokban a fő csíkok prokollagén α_1(I, III) és α_2(I) láncokat láthatunk. A szekretált prokollagén I mennyisége az antiszensz oligonukleotiddal kezelt sejtekben 10–20-szor kisebb, mint a kontrollsejtekben (azaz azokban a sejtekben, amelyek nem kaptak kezelést, vagy összezavart szekvenciájú oligonukleotiddal kezeltük, 1-es és 2-es sávok). Az 1–3-as sávokban a felső csík körülbelül 116 kDa méretű („felső csík"), ami megfelel a prokollagén α_1(I, III)-nak; az 1–3-as sávokban (balról jobbra) az alsó csík mérete körülbelül 100 kDa, ami megfelel az α_2(I)-nek. A 22. ábrán a 4–6-os sávok azt mutatják, hogy az intracelluláris prokollagén I mennyisége legalább ötször akkora az antiszensz oligonukleotidokkal kezelt sejtekben (6. sáv), mint a kontrollsejtekben (4. és 5. sáv). A 22. ábrán a 7. sávban a molekulasúly-markerek láthatók.

Tehát ezek az eredmények azt mutatják, hogy a *c-myc* antiszensz oligonukleotiddal való kezelés csökkenti a humán fibroblasztsejtek által szekretált prokollagén mennyiségét, és megnöveli a sejtekben levő prokollagén mennyiségét.

14. példa

A c-myc *antiszensz oligonukleotidok nem változtatják meg az intracelluláris prokollagén hőstabilitását a humán bőrfibroblasztokban*

Az intracelluláris prokollagén tercier struktúrája nem változik meg a *c-myc*-kezelés hatására. Humán fibroblasztsejteket 24 óra hosszat kezelünk friss közeggel, amely vagy nem tartalmaz oligonukleotidokat, vagy 16 μmol/l összezavart szekvenciájú oligonukleotidot vagy 16 μmol/l *c-myc* antiszensz oligonukleotidot tartalmaz. Minden egyes kísérleti pontban mérjük a prokollagén olvadáspontját, a szakirodalomból ismert és az alábbiakban tárgyalt módon. A 23. ábrán látható, hogy a kontrollsejtek (tehát amelyek nem kaptak kezelést, vagy összezavart szekvenciájú oligonukleotiddal kezeltük őket), és az antiszensz oligonukleotidokkal kezelt sejtek olvadáspontprofilja hasonló. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az antiszensz oligonukleotiddal kezelt sejtek belsejében levő prokollagénnek megmarad a normális tripla hélix prokollagénkonformációja, ami ugyanolyan, mint a kontrollsejtekben.

Tehát a *c-myc* antiszensz oligonukleotidokkal való kezelés nem vezet a prokollagénstruktúra detektálható

megváltozásához, ami fokozott intracelluláris degradációt vagy a sejtekből való csökkent fehérjeexportot eredményez.

15. példa

A c-myc *antiszensz oligonukleotiddal való kezelés nem változtatja meg a prokollagén α_1(I) mRNS szintet a humán bőrfibroblasztokban*

Ebben a példában azt igazoljuk, hogy a *c-myc* antiszensz oligonukleotiddal való kezelés nem gátolja a humán bőrfibroblasztsejtekben az extracelluláris mátrixfehérje, főleg a prokollagén szintézisét, a prokollagén mRNS-szintjének csökkentése révén. Az antiszensz oligonukleotiddal való kezelés nem csökkenti az mRNS prokollagén szinteket a serkentett humán bőrfibroblasztsejtekben (20% FBS-sel kezelve).

A) A prokollagén α_1(I) mRNS mérése

RNS-t izolálunk, és Northern-blot-elemzést végzünk, az alábbiak szerint: a sejteket háromszor mossuk hideg PBS-pufferrel, majd 4 mol/l koncentrációjú guanidium-izotiocianáttal lizáltatjuk őket. Az RNS-t fenol/kloroform eleggyel extraháljuk, majd 260/280 nm-en mért elnyelés alapján spektrofotometriásan határozzuk meg. 20 μg RNS-mintát választunk szét gélelektroforézissel 0,8%-os agaróz-formaldehid géleken. Az RNS-nek a nitro-cellulóz-szűrőlapokra való átvitelét követően a blotokat ultraibolya-besugárzással rögzítjük. A blotokat legalább 4 óra hosszat 65 °C-on előhibridizáljuk, 5×standard sóoldat citrát, 2×Denhardt-féle oldat, 0,1% SDS és 0,2 mg/ml denaturált lazacsperma-DNS összetételű oldatban. A hibridizációt éjszakán át végezzük, az előzőkben említett puffert használva, amely tartalmaz nicktranszlációval ^{32}P dCTP-jelzett cDNS-próbát, amelynek specifikus aktivitása körülbelül 109-109 cpm/μg. A blotokat 65 °C-on mossuk 0,5×standard sóoldat citrát és 0,1% SDS összetételű oldattal. A szűrőlapokat 1–5 napig Kodak X-Omat filmre exponáljuk –70 °C-on, erősítőfólia alkalmazásával. A kapott Northern-blotok autoradiogramjait pásztázó denzitometriával és a csúcsterületek integrálásával határozzuk meg mennyiségileg. Az ebben a vizsgálatban használt próbák az alábbiak voltak: egy 1,8 kilobázis méretű proalfa 1(I)(HF–677) cDNS, amely megfelel a C-terminális propeptidnek és az I-es típusú prokollagén humán proalfa 1(I) lánca tripla helikális régiója C-terminális részének [Chu és munkatársai: Nucleic Acids Research *10,* 5925–5934 (1982)].

B) A prokollagén α_1(I) mRNS szintek nem csökkennek a *c-myc* antiszensz oligonukleotiddal való kezelés hatására

A prokollagén alfa I mRNS szintjét humán fibroblasztsejtekben nem érinti a *c-myc* antiszensz oligonukleotiddal való kezelés. A humán fibroblasztsejteket 24 óra hosszat friss közeggel, kezeljük, amely vagy nem tartalmaz oligonukleotidokat, vagy 16 μmol/l összezavart szekvenciájú oligonukleotidot vagy 16 μmol/l *c-myc* antiszensz oligonukleotidot tartalmaz. Mindegyik kísérleti pontból mRNS-t tisztítunk, és vizsgáljuk a prokollagén alfa I mRNS jelenlétét, a szakirodalomban ismertetett és az alábbiakban tárgyalt módon. A 24. ábrán látható, hogy a kontrollsejt (kezeletlen vagy összezavart szekvenciájú oligonukleotiddal kezelt, 1. és 2. sáv) prokollagén I mRNS szintje hasonlít az antiszensz oligonukleotiddal kezelt sejt prokollagén alfa I mRNS szintjéhez (3. sáv). Ezek az eredmények azt igazolják, hogy a humán fibroblasztsejtek *cmyc* antiszensz oligonukleotiddal való kezelése nem fojtja el a prokollagén alfa I gén mRNS-sé való transzkripcióját.

Tehát a többi, a leírásban tárgyalt eredménnyel együtt az derül ki, hogy az mRNS-eredmények azt mutatják, hogy a *c-myc* antiszensz oligonukleotiddal való kezelés csökkenti a prokollagén I és III szekrécióját, amely fehérjék a kollagén szintézisét eredményezik az extracelluláris mátrixban.

16. példa

A c-myc *antiszensz oligonukleotidok nem változtatják meg az extracelluláris mátrixfehérje kinyerését vagy szintézisét a humán bőrfibroblasztok* c-myc *antiszensz oligonukleotiddal való kezelésének abbahagyása után*

A humán fibroblasztsejteknek az a képessége nem sérül, hogy a *c-myc* antiszensz oligonukleotid kezelés abbahagyása után kollagén I-et szintetizálnak. Az egyes kísérleti pontokból származó humán fibroblasztsejteket 24 óra hosszat friss közeggel kezeljük, amely vagy nem tartalmaz oligonukleotidokat, vagy 16 μmol/l összezavart szekvenciájú oligonukleotidot vagy 16 μmol/l *c-myc* antiszensz oligonukleotidot tartalmaz. Az egyes kísérleti pontokból származó humán fibroblasztsejteket azután oligonukleotidot nem tartalmazó friss közeggel hozzuk érintkezésbe, majd a leírások szerint vizsgáljuk az extracelluláris kollagén I jelenlétét. A 25. ábráról látható, hogy a kontrollsejtek (kezeletlen, illetve összezavart szekvenciájú oligonukleotiddal kezelt sejtek) és az antiszensz oligonukleotiddal kezelt sejtek ugyanazt az extracelluláris kollagén I-et termelik a kezelés abbahagyása után 24 órával. Ezek az eredmények azt igazolják, hogy huszonnégy óra után a *c-myc* antiszensz oligonukleotiddal kezelt humán fibroblasztsejtekben teljesen helyreáll a kollagéntermelés.

Tehát a *c-myc* antiszensz oligonukleotiddal való kezelésnek nincsenek citotoxikus hatásai, amik azt eredményeznék, hogy a sejtek nem képesek visszatérni a prokollagén kezelés előtti szekréciós szintjére.

17. példa

Az extracelluláris mátrix szintézisének gátlása sertés-koronáriaartériákban

Ebben a példában tovább igazoljuk, hogy a lokalizált *c-myc* antiszensz oligonukleotid kezelés *in vivo* hatásos az extracelluláris mátrix szintézisének a szöveti trauma utáni kifejlődése lassítására. Ebben a példában még azt is igazoljuk, hogy a *c-myc* kezelés *in vivo* hatékonyan csökkenti a belső szervek hegesedését, valamint csökkenti az extracelluláris mátrixmolekulák, mint például a kollagén szintéziséhez kapcsolódó szöveti hegesedés előrehaladását.

A) Az extracelluláris mátrix fibrilláris anyag termelődésének gátlása *c-myc* antiszensz oligonukleotidos kezeléssel

Abból a célból, hogy meghatározzuk a *c-myc* antiszensz kezelés hatását az extracelluláris mátrix szintézisére szöveti sérülés után, sertésszíveknek okoztunk sérülést *in vivo,* majd oligonukleotidokkal kezeljük, a 8. példában leírtak alapján (hacsak az eltérést külön nem említjük), majd az oligonukleotidok beadása után három, hét és huszonnyolc nappal leöljük őket. Ugyanazokat a cmyc antiszensz és értelmes szálú oligonukleotidokat (1. és 2. számú szekvencia), valamint dózisokat (1 mg per artéria) használjuk, mint a 8. példában.

Az antiszensz oligonukleotidokkal kezelt sertésekből származó traumatizált (sérült) koronáriák metszetei nem mutatnak különbséget a mikroszkópiás vizsgálat alapján az extracelluláris architektúrájukban az értelmes szállal kezelt, sérült koronáriákhoz viszonyítva. Az egyes kísérleti csoportokból származó traumatizált koronáriákat vakmintaként vizsgáljuk fénymikroszkóppal, 20–62-szeres nagyítással. A szövetet Verhoff–Van-Gieson-festékkel festjük, a szakterületen jártas szakember számára ismert módon, hogy kiemeljük a sejteket és az extracelluláris mátrixot, valamint Sirrius vörös festékkel festjük, a szakterületen jártas szakember számára ismert módon, hogy kiemeljük a kollagént. A *c-myc* antiszensz oligonukleotiddal kezelt erek, amelyek a kontrollerekhez viszonyítva kisebb neointimális területtel rendelkeznek, kevésbé festődnek vörös festékkel, mint a kontrollerek (azaz az értelmes szállal kezeltek). Az antiszensz oligonukleotiddal kezelt koronáriáknál kevesebb extracelluláris fibrilláris anyag látható az értelmes szállal kezelt koronáriákkal összehasonlítva; és az antiszensz oligonukleotiddal kezelt koronáriáknál kisebb a sejtek közötti extracelluláris tér. A neointimális simaizomsejtek szaporodását is megbecsüljük PCNA (szaporodó sejt sejtmagantigénje) elleni immunfestéssel, ballondenudációt és a *c-myc* értelmes szál (S) vagy antiszensz (AS) oligonukleotidoknak (1 mg) a sertés-koronáriaartériákba való transzkatéteres bejuttatása után, lásd a IV. táblázatot. A koronáriák antiszensz oligonukleotidokkal való kezelése gátolja az simaizomsejtek szövetsérülés okozta szaporodását, a koronáriák értelmes szálú oligonukleotiddal való kezelésével összehasonlítva. A PCNA-festés lehetővé teszi, hogy egy adott neointimametszetben megbecsüljük a szaporodó sejtek számát. Általában 200–1000 sejtet lehet megszámlálni, majd meghatározva a szaporodó simaizomsejtek százalékát, szaporodási index formájában fejezzük ki. A szaporodási index (PI), a neointima/közeg (I/M) arány és az I/M arány csökkenése (ΔI/M) értékét a IV. táblázatban adjuk meg.

I. táblázat

Nap	R_x	n	P* (%)	I/M arány	ΔI/M (%)
3	S	4	5±2	0,09±0,03	
	AS	8	3±5	0,05±0,02	↓44
7	S	4	47±13	0,28±0,04	
	AS	8	11±13**	0,12±0,05**	↓57
28	S	6	N/A	1,19±0,51	
	AS	4	N/A	0,47±0,30*	↓61

P* – szaporodó sejtek/összes sejtszám×100,
*p<0,05, **p<0,01

A csökkent I/M aránnyal rendelkező koronáriák jobb lumenáliás átmérővel rendelkeznek. Ezek az eredmények azt igazolják, hogy a *c-myc* antiszensz oligonukleotiddal való lokalizált kezelés gátolja a heg képződését a traumatizált szövetben, azaz gátolja a heg képződését a koronáriákban ballonangioplasztika-trauma után, amit a simaizomsejtek szaporodása és az extracelluláris mátrix képződése okoz.

18. példa

A c-myc *antiszensz oligonukleotidok gyors lokalizációja sertés-koronáriaartériákban*

Ez a példa igazolja a *c-myc* antiszensz oligonukleotidok *in vivo* hatékonyságát a vaszkuláris és kötőszövetekbe való behatolással, lokális bejuttatóeszközöket alkalmazva. Más, az alábbiakban ismertetett eredmények kapcsolatban ezek az eredmények igazolják, hogy a *c-myc* antiszensz kezelés 30 percen belül a sejtmagra lokalizálódik, a *c-myc*-indukció fellépte előtt (ami három-négy órán belül lép fel). A *c-myc* antiszensz oligonukleotidok lokális eloszlása a koronáriaartériák érfalába való lokális beadása után csökkenti a hegképződést ballonangioplasztika után.

A) Karbofluoreszceinnel vagy ^{35}S foszfotioáttal jelzett *c-myc* antiszensz oligonukleotidok lokális bejuttatása

Az ebben a példában használt *c-myc* antiszensz oligonukleotidokat az alábbiak szerint állítjuk elő. Az eloszlási vizsgálatokban használt, a humán *c-myc*-gén transzlációs iniciációs régió elleni foszforotioát antiszensz oligonukleotidokat (1. számú szekvencia) karbofluoreszceinekkel (480 nm-es gerjesztés, 520 nm-es

emisszió, Molecular Probes, Inc.) jelezzük, Iverson és munkatársai leírása szerint [Iverson és munkatársai: Antisense Res. Dev. 2, 211–222 (1992)], amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk. A mennyiségi vizsgálatokhoz az oligonukleotidokat ^{35}S-jelezzük minden egyes internukleotidkapcsolatnál, 1,8×10 cpm/μmol specifikus aktivitással.

