(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 963581 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 963581

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C07H 21/04
C07H 19/16
A61K 31/7125
C12Q 1/68

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **20.03.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **11.09.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **08.11.1996**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **20.03.1995 PCT/US1995/003575**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

18.03.1994 US 210505 18.03.1994 US 214599

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Lynx Therapeutics Inc.,** 3832 Bay Center Plaza, Hayward, Cal. 94545, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Gryaznov, Sergei M.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • **Schultz, Ronald G.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 • **Chen, Jer-kang,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab, Iso Roobertinkatu 4 - 6 A, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Oligonukleotidi-N3'->P5'-fosforiamidaatit: synteesi ja yhdisteet; hybr idisaatio ja nukleaasinsieto-ominaisuudet

Oligonukleotid-N3'->P5'-fosforamidater:syntes och substanser; hybridis ering och resistensegenskaper mot nukleas

Oligonukleotidi N3'→P5' fosforamidaatit: Synteesi ja yhdisteet; hybridisaatio ja nukleaasiresistenssiominaisuudet

Keksinnön ala

Tämä keksintö koskee N3'→P5' fosforamidattien yhdisteitä ja koostumuksia, synteesimenetelmiä ja hybridisaatio- ja nukleaasiresistenssimenetelmiä käyttäen oligonukleotidi N3'→P5' fosforamidaatteja.

Keksinnön taustaa

Oligonukleotidejä on ehdotettu voimakkaina diagnostisina yhdisteinä ja uusina rationaalisesti suunniteltuina terapeuttisina aineina (Uhlman, 1990; Helene, et al., 1990; Helene, 1991). Näiden yhdisteiden toimintamekanismi perustuu niiden spesifiseen vuorovaikutukseen kiinnostavien RNA- tai DNA-alueiden kanssa.

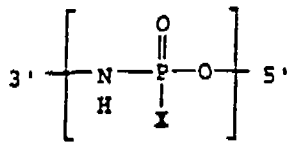
Luonnollisen fosfodiesterinukleosidin välisen sidoksen useita modifikaatioita {fosfomono- (Eckstein, et al., 1985; Cohen, 1993) tai ditioaatti (Marshall, et al., 1993), metyylifosfonaatti (Miller, 1991), fosfodiesteriamidaatti (Letsinger, et al., 1988; Froehler, et al., 1988)} on otettu käytäntöön parantamaan (i) oligomeerien stabiilisuutta biologisissa väliaineissa ja (ii) oligomeerien hybridisaatio-ominaisuuksia.

Valitettavasti valtava enemmistö näistä analogeista osoittaa alentunutta sitoutumista kohteena olevan RNA- tai DNA-säikeiden kanssa dupleksin tai tripleksin muodostumisen kautta (Kibler-Herzog, et al., 1991). Lisäksi, stereoisomeerien läsnäolo fosforissa joissakin näistä analogeista voi tehdä sitoutumiskuviot vapaiden nukleiinihappojen kanssa monimutkaisiksi (LaPlauche, et al., 1986; Bower, et al., 1987; Tidd, et al., 1988).

Keksinnön yhteenveto

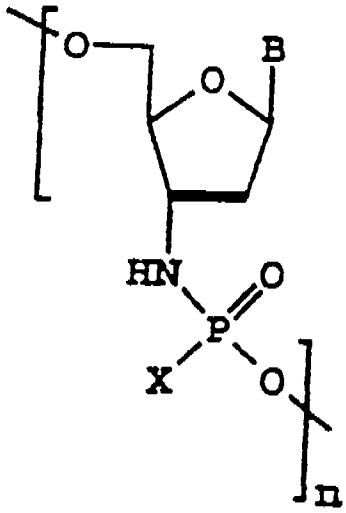
Tämän keksinnön menetelmät, yhdisteet ja koostumukset koskevat oligodeoksiribonukleotidejä, joissa viereiset nukleosidialayksiköt on yhdistetty alayksiköiden välisillä sidoksilla. Oligonukleotideissä ainakin 2 viereistä alayksikköä yhdistetään N3'→P5' fosforamidaattialayksikön välisillä, tai enemmän kuin 3 alayksikköjen välisten sidosten kokonaismäärästä on N3'→P5' fosforamidaattialayksikön välisiä sidoksia.