Keresztezett házisertést *(Sus scrofa)* használunk, és az alábbiakban ismertetett módon használjuk őket a kísérletekben. Egy koronáriaostiát kanülözünk egy 9 French SAL 1 vezetőkatéterrel (Cordis Corp., Miami, FL), fluoroszkópos vezetéssel. 100 μg nitroglicerin intrakoronáriás injekciózása után alapvonal-koronáriaangiográfiát végzünk. A koronáriaartériák kiválasztott részeit azután denudáljuk (traumatizáljuk) egy túlméretezett ballonnal, amit háromszor 30 másodpercre fújunk fel, 6 atmoszférás nyomással. Ezután a bejuttatóeszközt, egy Kaplan–Simpson Infusasleeve-et (LocalMed, Palo Alto, CA) dugunk fel egy standard angioplasztikás ballon („támasztó"-ballon) fölött, a számunkra érdekes régióba. Ez a berendezés tartalmaz egy multilumen infúziós régiót (18 mm), amely több oldalsó lyukkal rendelkezik (40 μm), amiket egy támasztóballon felfújásával az érfalhoz nyomunk. A vizsgálatokban használt berendezés oldatokat infundál merev, össze nem nyomódó csatornákon keresztül. Ez a berendezés minimalizálja a hatóanyagnak a véráramba való jutással való elvesztését, és lehetővé teszi a hatóanyag infúziójának és a hatóanyag-bejuttató berendezés érben való elhelyezésének külön szabályozását. A belső ballonkatéter teljes kiterjedése után az infúziós részt fluoroszkópiásan ellenőrizzük, majd beadjuk a *c-myc* antiszensz oligonukleotidokat. Az intramurális injekciókat 0,689 Mpa külső nyomással adjuk be. Az injekció teljes térfogata 5-6 ml, amit külső szivattyúval adunk be, 40 ml/perc sebességgel. A beadott dózis 1 mg/artéria. Miután az injekciót teljesen beadtuk, a berendezéseket eltávolítjuk, és felvesszük a végső angiogramokat. Az oligonukleotid bejuttatásának megfelelő körülményeinek igazolására kvantitatív koronáriasorozatot alkalmazunk, hogy megmérjük a kiválasztott koronáriaartériák kiindulási luminális átmérőjét, valamint az oligonukleotidok beadása előtti luminális átmérőjét (azaz a denudáló sérülés után), valamint az oligonukleotidok beadása után. Emellett a denudáció és a támasztóballonok átmérőjét *in situ* mérjük. A vezérlőkatétereket használjuk mérceként minden angiográfiás méréshez. A jelzett időpontokban az állatoknak halálos mennyiségű nátrium-pentobarbitált adunk be (100 mg/kg intravénásan).

Amint az az V. táblázatból látható, az átlagos luminális érátmérő 2,5±0,1 az alapvonalnál. A koronáriaartéria sérülését a túlméretes ballonnal hozzuk létre (ez denudáció néven is ismert) (az átlagos ballon:artéria arány=1,1). Mindegyik ér átjárható marad a ballonnal való túlfeszítés után, átlagos luminális átmérőjük 2,5±0,1 mm. A *c-myc* antiszensz oligonukleotidokat kiterjesztett bejuttatóeszközzel visszük be, amivel közvetlen érintkezés érhető el az ér endoluminális felszínével (az átlagos ballon:artéria arány=1,0).

V. táblázat

VI. A kvantitatív koronáriaangiográfián alapuló angiográfiás jellemzők (n=14)

Kiindulási luminális átmérő (mm)	*2,5±0,1*
Denudációs ballon/artéria arány	*1,1±0,0*
Denudáció utáni luminális átmérő (mm)	*2,6±0,1*
Bejuttatóballon/artéria arány	1,0±0,0
Bejuttatás utáni luminális átmérő	*2,6±0,1*

B) Az oligonukleotidok bejuttatásának mennyiségi becslése

Ahhoz, hogy meghatározzuk a fluoreszceinnel jelzett oligonukleotidok eloszlását a transzkatéterbejuttatás után, a koronáriaartériákat a szomszédos szövetekkel együtt kivágjuk. Miután az ér lumenjét PBS-sel öblítettük, az artériát 10%-os pufferelt formalinnal fixáljuk 6 óra hosszat, majd paraffinba ágyazzuk. Az artériákból 4 μm vastag metszetsorozatot készítünk (50 mm per ér, beleértve a 18 mm-es injekciózott részt). Az injekció helyének, valamint az ér szomszédos és távoli részeinek vizsgálata ad információt az oligonukleotidok hosszanti eloszlásáról. Emellett ugyanabból az állatból származó nem injekciózott koronáriaartéria szolgál kontrollként. A szekciókat paraffinmentesítjük, végüket SlowFade-Light fakulás elleni reagenssel kezeljük (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR). Mindegyik lemez tartalmazza az eret, a periadventiciális szövetet és a szomszédos szívizmot (17. ábra), ami lehetővé teszi, hogy meghatározzuk az oligonukleotid behatolásának mélységét. A fluoreszcenciával jelzett antiszensz oligonukleotidokat Nikon Optiphot mikroszkóppal vizsgáljuk meg, amiket XF–22 szűrővel szereltünk fel az epifluoreszcencia vizsgálatára. A fényképeket Kodak Ektachrome P1600 filmre exponáljuk.

A fluoreszcenciával jelzett oligonukleotidok *in vivo* és *in vitro* intracelluláris lokalizációjának elemzésére lézer letapogatási konfokális mikroszkópot (Zeiss Axiovert 100) használunk, amit MRC–600 kripton-argon lézerrel (Bio-Rad) szereltünk fel. A kripton-argon lézer 488 nm gerjesztési hullámhosszon bocsát lézerfényt. Az indukált fluoreszcenciás fényt egy 63-szoros nagyítású objektívvel tapogatjuk le, majd videojellé alakítjuk, hogy meg tudjuk jeleníteni egy számítógép képernyőjén. A képeket a számítógép képernyőjéről Kodak Ektachrome 100 filmre fényképezzük. Az *in vitro* vizsgálatokhoz, azért, hogy meg tudjuk határozni az oligonukleotidoknak a vaszkuláris simaizomsejtek által való felvételének időbeni lefutását, a sejteket kamralemezeken növesztjük 2 napig, 10% borjúmagzatszérumot tartalmazó közegben, majd fluoreszceinnel jelzett oligonukleotidokat (8 μmol/l) adunk hozzá 2 perc, 30 perc, illetve 2 óra elteltével. A sejteket azután háromszor mossuk PBS-sel, majd 50% acetont és 50% metanolt tartalmazó oldattal fixáljuk. Az *in vivo* vizsgálatokhoz a koronáriaartériákból az előzőek szerint előállított metszeteket konfokális mikroszkópiával elemezzük, 0,4–0,5 μm-es optikai vastagság mellett.

C) Az antiszensz oligonukleotidok eloszlása az érfalban

Ahhoz, hogy meghatározzuk az oligonukleotid eloszlását az artéria falában, vizsgáljuk a koronáriaartériákban való lokalizációjukat az intramurális beadás után 30 perccel, illetve 3 nappal (n=4). A fluoreszceinnel jelzett oligonukleotidokat csak az injekciózás régiójában lehet kimutatni, de nem lehet kimutatni a disztális szegmensekben vagy a nem injekciózott koronáriaartériákban. 30 perc elteltével az oligonukleotidok eloszlásának három elkülönülő fokális mintázata figyelhető meg azokon az injekciózott szegmenseken belül, amelyek korábban ballondenudáción mentek keresztül. A sűrű transzmurális lokalizáció, ami magában foglalja a közeg teljes vastagságát, együtt jár a sokkal ritkább adventiciális és perivaszkuláris eloszlással (27a. és 27b. ábra). Az egyes metszeteken az oligonukleotidok az artériás környezetnek csak egy részét foglalják el. A szubintimális, nem transzmurális mintázat az általános; ez vagy elkeveredik a transzmurális lokalizációk között, vagy az injekciózott szegmensek szélei között (27c. és 27d. ábra). A legritkább a középfali nem transzmurális mintázat, és erről kiderült, hogy a transzmurális lokalizációval szomszédos (27e. és 27f. ábra). Az éradventicia nem tartalmaz antiszensz oligonukleotidokat nem transzmurális eloszlást mutató szekciókban.

Vizsgáltuk a korábbi vaszkuláris károsodásnak a *c-myc*-oligonukleotidnak az artéria falában való eloszlására gyakorolt szerepét. A konszekutív lemezek vizsgálata felfedte, hogy a transzmurális eloszlás a legáltalánosabb a metszés helyén, és az oligonukleotidlokalizáció a közvetlen szomszédos metszetekre terjed ki. A szubintimális nem transzmurális mintázat általában a megőrzött vaszkuláris integritással jár együtt. 3 nap elteltével az oligonukleotidok világosan láthatók a transzmurális lokalizációban (28a. és 28b. ábra). A szubintimális nem transzmurális eloszlás kevésbé nyilvánvaló, valószínűleg az oligonukleotidok kimosódásának következtében. Nincs bizonyíték lineáris „jetszerű" lokalizációra 30 perc vagy 3 nap elteltével.

Ezek az adatok összességükben az oligonukleotidok intramurális eloszlásának fokális mintázatára utalnak nyomással végzett transzkatéterbeadás után. A koronáriaartéria széthasadása az előző ballondenudáció miatt láthatóan megkönnyíti az oligonukleotidok belépését és transzmurális eloszlását. A nem transzmurális mintázat gyakran kapcsolódik az érintetlen elasztikus laminához.

D) Az oligonukleotidok intramurális vándorlása a koronáriaartériákban

Megmértük az oligonukleotidok *in situ* tartózkodási idejét, hogy meghatározzuk, vajon az antiszensz oligonukleotiddal végzett kezelés az oligonukleotid visszatartását eredményezi-e. Ennek megfelelően, hogy ezt a kérdést mennyiségileg meg tudjuk fogni, ^{35}S-jelzett *c-myc* antiszensz oligonukleotidokat viszünk be sertés-koronáriaartériákba, transzkatéter alkalmazásával. Amint az a 29. ábráról látható, a helyspecifikus beadás után 30 perccel megmérjük a szövet radioaktivitását, ami tükrözi az oligonukleotid tartalmát: 2510±1436 cpm (n=6) az érfalban és 2163±966 cpm (n=6) a perivaszkuláris szövetben, szemben a szövetekben mért 17±4 cpm-mel. Három nappal később az oligonukleotidokhoz kapcsolódó radioaktivitás 3595±1672 cpm-re emelkedett (n=4) az érfalban, míg a periadventiciális szövetben a szint 432±201 cpm-re csökkent (n=4). Az oligonukleotidok fenti, hosszan megmaradó szintjét annak ellenére el lehetett érni, hogy gyors a plazmakiürülés ($t_{1/2}$=15±2 perc). Mind 30 perc, mind 3 nap elteltével a kimutatott oligonukleotidok mennyisége az összesen beadott dózis körülbelül 0,1%-ának felel meg. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a nyomással végzett transzkatéterbejuttatás az antiszensz oligonukleotidoknak a mediális és adventiciális szövetekben, valamint a perivaszkuláris szövetekben való lerakódását eredményezi.

E) Vaszkuláris integritás az oligonukleotidok intramurális beadása után

Mivel mindenféle terápiás ágensnek az artéria falába való nyomással vezérelt transzkatéterinjekciózása vaszkuláris károsodást okozhat, ezért mérjük a károsodás mértékét.

Először: kvalitatív koronáriaangiográfia alkalmazásával sertés-koronáriaartériákban áramlással nem korlátozott koronáriaszakadás észlelhető 14 intramurális injekcióból 1 esetben, a túlméretes ballonnal korábban okozott sérülés ellenére.

Másodszor: kvantitatív koronáriaangiográfiát használunk, hogy felbecsüljük az intramurális oligonukleotidok bejuttatását követően a luminális átmérőt (n=14). Nincs lényeges eltérés a luminális átmérőben a transzkatéteres beadást követően (V. táblázat).

Harmadszor: a transzkatéter oligonukleotid injekciózás hatásait fénymikroszkópiával becsüljük meg. Ebből a célból kiértékeljük a látható hasadást nem tartalmazó, az oligonukleotidokat transzmurális eloszlásban tartalmazó koronáriaartériák metszeteit, azzal a céllal, hogy meghatározzuk az érfal celluláris és extracelluláris mátrix komponensének finom változásait. Amint az a 30. ábrán látható, az oligonukleotidok transzmurális eloszlása (30a. ábra) kötődik az érintetlen belső elasztikus réteghez és elasztikus szövetekhez, az érfalon keresztül (30b. ábra). A citoplazmás festődés és sejtmagpiknózis enyhe csökkenése figyelhető meg alkalmanként az oligonukleotidok retenciójának helyén, 30 perc elteltével (30c. ábra). Ezek a változások nem figyelhetők meg a bejuttatás után 30 perccel (30d. ábra).

19. példa

A c-myc *antiszensz oligonukleotid gyors sejtmag-lokalizációja* in vitro *humán simaizomsejtekben és* in vivo *sertés-simaizomsejtekben*

Ebben a példában tovább igazoljuk a *c-myc* antiszensz oligonukleotid kezelés hatékonyságát *in vivo,* bemutatva a *c-myc* antiszensz oligonukleotidok gyors lokalizációját a simaizomsejtek sejtmagjaiban, mind *in vitro* (humán), mind *in vivo* (sertés). Ez a gyors időbeli lefutás lehetővé teszi a *c-myc*-gén aktiválódásának, amit korábban órás nagyságrendűnek (3-4 óra) határoztak meg, gátlását.

A) A karbofluoreszceinnel jelzett *c-myc* antiszensz oligonukleotidok intracelluláris lokalizációja

Ahhoz, hogy elemezzük a fluoreszcenciásan jelzett oligonukleotidok intracelluláris lokalizációját *in vitro,* lézer letapogató konfokális mikroszkópot (Zeiss Axiovert 100) használunk, amit MRC–600 kripton-argon lézerrel (Bio-Rad) szereltünk fel. A kripton-argon lézer 488 nm-es lézerfényt bocsát ki. Az indukált fluoreszcenciafényt egy 63-szoros objektívvel tapogatjuk le, és videojellé alakítjuk, amit egy számítógép képernyőjén jelenítünk meg. A képernyőn megjelenő képeket Kodak Ektachrome 100 filmre fényképezzük le. Az *in vitro* vizsgálatoknál, azzal a céllal, hogy meghatározzuk a vaszkuláris simaizomsejtek oligonukleotidfelvételének időbeli lefutását, a sejteket azután 2 napig kamralemezeken szaporítjuk 10% borjúmagzatszérumot tartalmazó közegben, majd 2 perc, 30 perc, valamint 2 óra elteltével 8 μmol/l fluoreszceinnel jelzett oligonukleotidokat adunk hozzájuk. A sejteket azután háromszor mossuk PBS-sel, majd 50% acetont és 50% metanolt tartalmazó oldattal fixáljuk.

B) A sejtek antiszensz oligonukleotid felvétele

Az antiszensz oligonukleotidok intramurális bevitelét az oligonukleotidok gyors celluláris felvételének kell követni, hogy lehetővé váljon a megcélzott gén, ebben a *c-myc* expressziójának gátlása. Amint az a 31. ábrán látható, a vaszkuláris simaizomsejtek *in vitro* a fluoreszcencia preferenciális sejtmag-lokalizációját mutatja, 30 perccel a fluoreszceinnel jelzett oligonukleotidokkal való inkubáció megkezdése után. Hasonlóképpen, a sertésekben végzett *in vivo* transzkatéteres beadás után az oligonukleotidok sejtmag-lokalizációja figyelhető meg a közegben (32. ábra) és az adventiciában (33. ábra), ami *in vivo* az antiszensz oligonukleotidok összehasonlíthatóan gyors felvételét mutatja. Ennek megfelelően a vaszkuláris simaizomsejtek intracelluláris antiszensz oligonukleotid felvétele *in vitro* és *in vivo* egy kritikus időablakban történik, ami elég ahhoz, hogy a c-*myc*-protoonkogén működését befolyásolja. A *c-myc* egy nagyon fontos indukálható gén, ami az érfal sérülése után szabályozza a simaizomsejtek szaporodását.