Tyypillinen N3'→P5' fosforamidaattialayksikön välinen sidos on:



Jossa X on $-O^-$, -OR tai -R, ja R valitaan ryhmästä, joka koostuu alkyylistä, alkenyylistä, aryylistä ja aralkyylistä.

Tyypillinen N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidi on:



Kaava 1

Jossa X on $-O^-$, -OR tai -R, ja R valitaan ryhmästä, joka koostuu alkyylistä, alkenyylistä, aryylistä ja aralkyylistä, n on 4 - 100 ja B on emäs. Normaalisti 5' happi on joko sitoutunut vetyyn tai toiseen nukleotidiin oligonukleotidissä ja 3' happi on sitoutunut toiseen nukleotidiin oligonukleotidissä. Näiden tyypillisten substituenttiryhmien määritelmiä varten katso Määritelmät-kappale alla.

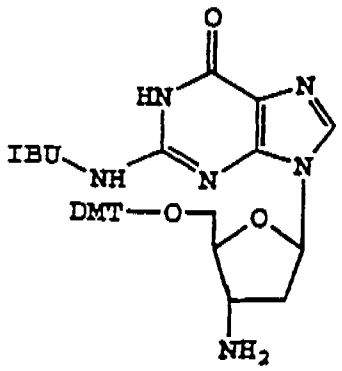
Nukleosidialayksiköt, jotka muodostavat tämän keksinnön oligodeoksiribonukleotidit, voidaan valita olevan määritellyssä sekvenssissä: kuten emästen sekvenssi, joka on komplementaarinen yksisäikeiselle nukleiinihapon kohdesekvenssille

tai sekvenssille, joka sallii tripleksin muodostumisen oligodeoksiribonukleotidin ja kohdedupleksin välille.

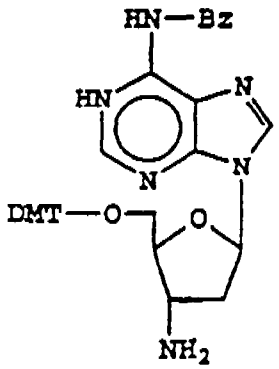
Yhdessä toteutusmuodossa oligodeoksiribonukleotidissa on ainakin 3 viereistä alayksikköä yhdistettynä N3'→P5' fosforamidaattisidoksilla. Tämä sidosten ryhmitys voi sijaita esimerkiksi oligodeoksiribonukleotidin 3'-päässä. Tässä sijainnissa N3'→P5' fosforamidaattisidokset antavat nukleaasiresistenssin oligodeoksiribonukleotidille.

Toisessa tämän keksinnön toteutusmuodossa kaikki alayksiköjen väliset sidokset ovat N3'→P5' fosforamidaattisidoksia.

Tämä keksintö käsittää välituotteet, joita käytetään oligodeoksiribonukleotidien valmistamiseksi, ja menetelmät tällaisten välituotteiden syntetisoimiseksi. Välituotteilla on seuraavat kaavat:



ja



Tämä keksintö käsittää menetelmän dupleksinukleiinihappomolekyylin synnyttämiseksi muodostamalla oligodeoksiribonukleotidi, jossa viereiset nukleosidialayksiköt yhdistetään alayksiköiden välisillä sidoksilla, joissa oli-

godeoksiribonukleotidi sisältää kaavan 1 mukaisia alayksiköiden välisiä sidoksia tai tällaisia sidoksia yhdistelmässä muiden tässä keskusteltujen sidosten kanssa. Oligodeoksiribonukleotidillä on nukleosidialayksiköiden sekvenssi, jolloin muodostuu dupleksi kohteena olevan nukleiinihappomolekyylin kanssa, kun oligodeoksiribonukleotidi saatetaan kosketuksiin kohteena olevan nukleiinihappomolekyylin kanssa olosuhteissa, jolloin sallitaan dupleksin tehokas muodostuminen.

Tämä keksintö käsittää myös menetelmän proteiinin vuorovaikutuksen estämiseksi polynukleotidin kanssa muodostamalla oligodeoksiribonukleotidi, jossa viereiset nukleosidialayksiköt on yhdistetty kaavan 1 alayksiköiden välisillä sidoksilla tai tällaisilla sidoksilla yhdistelmässä muiden tässä keskusteltujen sidosten kanssa. Oligodeoksiribonukleotidillä on nukleosidialayksiköiden sekvenssi, jolloin muodostuu dupleksi tai tripleksi kohteena olevan nukleiinihappomolekyylin kanssa, kun oligonukleotidi saatetaan kosketuksiin kohteena olevan nukleiinihapon kanssa olosuhteissa, jolloin sallitaan tehokas dupleksin tai tripleksin muodostuminen. Tätä menetelmää voidaan käyttää solun sisällä.

Lisäksi keksintöön kuuluvat oligodeoksiribonukleotidit, joissa alayksiköiden väliset sidokset N3'→P5' fosforamidaattisidos ja toinen sidos vuorottelevat. Toinen sidos voidaan valita yhdestä tai useammasta sidosten eri tyypistä, esimerkiksi fosfodiesterisidokset tai fosfodiesteri- ja fosforotioaattisidokset. Toinen sidos valitaan esimerkiksi ryhmästä, joka koostuu fosfodiesteristä, fosfotriesteristä, metyylifosfonaatista, fosforamidaatista P3'→N5' ja fosforotioaatista. Yhdessä toteutusmuodossa ainakin 50 % alayksiköiden välisistä sidoksista on N3'→P5' fosforamidaattisidoksia.

Tämä keksintö käsittää menetelmän tripleksi DNA-molekyylin tuottamiseksi muodostamalla oligodeoksiribonukleotidi, kuten edellä on kuvattu, jossa oligodeoksiribonukleotidillä on nukleosidialayksiköiden sekvenssi, joka on tehokas muodostamaan kolmisäikeinen kierrerakenne kohteena olevan kaksisäikeisen DNA:n kanssa. Oligodeoksiribonukleotidi saatetaan sitten kosketuksiin kaksisäikeisen DNA:n kanssa olosuhteissa, jotka ovat tehokkaita sallimaan tripleksin muodostumisen

oligodeoksiribonukleotidin ja kohteen aolevan kaksisäikeisen DNA:n välille. Tämä menetelmä voidaan suorittaa erilaisissa olosuhteissa, esimerkiksi solunsisäisesti tai liuoksessa.

Tämä keksintö sisältää myös tripleksi DNA-molekyylin, jossa on kolme DNA-säiettä: (i) kaksisäikeinen DNA-molekyylin, jossa on kaksi komplementaarista säiettä, ja (ii) sitoutuneena dupleksiin kolmannen säikeen oligodeoksiribonukleotidi, jossa on N3'→P5' fosforamidaattisidoksia, kuten edellä on keskusteltu. Yhdessä toteutusmuodossa 50 % tai enemmän kolmannen säikeen oligodeoksiribonukleotidin alayksiköiden välisistä sidoksista on N3'→P5' fosforamidaattisidoksia, mukaan lukien täysin modifioidut oligodeoksiribonukleotidit.

Lisäksi, keksintö käsittää menetelmän oligodeoksiribonukleotidin resistenssin lisäämiseksi nukleaasidigestoinnille. Tässä menetelmässä muodostetaan oligodeoksiribonukleotidi, jossa on N3'→P5' fosforamidaattisidoksia, kuten edellä on kuvattu. Oligodeoksiribonukleotidi altistetaan nukleaasille. Tällaiset oligodeoksiribonukleotidit ovat resistentimpiä nukleaasidigestoinnille kuin vastaava oligodeoksiribonukleotidi, jossa on vain fosfodiesterialayksiköiden välisiä sidoksia. Nukleaasiresistenssi havaitaan myös solunsisäisesti.