Az alábbiakban ismertetjük a szekvenciák listáját.

A SZEKVENCIÁK JEGYZÉKE

(1) ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓ:
- (i) BENYÚJTÓ: Yi Shi és Andrew Zalewski
- (ii) A TALÁLMÁNY CÍME: Arteriovénás és graftkezelések: módszerek és készítmények
- (iii) A SZEKVENCIÁK SZÁMA: 11
- (iv) LEVELEZÉSI CÍM:
  - (A) CÍMZETT: John D. Mendlein, PhD
  - (B) UTCA: Five Palo Alto Square
  - (C) VÁROS: Palo Alto
  - (D) ÁLLAM: Kalifornia
  - (E) ORSZÁG: USA
  - (F) POSTAI IRÁNYÍTÓSZÁM: 94 306
- (v) SZÁMÍTÓGÉPES FORMA:
  - (A) A HORDOZÓ TÍPUSA: FLOPPY LEMEZ
  - (B) SZÁMÍTÓGÉP: IBM PC KOMPATIBILIS
  - (C) OPERÁCIÓS RENDSZER: Windows 3*.1/DOS 5.0
  - (D) PROGRAM: Microsoft Word for Windows, 2.0
- (vi) A JELENLEGI BENYÚJTÁS ADATAI:
  - (A) A BENYÚJTÁS SORSZÁMA:
  - (B) A BENYÚJTÁS IDŐPONTJA:
  - (C) OSZTÁLYOZÁS:
- (vii) A KORÁBBI BENYÚJTÁS ADATAI:
  - (A) A BENYÚJTÁS SORSZÁMA: PCT-benyújtás US94/11853
  - (B) A BENYÚJTÁS IDŐPONTJA: 1994. október 17.
- (VIII) ÜGYVIVŐ/ÜGYNÖK INFORMÁCIÓ:
  - (A) NÉV: John D. Mendlein, PhD
  - (B) REGISZTRÁCIÓS SZÁM: 38,770
  - (C) REFERENCIA/LAJSTROMSZÁM: LYNX–014/02US
- (IX) TELEKOMMUNIKÁCIÓS INFORMÁCIÓ:
  - (A) TELEFON: (415) 843-5020
  - (B) TELEFAX: (415) 857-0663

1. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
- (A) Hossz: 15 nukleotid
- (B) Típus: nukleinsav
- (C) Száltípus: egyszálú
- (D) Topológia: lineáris

(xi) A szekvencia leírása: 1. számú szekvencia

AACGTTGAGG GGCAT 15

2. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 15 nukleotid

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(xi) A szekvencia leírása: 2. számú szekvencia

ATGCCCCTCA ACGTT 15

3. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 15 nukleotid

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(xi) A szekvencia leírása: 3. számú szekvencia

AACGTGGATT GGCAG 15

4. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 15 nukleotid

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(xi) A szekvencia leírása: 4. számú szekvencia

GAACGGAGAC GGTTT 15

5. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 24 nukleotid

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(xi) A szekvencia leírása: 5. számú szekvencia

TATGCTGTGC CGGGGTCTTC GGGC 24

6. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 19 nukleotid

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(xi) A szekvencia leírása: 6. számú szekvencia

GGGAGAGTCG CGTCCTTGCT 20

7. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 20 nukleotid

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(xi) A szekvencia leírása: 7. számú szekvencia

TCATGGAGCA CCAGGGGCTC 20

8. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 20 nukleotid

(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(xi) A szekvencia leírása: 8. számú szekvencia
TCATGGAGCA CCAGGGGCTC 20

9. számú szekvenciavázlat
(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 20 nukleotid
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(xi) A szekvencia leírása: 9. számú szekvencia
GGCCTTTTCA TTGTTTTCCA 20

10. számú szekvenciavázlat
(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 17 nukleotid
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(xi) A szekvencia leírása: 10. számú szekvencia
CATTGTTTTC CAACTCC 17

11. számú szekvenciavázlat
(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 17 nukleotid
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(xi) A szekvencia leírása: 11. számú szekvencia
TTCATTGTTT TCCAATT 17

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. *c-myc*-re vagy *c-myb*-re specifikus antiszensz oligonukleotid alkalmazása vaszkuláris graft kezelésére szolgáló gyógyászati készítmény előállítására.

2. Az 1. igénypont szerinti oligonukleotid alkalmazása, ahol a vaszkuláris graft prosztetikus fisztula, arteriovénás sönt, natív fisztula, vénás graft, immunszuppresszív allograft, immunszuppresszív xenograft vagy vénás autograft.

3. Az 1. igénypont szerinti oligonukleotid alkalmazása, ahol a vaszkuláris graft hemodialízises hozzáférési helyet jelent.

4. A 3. igénypont szerinti oligonukleotid alkalmazása, ahol a hemodialízises hozzáférési hely Brescia–Cimino-fisztula, snuffboxfisztula, felkarfisztula, PTFE hemodialízises graft, renyhe karotid artériagraft vagy autogén graft lehet.

5. Az 1–4. igénypontok bármelyike szerinti oligonukleotid alkalmazása, ahol az oligonukleotid *c-myc*-re specifikus.

6. Az 1–4. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol az oligonukleotid *c-myb*-re specifikus.

7. Az 1–4. igénypontok bármelyike szerinti oligonukleotid alkalmazása, ahol az oligonukleotid az 1., 5., 6. vagy 7. számú szekvencialista szerinti.

8. Az 1–7. igénypontok bármelyike szerinti oligonukleotid alkalmazása, ahol az oligonukleotid a perivaszkuláris szövetbe való bejuttatásra szolgáló implantátumban vagy rezervoárban helyezkedik el.

9. Az 1–8. igénypontok bármelyike szerinti oligonukleotid alkalmazása, ahol az oligonukleotid nukleázra rezisztens és 12–60 nukleotid hosszúságú.

10. Eljárás egy véna *ex vivo* graftként való alkalmazására, amelynek során azt egy *c-myc*-re *vagy c-myb*-re specifikus oligonukleotiddal hozzuk érintkezésbe.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, ahol a vénát legalább 10 percig inkubáljuk az oligonukleotiddal steril és fiziológiailag elfogadható pufferben.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, ahol a fiziológiailag elfogadható pufferként 20–37 °C közötti hőmérsékletű pufferben inkubálunk.

13. A 10–12. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, ahol 10–200 μM koncentrációjú oligonukleotidot alkalmazunk.

14. A 10–13. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, ahol vénaként alsóvégtagi (rózsa) vénát, fejvivőeret, könyökhajlati vénát, kari vénát vagy femorális vénát alkalmazunk.

15. A 10–14. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, ahol az oligonukleotidként *c-myc*-re specifikus oligonukleotidot alkalmazunk.

16. A 10–14. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, ahol oligonukleotidként az 1., 5., 6. vagy 7. számú szekvencialista szerinti oligonukleotidot alkalmazunk.

17. Készítmény, amely egy izolált vaszkuláris graftot és a vaszkuláris graft legalább egy rétegében elhelyezkedő antiszensz oligonukleotidot tartalmaz, ahol az oligonukleotid *c-myc*-re vagy *c-myb*-re specifikus.

18. A 17. igénypont szerinti készítmény, ahol a graft prosztetikus fisztula, arteriovénás sönt, natív vénás fisztula, vénás graft, immunszuppresszív allograft, immunszuppresszív xenograft vagy vénás autograft.

19. A 17. igénypont szerinti készítmény, ahol a graft egy kimetszett humánkompatibilis véna.

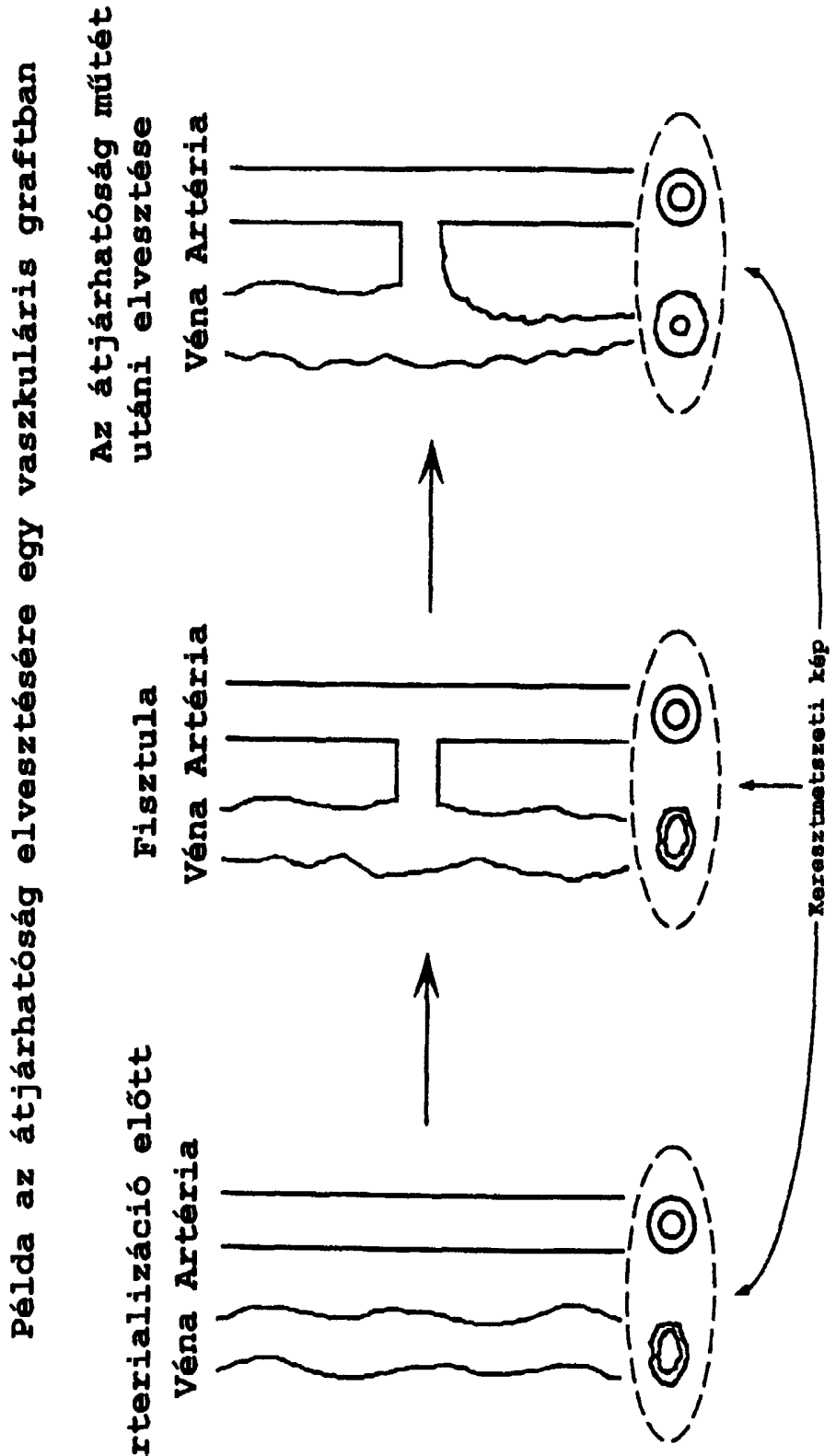
20. A 19. igénypont szerinti készítmény, ahol a kimetszett humánkompatibilis véna alsóvégtagi (rózsa) véna, fejvivőér, könyökhajlati véna, kari véna vagy femorális véna.

21. A 17–19. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, ahol az oligonukleotid az érfal legalább egy rétegében helyezkedik el, amely réteg az endoteliális réteg, a középréteg vagy a járulékos réteg.

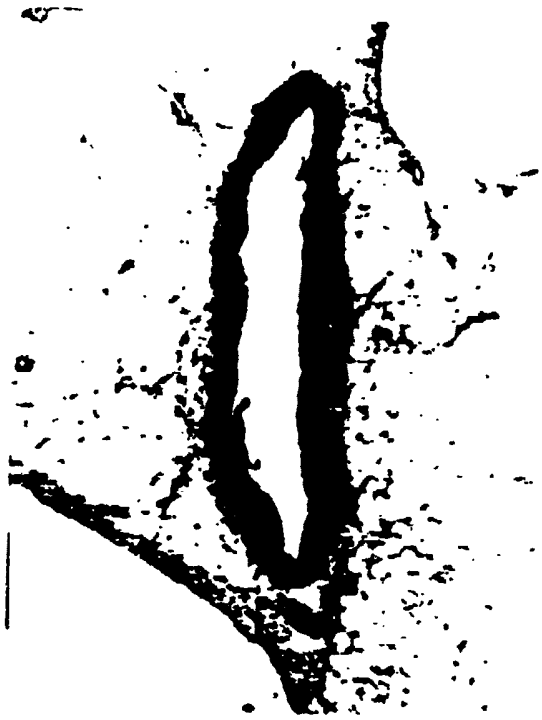
22. A 21. igénypont szerinti készítmény, ahol az oligonukleotid koncentrációja legalább 10 μM az említett legalább egy rétegben.

23. A 17–22. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, ahol az oligonukleotid *c-myc*-re specifikus.

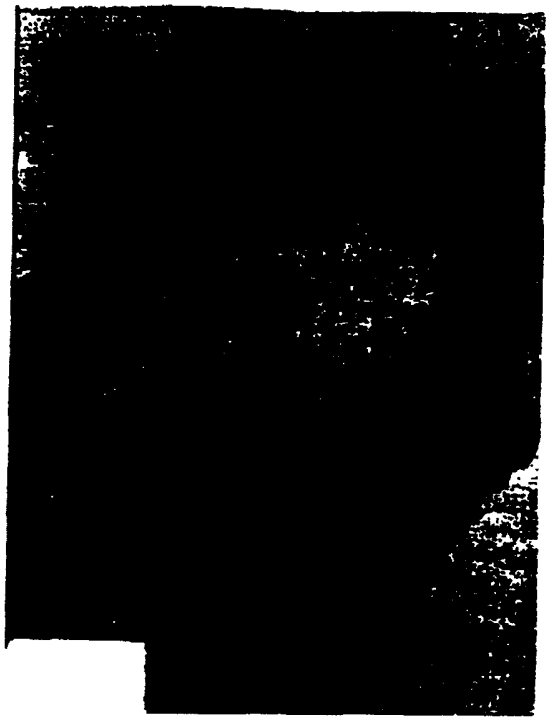
24. A 17–22. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, ahol az oligonukleotid az 1., 5., 6. vagy 7. számú szekvencialista szerinti.