Oligodeoksiribonukleotidilla, jossa on N3'→P5' fosforamidaattisidoksia, kuten edellä on kuvattu, on paremmat hybridisaatio-ominaisuudet. Tämä keksintö käsittää myös menetelmän ensimmäisen oligodeoksiribonukleotidin hybridisaation lisäämiseksi RNA kohdesekvenssiin, jossa oligodeoksiribonukleotidilla on viereiset nukleosidialayksiköt yhdistetty N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välisillä sidoksilla. Menetelmässä muodostetaan toinen oligodeoksiribonukleotidi, jossa on N3'→P5' fosforamidaattisidoksia, joilla on sama viereisten nukleosidialayksiköiden sekvenssi kuin ensimmäisellä oligodeoksiribonukleotidilla. Toinen oligodeoksiribonukleotidi on tehokas hybridisoitumaan mainittuun kohteena olevaan RNA-sekvenssiin. Toinen oligodeoksiribonukleotidi saatetaan sitten kosketuksiin RNA:n kanssa olosuhteissa, jotka ovat tehokkaat sallimaan kompleksin muodostumisen oligodeoksiribonukleotidin ja RNA:n välillä. Tällainen kosketuksiin saattaminen suoritetaan erilaisissa olosuhteissa, mukaan lukien

solunsisäisesti.

Tämä keksintö käsittää myös menetelmän ja kokoonpanon kohde-RNA:n eristämiseksi näytteestä. Kokoonpano käsittää oligodeoksiribonukleotidin, jossa on N3'→P5' fosforamidaattisidoksia, kuten edellä on kuvattu, jossa oligodeoksiribonukleotidi on tehokas hybridisoitumaan kohde-RNA-sekvenssiin. Tyypillisesti oligodeoksiribonukleotidi on kiinnittynyt kantaja-aineeseen, kuten magneettihelmeen, helpottamaan eristämistä.

Toisessa toteutusmuodossa tämä keksintö käsittää diagnostisen menetelmän RNA:n, jossa on valittu kohdesekvenssi, läsnäolon havaitsemiseksi näytteessä. Tässä menetelmässä luodaan oligodeoksiribonukleotidi, jossa on N3'→P5' fosforamidaattisidoksia, jotka ovat tehokkaita muodostamaan hybridisaatiokompleksi kohdesekvenssin kanssa. Sitten oligodeoksiribonukleotidi saatetaan kosketuksiin näytteen kanssa olosuhteissa, jotka ovat tehokkaita sallimaan hybridisaatiokompleksin muodostumisen oligodeoksiribonukleotidin ja kohdesekvenssin välille. Sitten havaitaan hybridisaatiokompleksin läsnäolo. Hybridisaatiokompleksin havaitseminen voidaan saada aikaan leimaamalla oligodeoksiribonukleotidi reportteriryhmällä, jolloin havaitseminen käsittää reportteriryhmän havaitsemisen. Lukuisia reportteriryhmiä on saatavissa, mukaan lukien, näihin kuitenkaan rajoittumatta, radioaktiiviset leimat, biotiinileimat ja fluoresoivat leimat. Tämä detektiomenetelmä voidaan suorittaa erilaisissa olosuhteissa, mukaan lukien solunsisäisesti.

Samanlaiset diagnostiset menetelmät voidaan suorittaa käyttäen oligodeoksiribonukleotidiä, jossa on N3'→P5' fosforamidaattisidoksia, joissa kohdesekvenssit ovat kaksisäikeinen DNA tai yksisäikeinen DNA. Kaksisäikeisen DNA:n detektion tapauksessa hybridisaatiokompleksin detektio voidaan saada aikaan käyttäen geelivyösiirtymäanalyysiä. Yksisäikeisen DNA:n detektiota varten oligodeoksiribonukleotidi sisältää tyypillisesti enemmän kuin 50 % alayksiköiden välisten sidosten kokonaismäärästä N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välisinä sidoksina.