Példa az átjárhatóság elvesztésére egy vaszkuláris graftban
Arterializáció előtt
Véna Artéria
Fisztula
Véna Artéria
Az átjárhatóság műtét utáni elvesztése
Véna Artéria
Keresztmetszeti kép

1. ábra



2a. ábra



2b. ábra



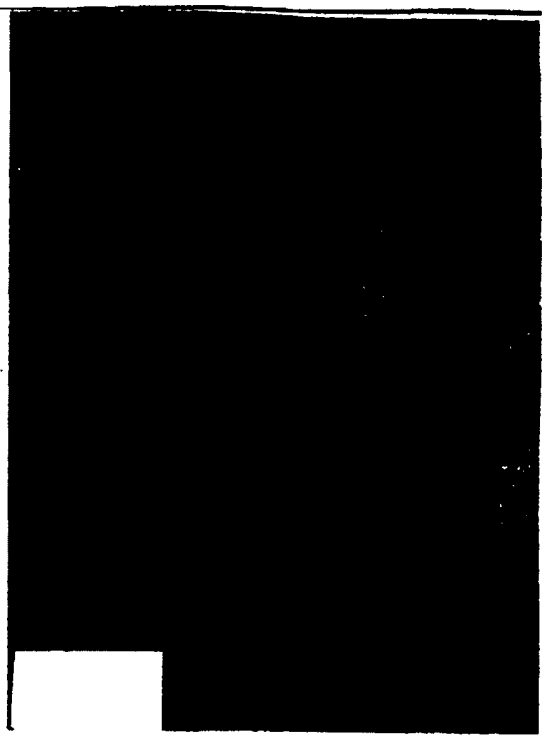
3a. ábra



3b. ábra



4a. ábra



4b. ábra



4c. ábra



5a. ábra



5b. ábra



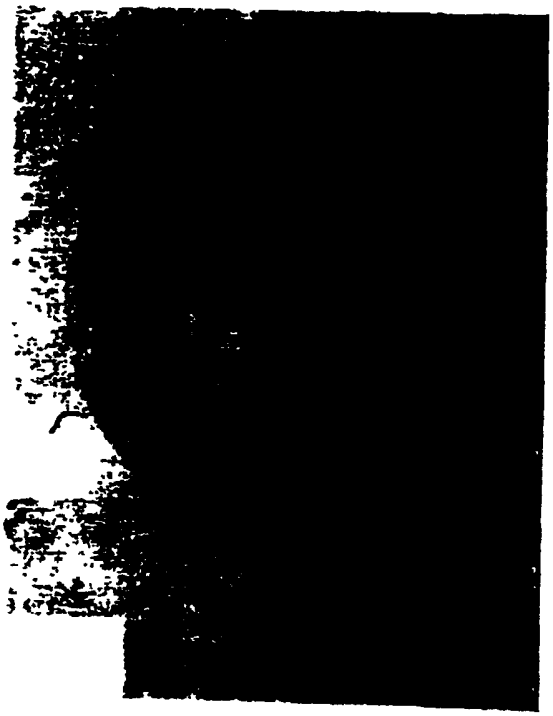
5c. ábra



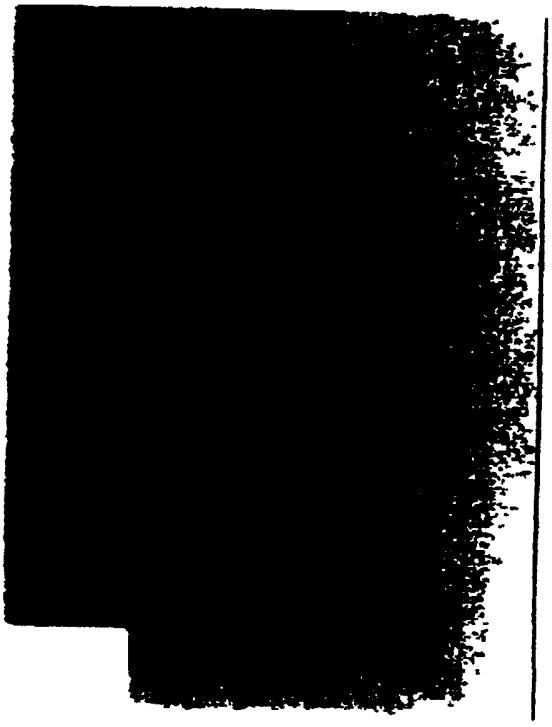
6a. ábra



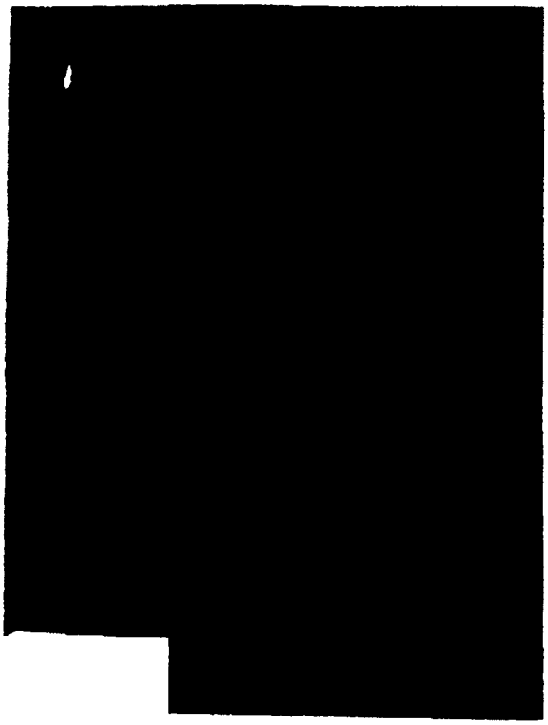
6b. ábra



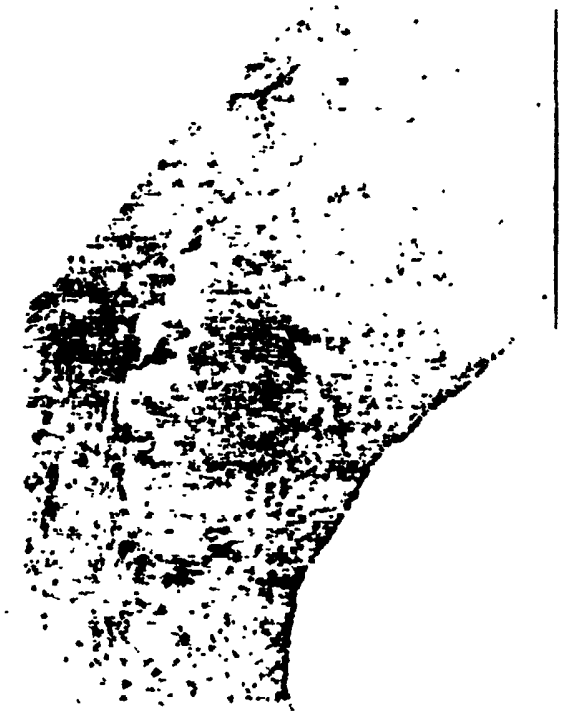
6c. ábra



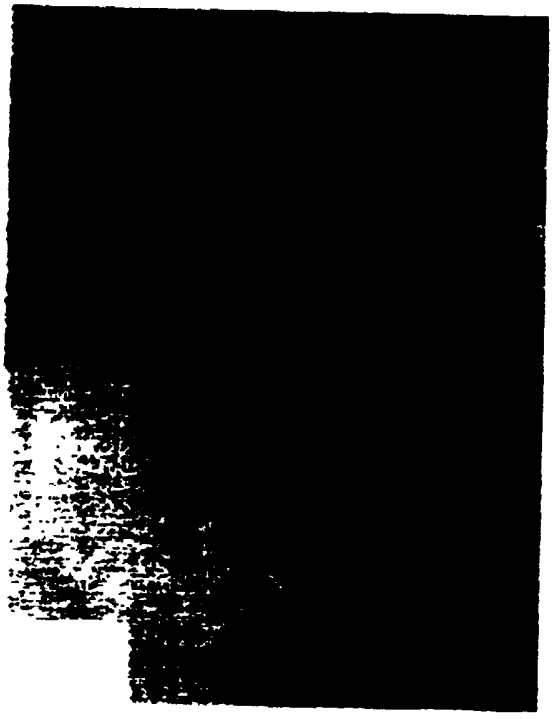
6d. ábra



7a. ábra



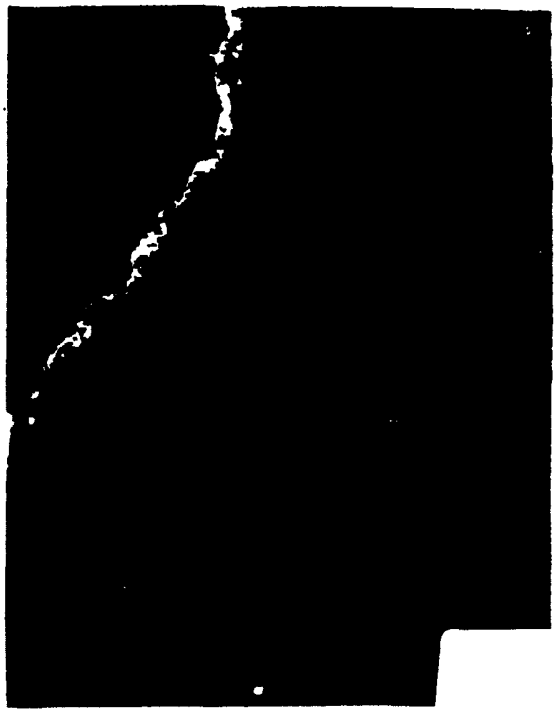
7b. ábra



7c. ábra