Tämä keksintö käsittää myös dupleksi oligodeoksiribonukleotidin, jossa on (i) kaksi komplementaarista säiettä, ja (ii)

viereiset nukleosidialayksiköt yhdistyneenä alayksiköiden välisillä sidoksilla, joissa ainakin kaksi viereistä alayksikköä yhdistetään N3′→P5′ fosforamidaattialayksikön välisillä sidoksilla, tai enemmän kuin 3 alayksikköjen välisten sidosten kokonaismäärästä on N3′→P5′ fosforamidaattialayksikön välisiä sidoksia (kuten edellä on kuvattu). Yhdessä toteutusmuodossa 50 % tai enemmän ainakin yhden säikeen alayksikön välisistä sidoksista on N3′→P5′ fosforamidaattisidoksia. Toisessa toteutusmuodossa kaikki ainakin yhden säikeen alayksiköiden väliset sidokset ovat N3′→P5′ fosforamidaattisidoksia. Tällaisiin kaksisäikeisiin DNA-molekyyleihin voivat kuulua myös taipuva sarana-alue, joka yhdistää komplementaariset säikeet. Sarana-alue voi yhdistää säikeet missä tahansa halutussa polaarisuudessa, esim. 5′ - 3′, 3′ - 5′, 3′ - 3′ ja 5′ - 5′.

Lisäksi, tämä keksintö käsittää menetelmän tripleksi nukleiinihappokompleksin muodostamiseksi, jossa on kaksi komplementaarista DNA-säiettä ja yksi RNA-säie, joka sisältää kohdealueen, ja niiden koostumukset. Menetelmässä muodostetaan oligodeoksiribonukleotidi, jossa viereiset nukleosidialayksiköt on yhdistetty alayksiköiden välisillä sidoksilla. Oligodeoksiribonukleotidi pystyy muodostamaan dupleksi oligodeoksiribonukleotidin, jossa on (i) kaksi komplementaarista säiettä, joissa on 5′ ja 3′ päät, (ii) viereiset nukleosidialayksiköt yhdistetty alayksiköiden välisillä sidoksilla, joissa ainakin kaksi viereistä alayksikköä yhdistetään N3′→P5′ fosforamidaattialayksiköiden välisillä sidoksilla, tai enemmän kuin kolme alayksiköiden välisten sidosten kokonaismäärästä on N3′→P5′ fosforamidaattialayksiköiden välisiä sidoksia (kuten edellä on kuvattu), (iii) jossa säikeet yhdistetään yhden säikeen päästä toisen säikeen päähän taipuvalla sarana-alueella, ja (iv) komplementaariset oligodeoksiribonukleotidisäikeet, joissa on nukleosidialayksiköiden sekvenssi, joka on tehokas muodostamaan kolmisäikeinen kierrerakenne RNA-kohteen kanssa. Oligodeoksiribonukleotidi saatetaan sitten kosketuksiin RNA-kohteen kanssa olosuhteissa, jotka ovat tehokkaat sallimaan tripleksin muodostumisen oligodeoksiribonukleotidin ja RNA:n välille. Tämä menetelmä voidaan suorittaa erilaisissa olosuhteis-

sa, mukaan lukien solunsisäisesti.

Tämä keksintö käsittää myös oligodeoksiribonukleotidien, joissa on N3'→P5' fosforamidaattisidoksia, kuten edellä on kuvattu, farmaseuttiset koostumukset. Oligodeoksiribonukleotidit ovat käyttökelpoisia terapeuttisissa sovellutuksissa, jotka perustuvat hybridisaatioon, kuten antigeeni- ja antisense-sovellutukset.

Näitä ja muita keksinnön tavoitteita ja piirteitä ymmärretään paremmin, kun seuraava keksinnön yksityiskohtainen kuvaus luetaan yhdessä mukana olevien piirrosten kanssa.

Kuvien lyhyt kuvaus

Kuvat 1A - 1D esittävät alayksiköiden rakenteet, jotka ovat käyttökelpoisia oligonukleotidien, joissa on nukleosidin välisiä 3'-NHP(O)(O^-)O-5' fosforamidaattisidoksia (N3'→P5'), synteesiä varten. Kuva 1E esittää yhtenäisesti modifioitujen oligonukleotidien vaiheittaisen synteesin kaavamaisen yhteenvedon. Kuvassa CE = syanoetyyli ja CPG = kontrolloitu huokoslasi.