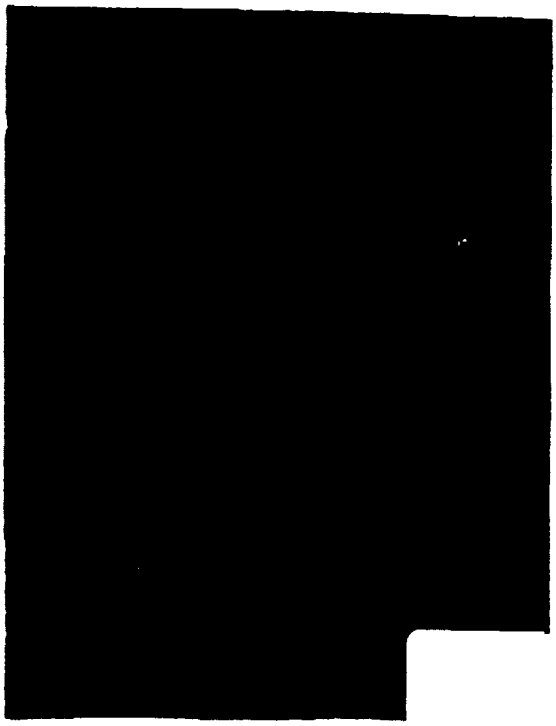
8a. ábra



8b. ábra



8c. ábra



8d. ábra



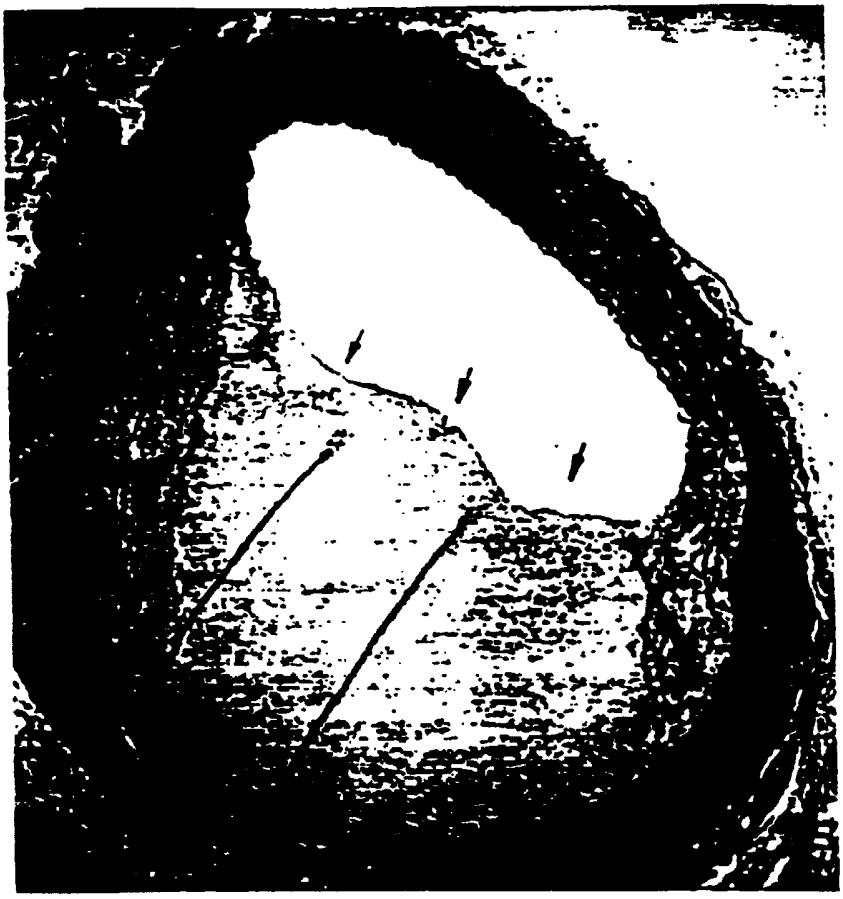
9a. ábra



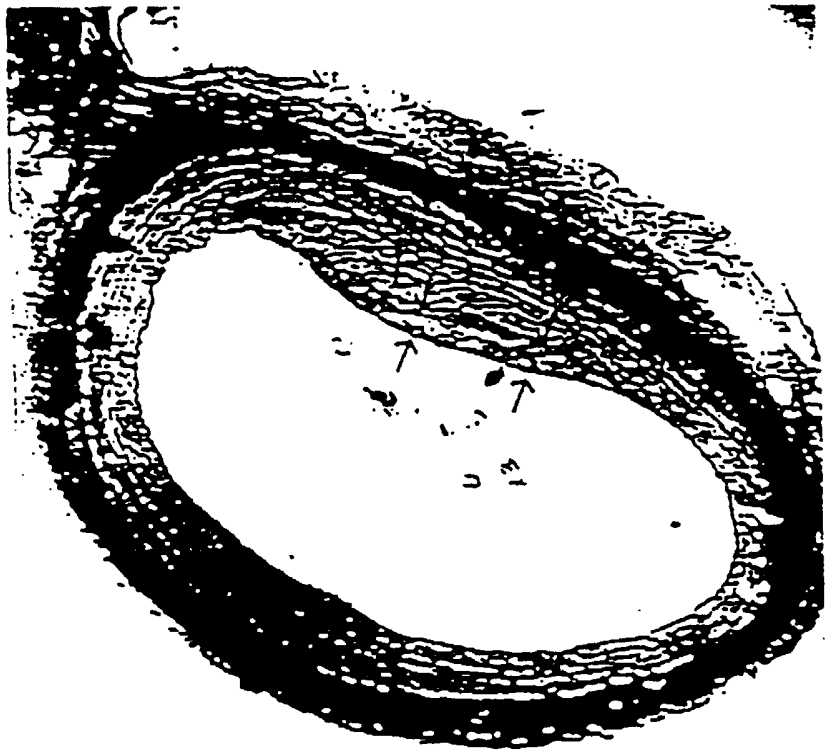
9b. ábra



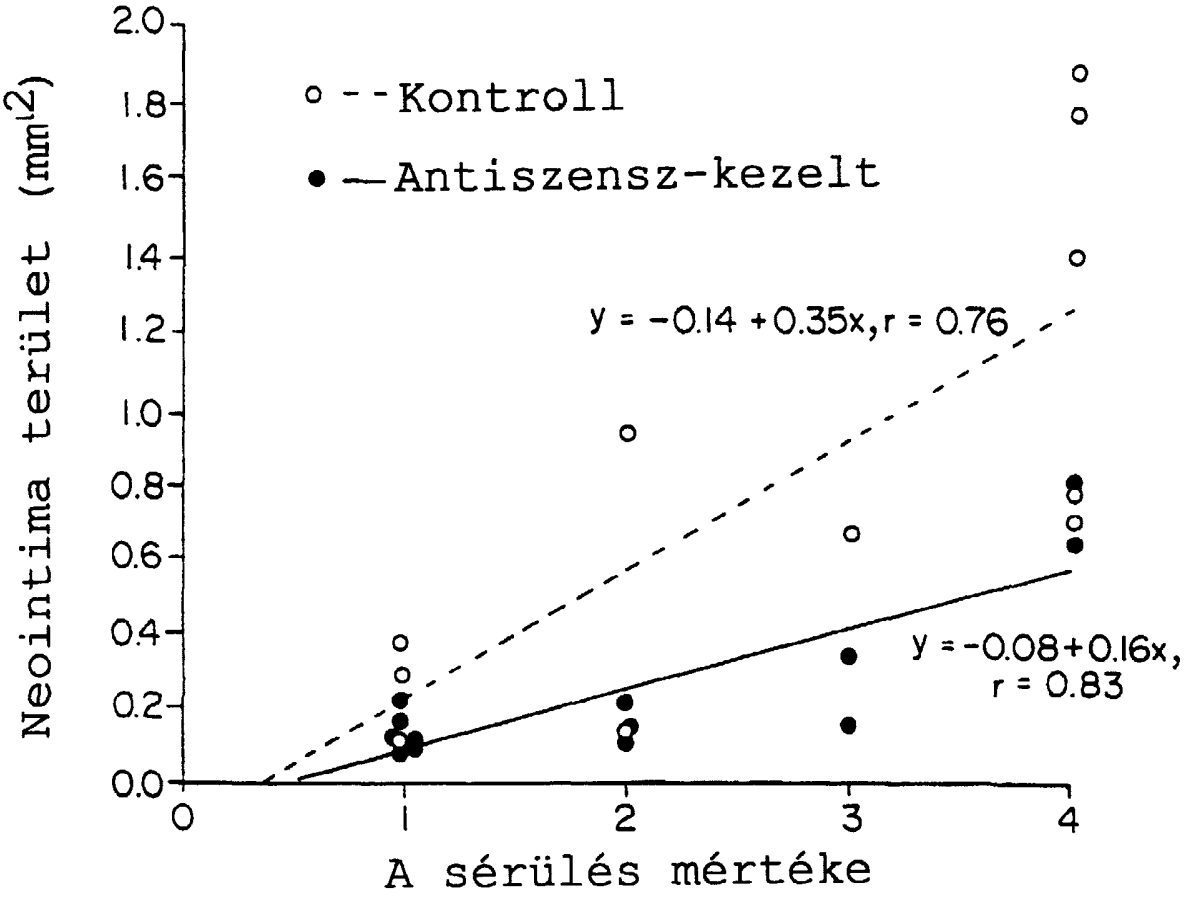
9c. ábra



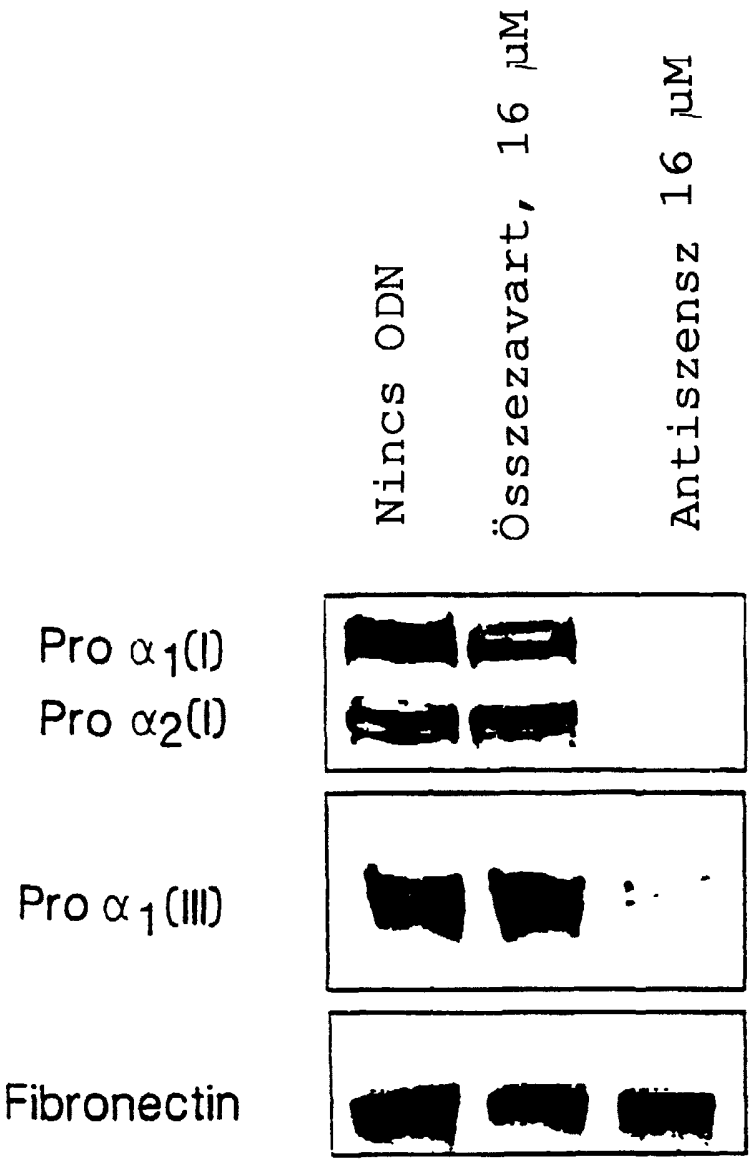
10. ábra



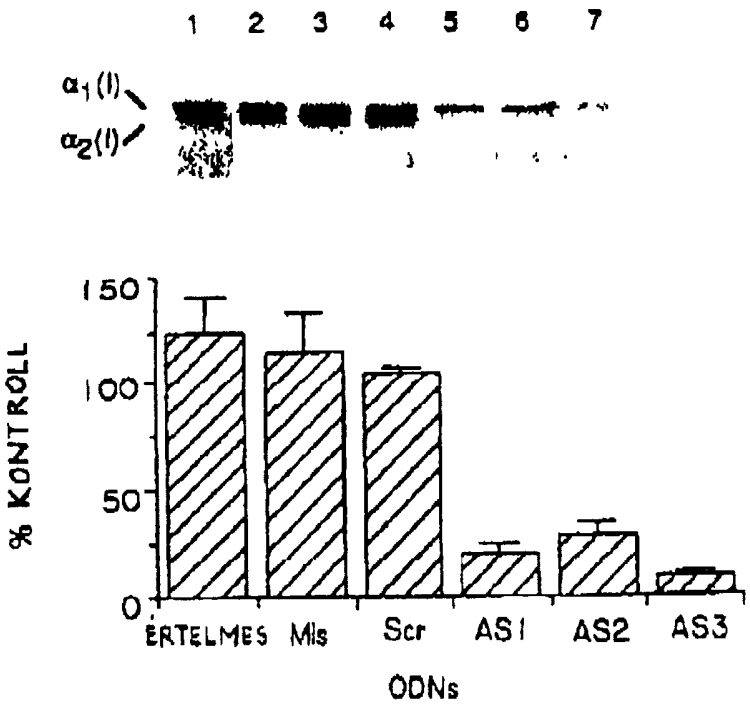
11. ábra


Neointima terület (mm2)
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
1
2
3
4
A sérülés mértéke
o - - Kontroll
• — Antiszensz-kezelt
y = -0.14 + 0.35x, r = 0.76
y = -0.08 + 0.16x,
r = 0.83

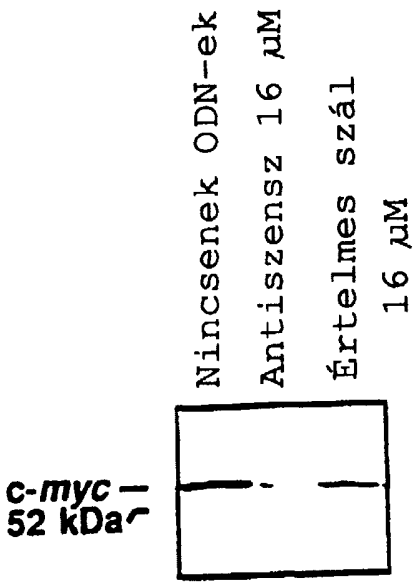
12. ábra


Nincs ODN
Összezavart, 16 μM
Antiszensz 16 μM
Pro α1(I)
Pro α2(I)
Pro α1(III)
Fibronectin

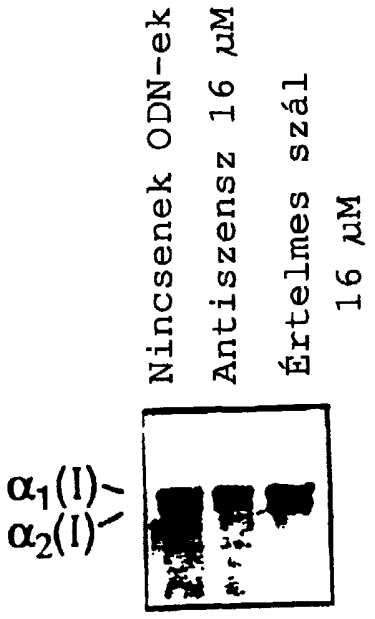
13. ábra


1 2 3 4 5 6 7
α1(I)
α2(I)
150
100
50
0
% KONTROLL
ÉRTELMES
Mis
Scr
AS1
AS2
AS3
ODNs

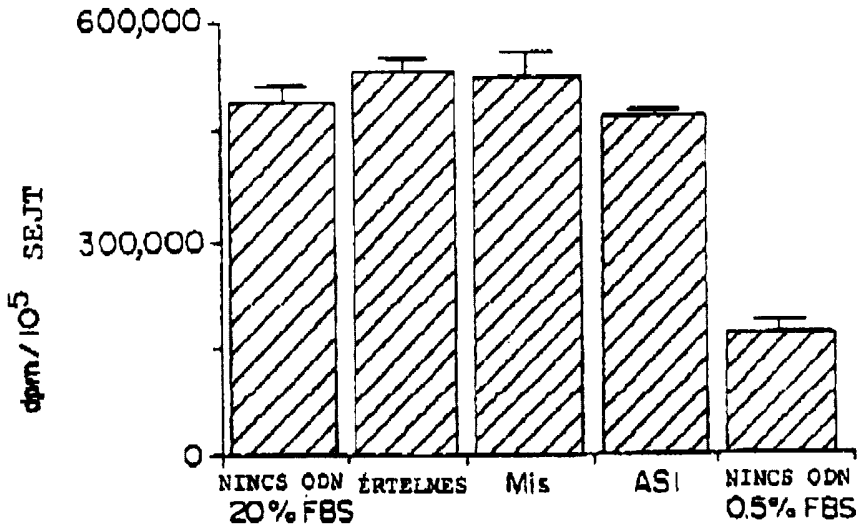
14. ábra



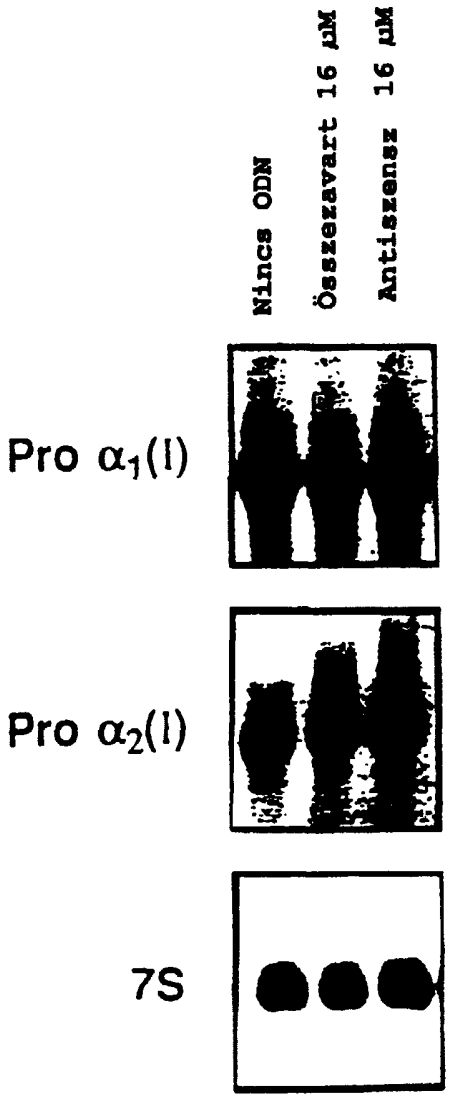
15. ábra



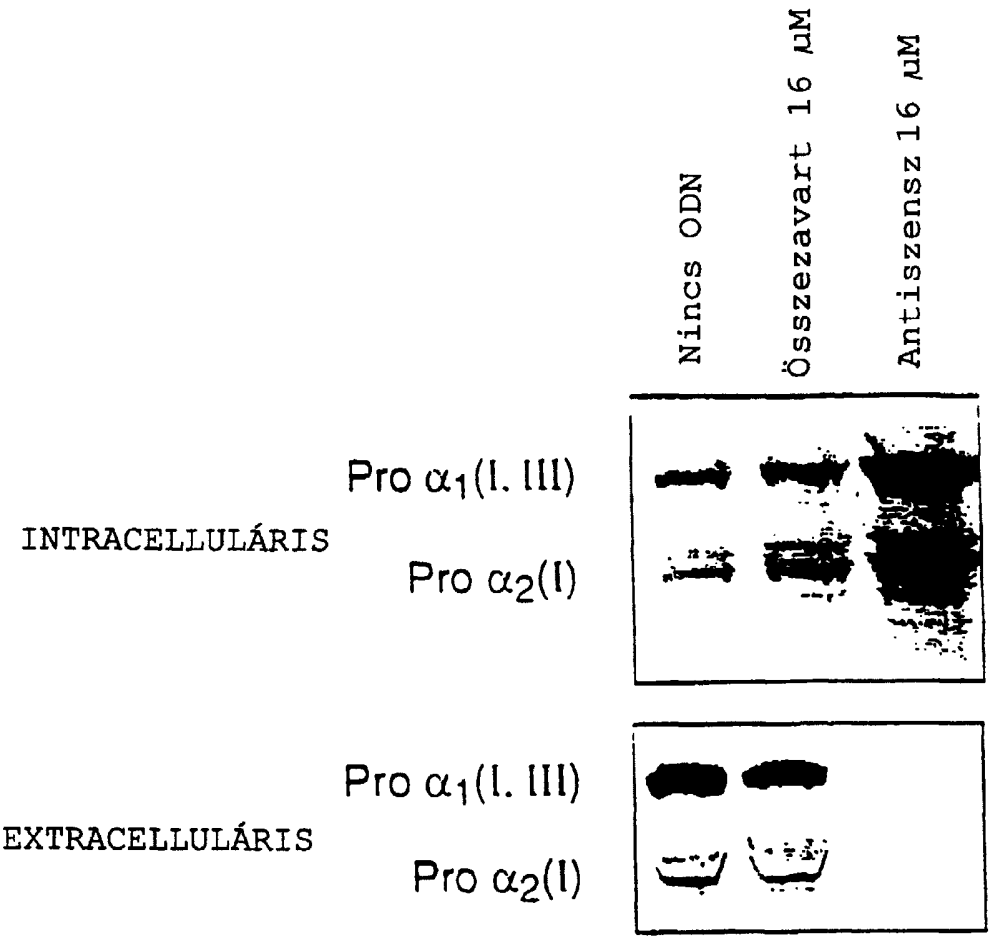
17. ábra


600,000
300,000
0
dpm/10^5 SEJT
NINCS ODN
20% FBS
ÉRTELMES
Mis
ASI
NINCS ODN
0.5% FBS

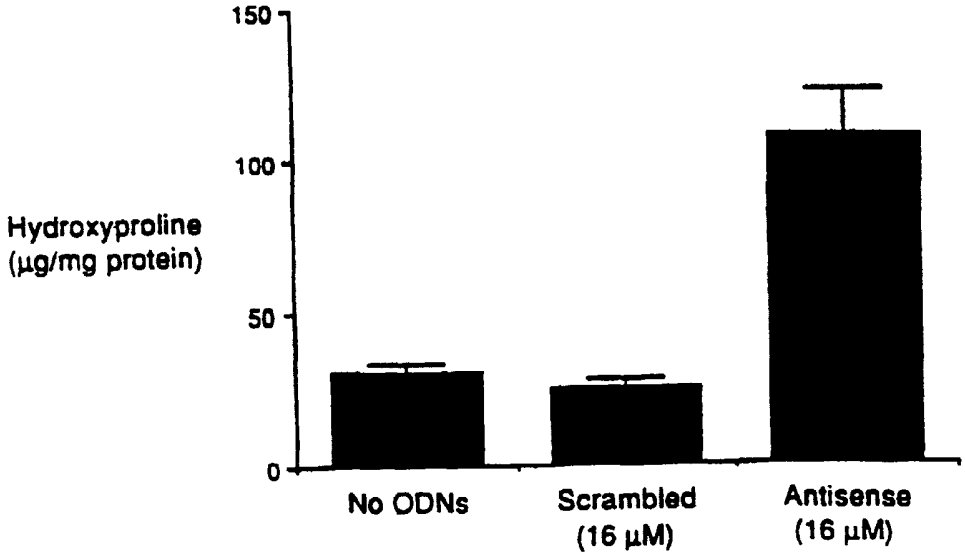
16. ábra


Nincs ODN
Összezavart 16 μM
Antiszensz 16 μM
Pro α1(I)
Pro α2(I)
7S

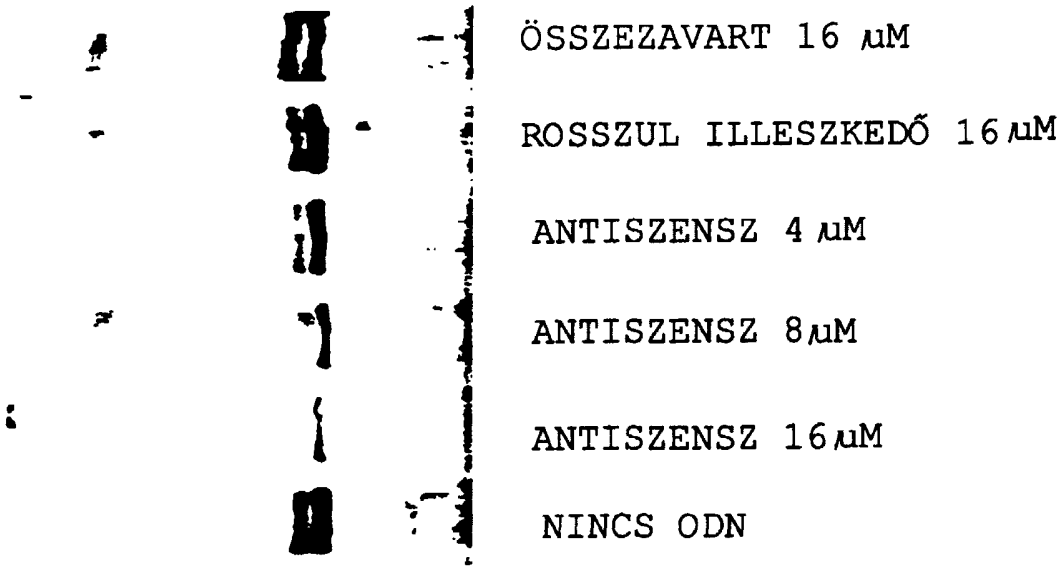
18. ábra



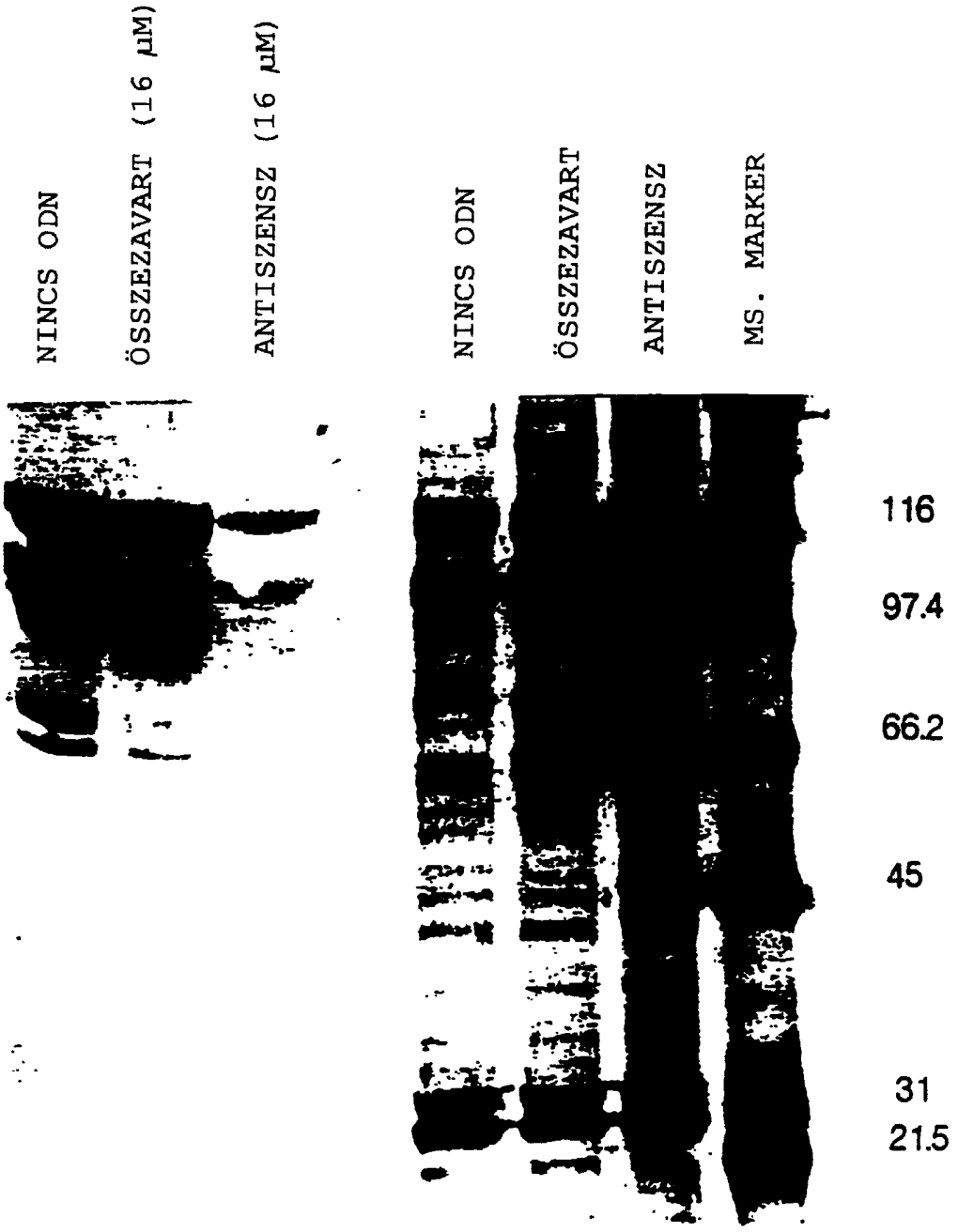
19. ábra



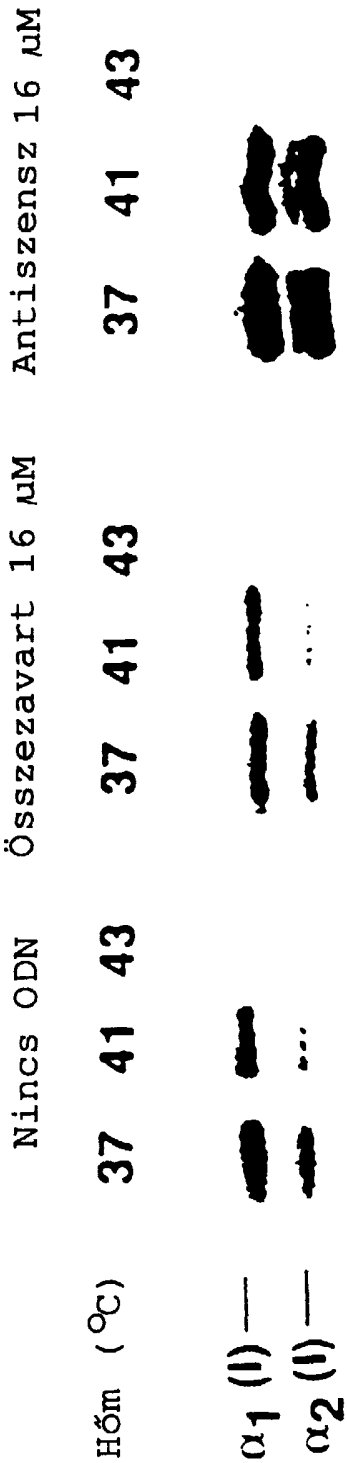
20. ábra


ÖSSZEZAVART 16 µM
ROSSZUL ILLESZKEDŐ 16 µM
ANTISZENSZ 4 µM
ANTISZENSZ 8 µM
ANTISZENSZ 16 µM
NINCS ODN

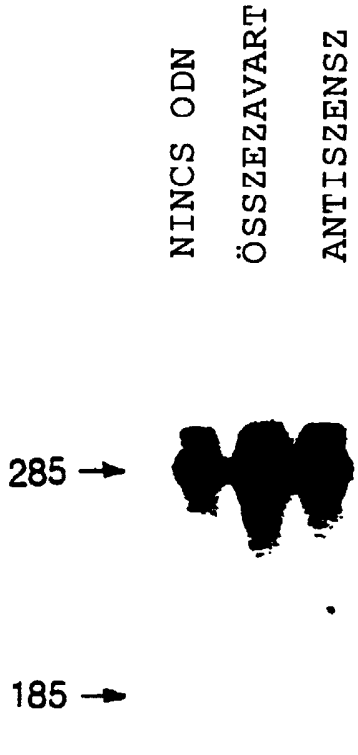
21. ábra


NINCS ODN
ÖSSZEZAVART (16 µM)
ANTISZENSZ (16 µM)
NINCS ODN
ÖSSZEZAVART
ANTISZENSZ
MS. MARKER
116
97.4
66.2
45
31
21.5
EXTRACELLULÁRIS
INTRACELLULÁRIS

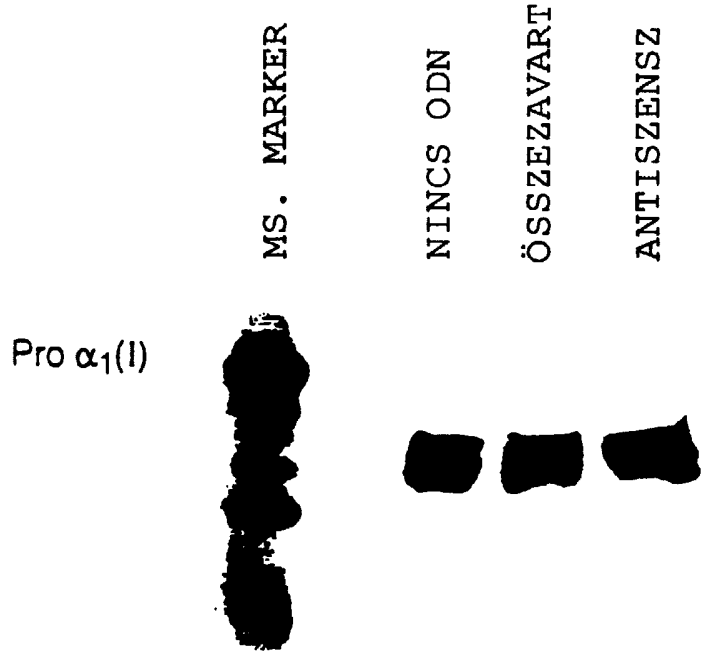
22. ábra


Nincs ODN
Összezavart 16 μM
Antiszensz 16 μM
Hőm (°C)
37 41 43
37 41 43
37 41 43
α1 (I) —
α2 (I) —