Kuvay 2A - 2E esittävät tyypillisiä yhdistelmiä 3'-NHP(O)(O^-)O-5' fosforamidaattialayksiköiden välisistä sidoksista muiden vaihtoehtoisten sidosten kanssa. Kuvissa 2D ja 2F R' on, esimerkiksi, alempi alkyyli -ryhmä, muut substituutiot ovat mahdollisia, kuten Goodchild (1990) kuvaa.

Kuva 3 esittää tyypillisiä oligonukleotidejä ja dupleksien ja tripleksien T_m-arvoja. Kuvassa:

[a] = Kompleksien T_m:t puskurissa A.

[b] = T_m puskurissa; hiusneuladupleksin T_m oli 55,7 ja 61,5 °C puskurissa A ja B vastaavasti.

[c] = Huonosti yhteen sopiva nukleotidi on alleviivattu.

Kuvat 4A - 4C. Kuva 4A esittää reaktioseoksen IE HPLC profiilin fosforamidaatti oligonukleotidin 3 synteesin jälkeen. Kuva 4B esittää reaktioseoksen kapillaarigeelielektroforeesiprofiilin undekafosforamidaatin 6 synteesin jälkeen. Kuva 4C esittää dekafosforamidaatin 3 ^{31}P-NMR:n tulokset.

Kuvat 5A - 5B esittävät sulamiskäyrät duplekseille, jotka fosfodiesteri- ja fosforamidaattioligomeerit muodostavat.

Kuva 6 esittää tyypillisiä oligonukleotidihiusneuloja ja niiden T_m-arvot.

Kuvat 7A - 7D esittävät sulamiskäyrät triplekseille.

Kuva 8 esittää oligonukleotiditripleksin muodostumisen geelielektroforeesianalyysin luontaisissa olosuhteissa.

Kuva 9 esittää oligonukleotiditripleksin muodostumisen geelielektroforeesianalyysin luontaisissa olosuhteissa.

Kuvat 10 - 19 esittävät tulokset antisense oligonukleotideistä, joissa on joko fosforamidaatti- (N3'→P5') (kuvat 10 - 15) tai fosforotioaatti- (kuvat 16 - 19) alayksiköiden väliset sidokset, leukemiasolujen jakautumisessa eri BCR-ABL leukemiasolulinjoille ja kontrollisolulinjoille.

Kuva 20 esittää kaaviollisesti 3'-amino-N^6-bentsoyyli-5'-dimetoksitrityyli-2',3'-dideoksiadenosiinin valmistuksen.

Viitteet

Abergo, D.D., *et al., Biochemistry* 20:1409-1413 (1981).

Agrawal, S., *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7790-7794 (1989).

Anfossi, G., *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3379 (1989).

Atherton, R.F., *et al., J. Chem. Soc.*, ss. 660-663 (1945).

Ausubel, F.M., *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., Media PA.

Azhayez, A.V., *et al., Bio Organ. Khimiya* 8(9):1218-1224 (1982).

Baer, M.R., *et al., Blood* 79(5):1319-1326 (1992).

Bannwarth, W., *Helv. Chem. Acta* 71:1517-1527 (1988).

Bayever, E., *et al., Antisense Research and Development* 3:383-390 (1993).

Birg, F., *et al., Nucleic Acids Research* 18 (10), 2901-2908 (1990).

Borer, P.N., julkaisussa Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 1, 3. painos, CRC Press, Cleveland, OH, s. 589 (1975).

Bower, M., *et al., Nucl. Acids Res.* 15:4915-4930 (1987).

Calabretta, B., *et al., Seminars in Cancer Biol.* 3(6):391-398 (1992).

Calabretta, B., *et al., Cancer Treatment Rev.* 19(2):169-179 (1993).

Cogswell, P.C., *et al., J. Immunol.* 150(7):2894-2804 (1993).