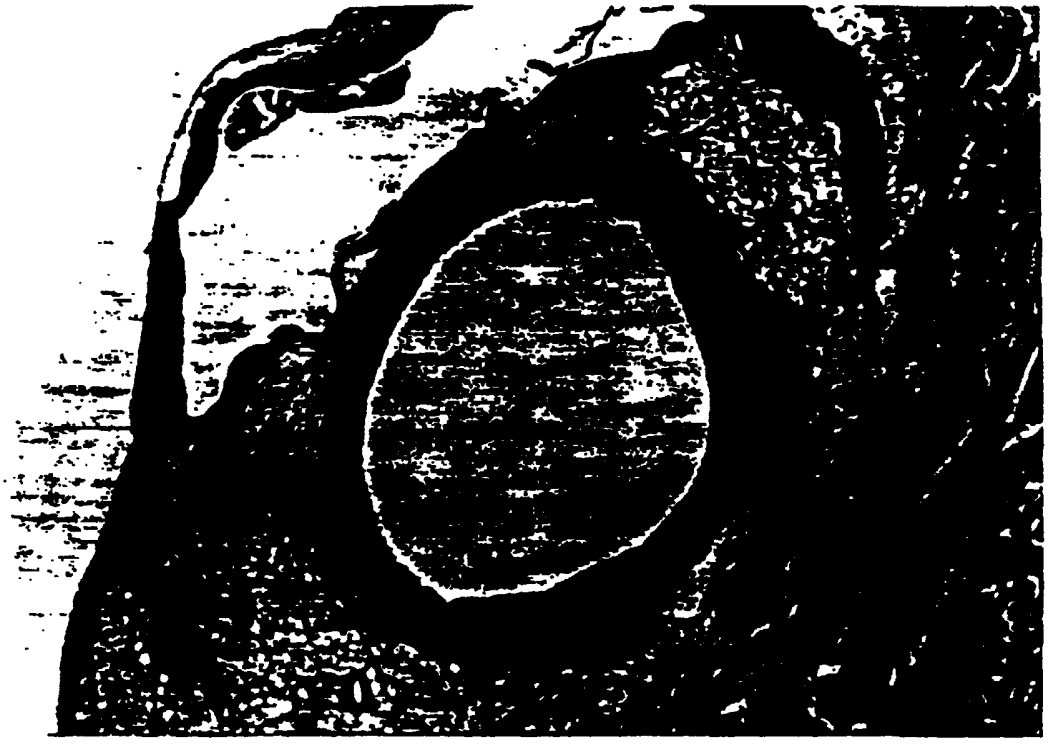
23. ábra



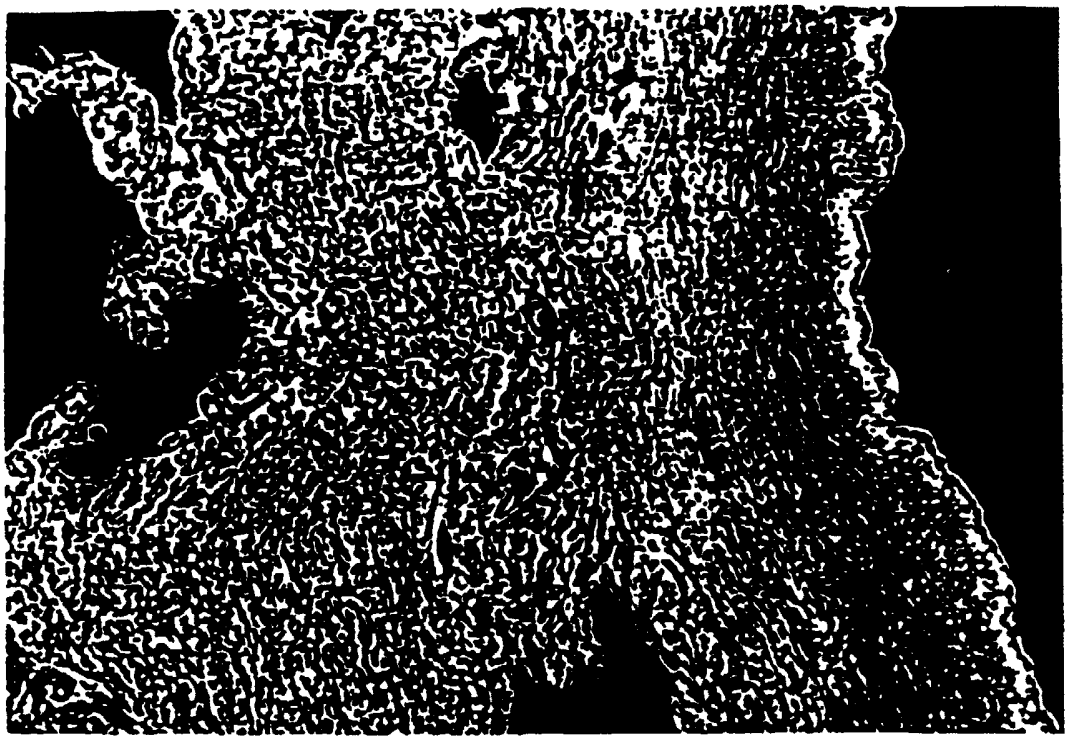
24. ábra



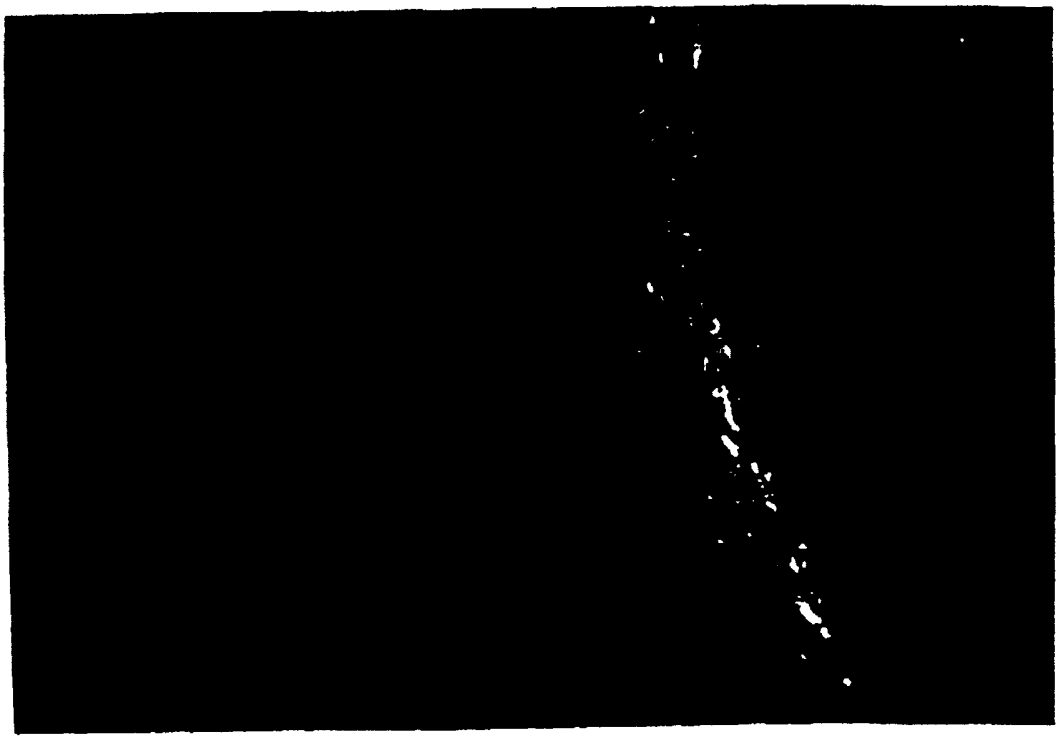
25. ábra



26. ábra



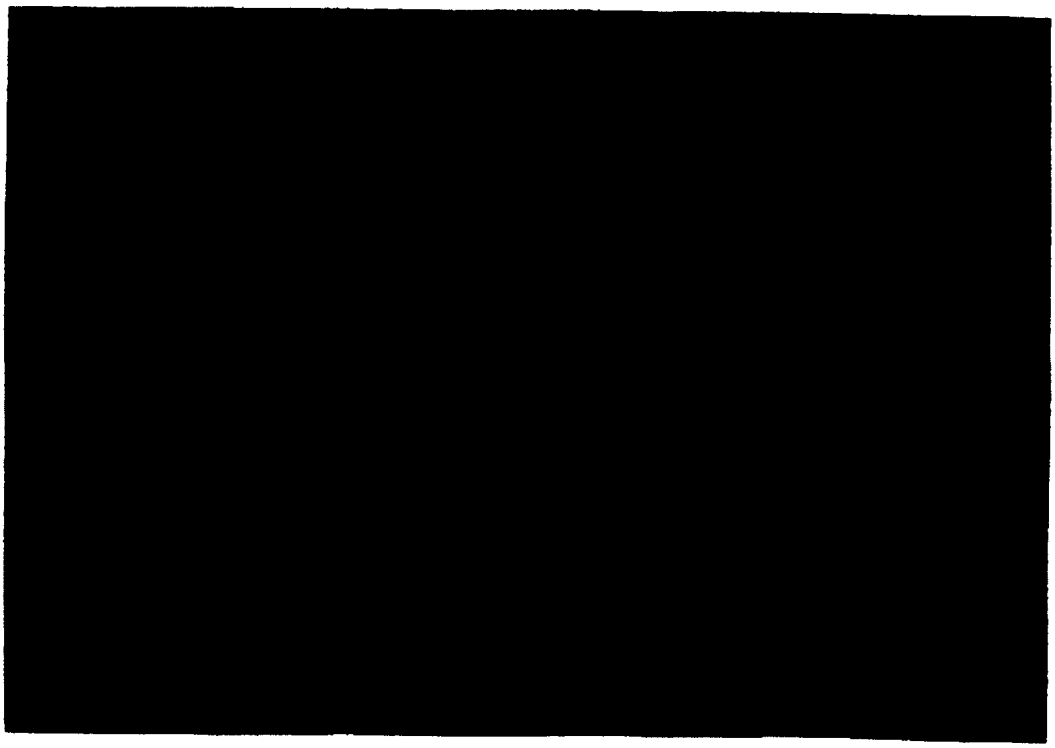
27a. ábra



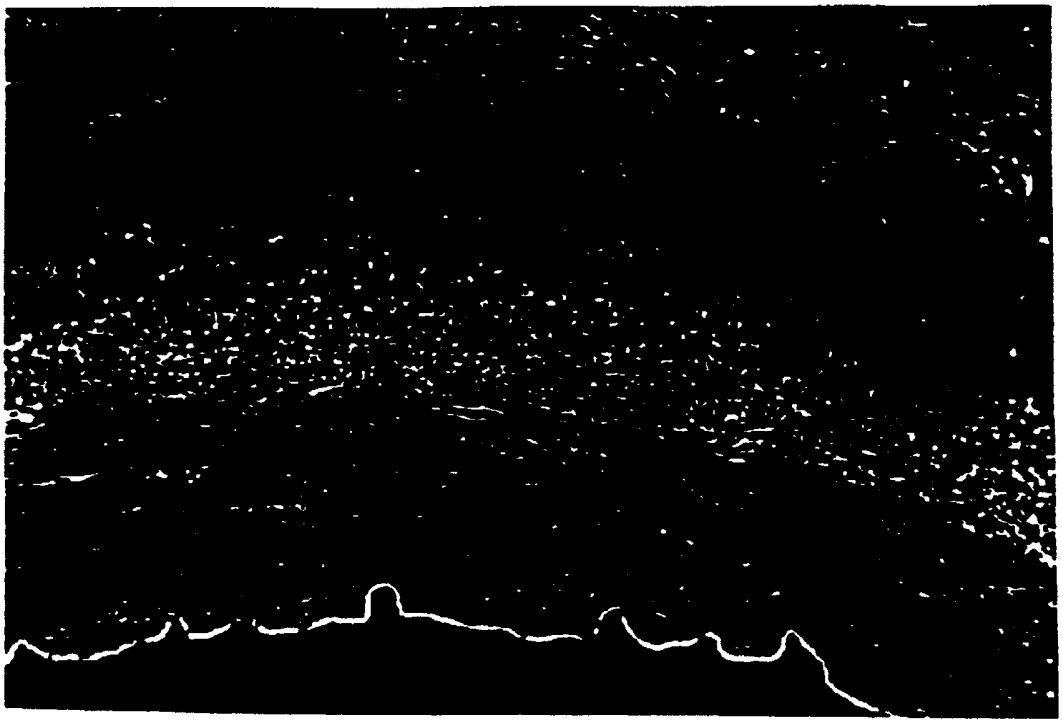
27b. ábra



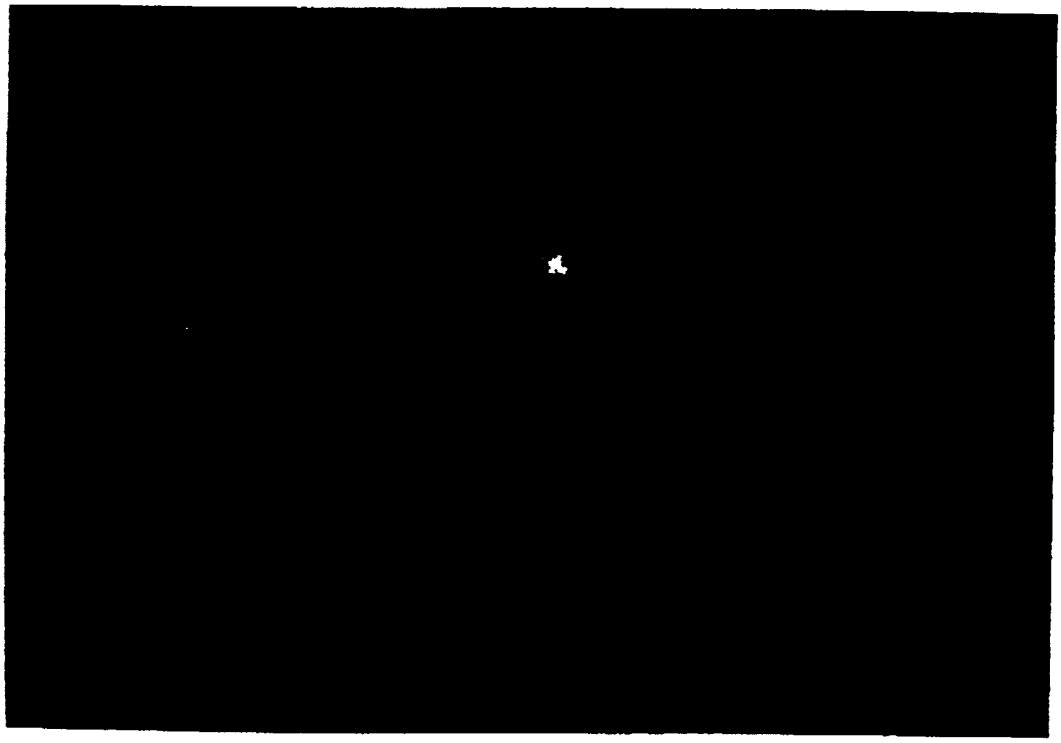
27c. ábra



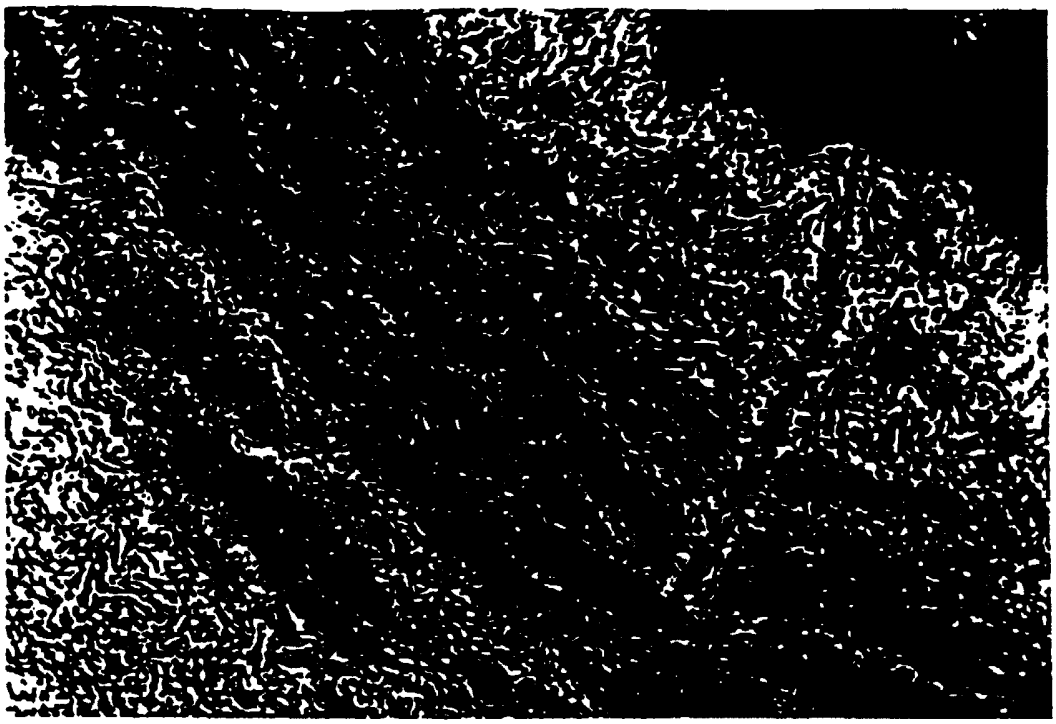
27d. ábra



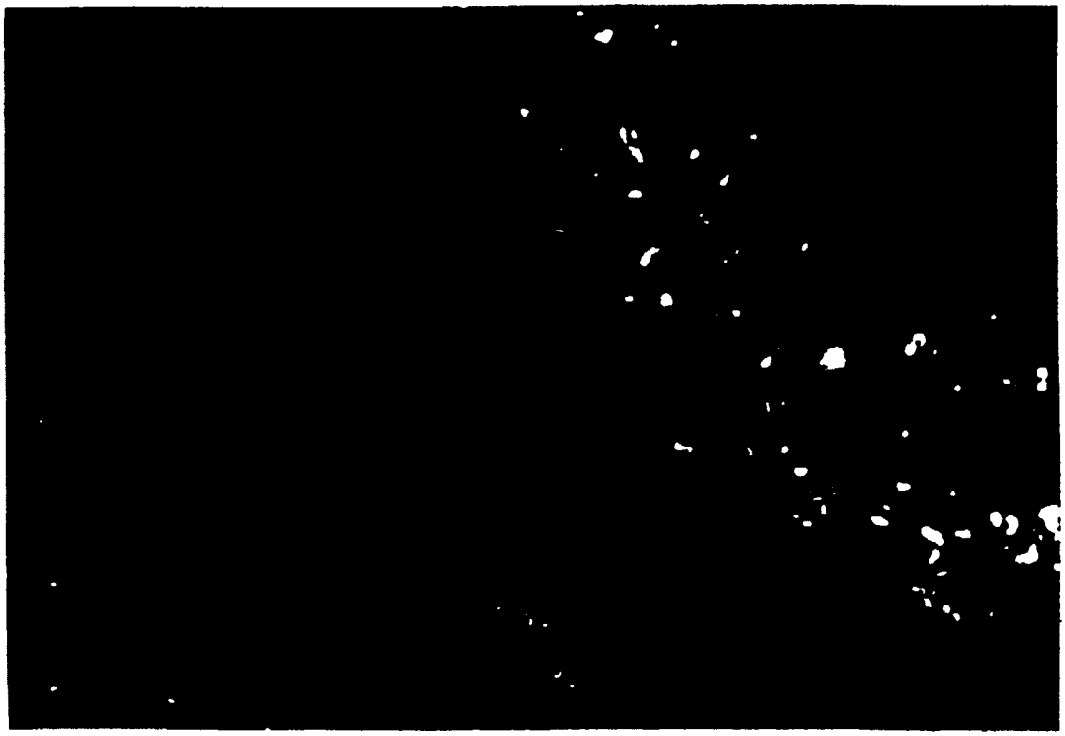
27e. ábra



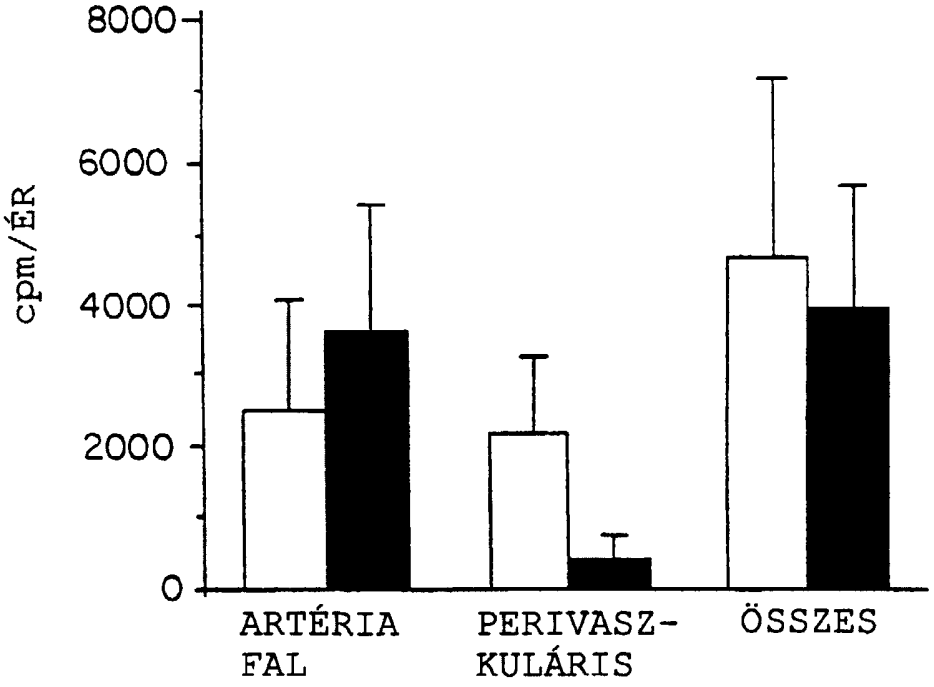
27f. ábra



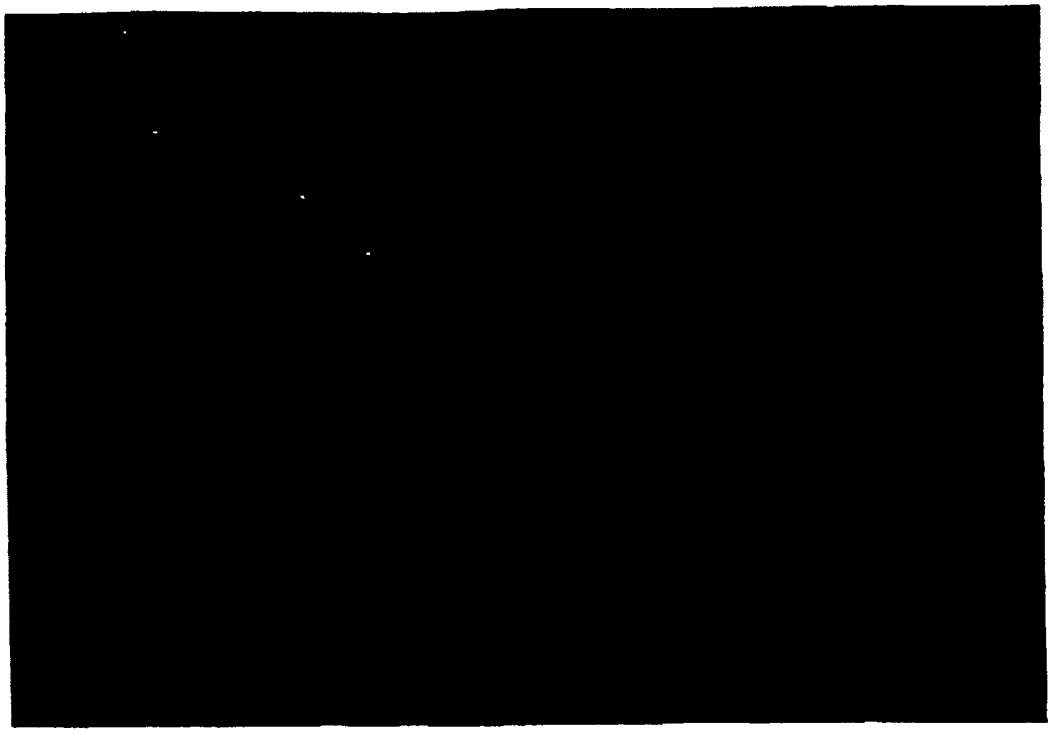
28a. ábra



28b. ábra


8000
6000
4000
2000
0
cpm/ÉR
ARTÉRIA FAL
PERIVASZ-KULÁRIS
ÖSSZES

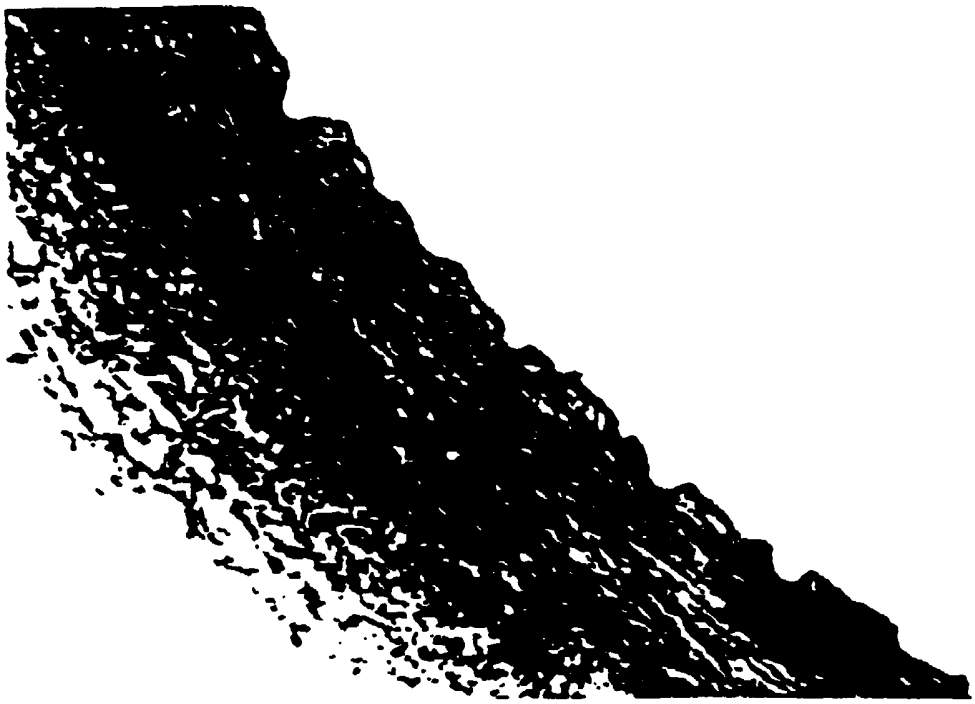
29. ábra



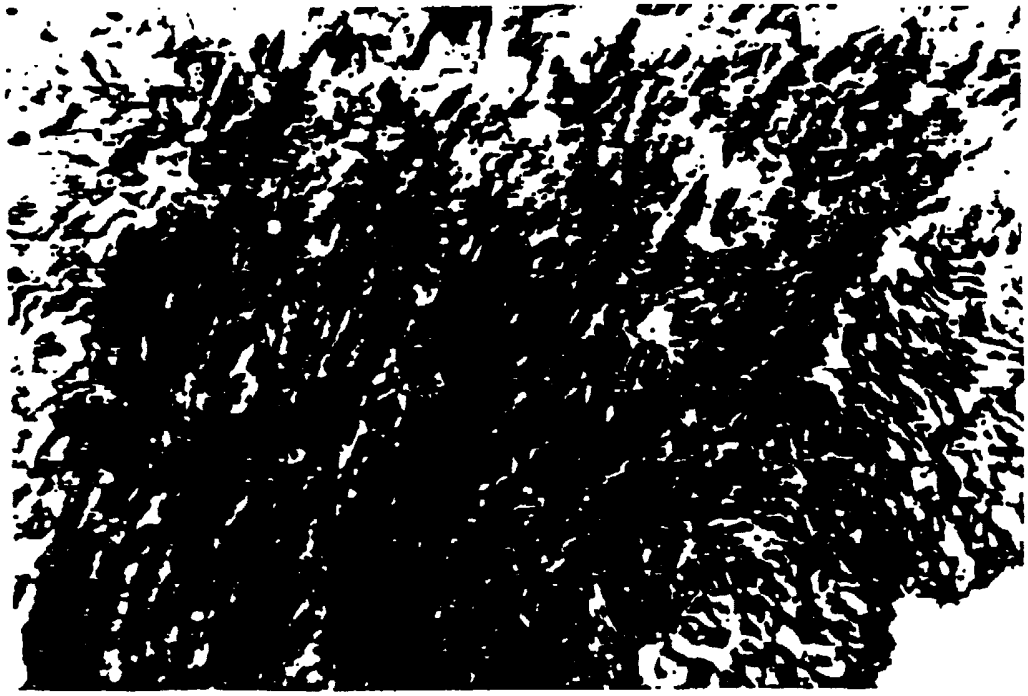
30a. ábra



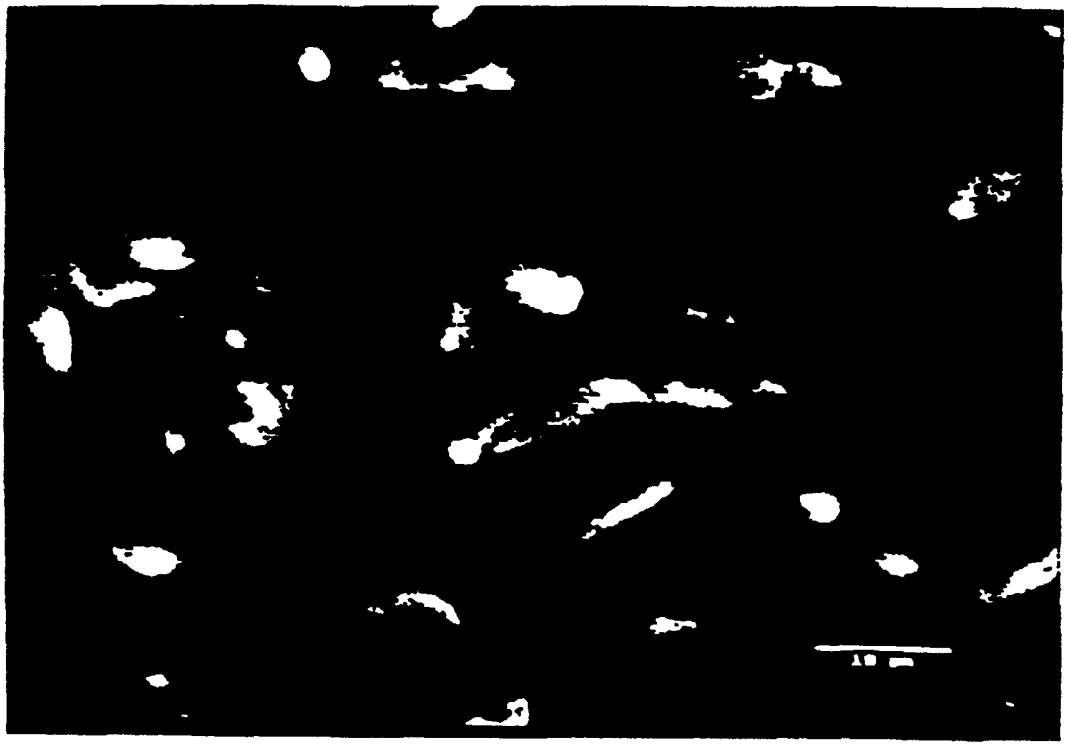
30b. ábra



30c. ábra



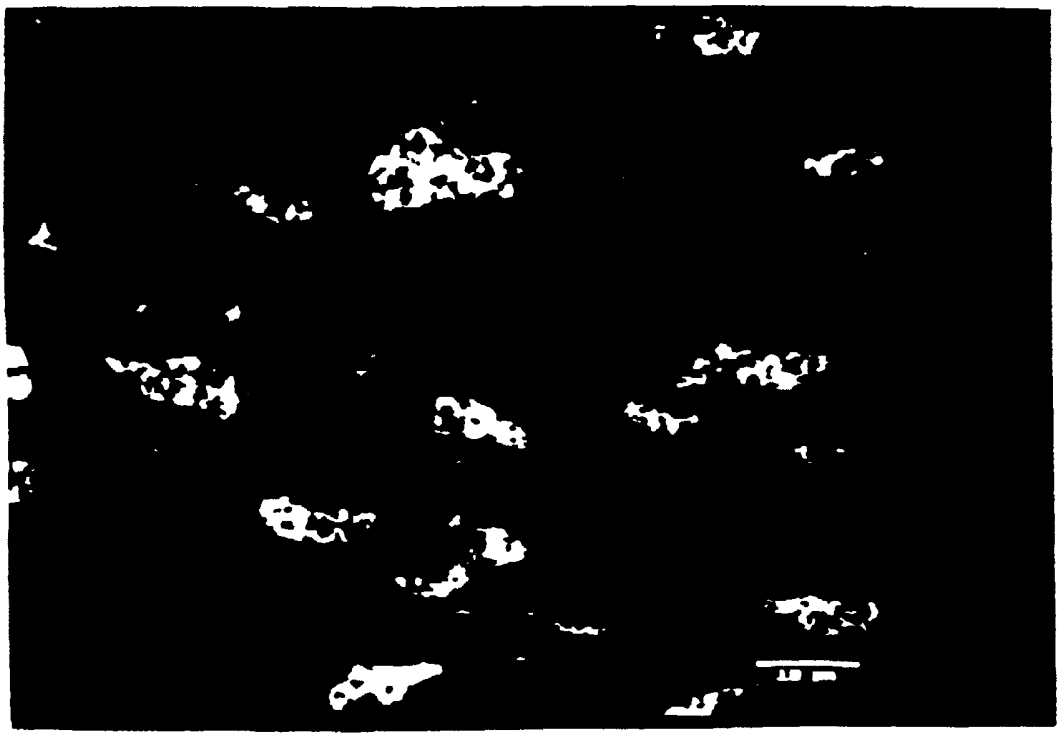
30d. ábra



31. ábra



32. ábra



33. ábra