Cohen, J.S., julkaisussa Antisense Research and Applications (Crooke, T.S., *et al.*, toim.) CRC Press, Boca Raton, FL,

ss.205-221 (1993).
Collins, S.J., *et al.*, *Nature* 270:347-349 (1977).
Collins, S.J., *et al.*, *Science* 225:72 (1984).
Cook, K.S., *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 19:1577-1583 (1991).
Cooney, M., *et al.*, *Science* 241:456-459 (1988).
Cordingley, M.G., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8985-8989 (1990).
Cowsert, L. M., *et al.*, *Antimicrob. Agents and Chemo.* 37(2):171-177 (1993).
Cutry, A.F., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 264(33):19700-119705 (1989).
Daley, G.Q., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:9312-9316 (1988).
Dayton, A.I., *et al.*, *Cell* 44:941-947 (1986).
Dingwall, C., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6925-6929 (1989).
Donia, B.P., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268(1914514-14522 (1993).
Eckstein, F., *Ann. Rev. Biochem.* 54:367-402 (1985).
Fisher, A.G., *et al.*, *Nature* 320:367-371 (1986).
Froehler, B., *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 16:4831-4839 (1988).
Gale, R.P., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:5648 (1984).
Glinski, R.P., *et al.*, *Chemical Comm.*, ss.915-916 (1970).
Goldberg, M.L., *et al.*, *Methods in Enzymology* 68:206 (1979).
Goodchild, J., *Bioconjugate Chem.* 1:165-187 (1990).
Grigoriev, M., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(8):3501-3505 (1993).
Gryaznov, S.M., *et al.*, *Vest. Mosk. Univ. Ser. 2: Khim* 27:421-424 (1986).
Gryaznov, S.M., *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 31:3205-3208 (1990).
Gryaznov, S.M., *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 20:3403-3409 (1992).
Helene, C., *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta* 1049:99-125 (1990).
Helene, C. ja J.-J. Toulme, *Biochimica et Biophysica Acta 1049*, 99-125 (1990).
Helene, C., *Anti-Cancer Drug Design* 6:569-584 (1991).
Herdewijn, P. ja van Aerschot, A., *Tetrahedron Lett.* 30:855 (1989).

Higgins, K.A., *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:9901-9905 (1993).

Holland, S.M., *et al., J. Virol.* 64:5966-5975 (1990).

Kawasaki, A.M., *et al., J. Medicinal Chem.* 36(7):831-841 (1993).

Kibler-Herzog, L., *et al., Nucl. Acids. Res.* 19:2979-2986 (1991).

Kjems, J., *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:683-687 (1991).

Kulka, M., *et al., Antiviral Res.* 20(2):115-130 (1993).

LaPlauche, L.A., *et al., Nucl. Acids Res.* 14:9081-9093 (1986).

Letsinger, R.L., *et al., J. Am. Chem. Soc.* 110:4470-4471 (1988).

Letsinger, R.L., U.S. Patent no. 4,958,013, myönnetty 18.9.1990.

Li, G., *et al., J. Virol.* 67(11):6882-6888 (1993).

Lui, M.W., *et al., Circulation* 79:1374-1387 (1989).

Mag, M., *et al., Tetrahedron Lett.* 33:7319-7322 (1992).

Malim, M.H., *et al., Nature* 338:254-257 (1989a).

Malim, M.H., *et al., Cell* 58:205-214 (1989b).

Maniatis, T., *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1982).

Marky, L.A., *et al., Biopolymers* 26:1601-1620 (1987).

Marshall, W.S., *et al., Science* 259:1564 (1993).

Matsukura, M., *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:4244-4248 (1989).

McShan, W.M., *et al., J. Biological Chem.* 267(8) 5712-5721 (1992).

Miller, P.S., *Bioconjugate Chem.* 1:187-191 (1990).

Miller, P.S., *Biotechnology* 9:358-361 (1991).

Mitunobu, O., *Synthesis* 1-28 (1981).

Muesing, M.A., *et al., Cell* 48:691-701 (1987).

Mullis, K.B., *et al.*, U.S. Patent no. 4,683,195, myönnetty 28.7.1987.

Mullis, K.B., U.S. Patent no. 4,683,202, myönnetty 28.7.1987.

Nishino, S., *et al., Nucleosides Nucleotides* 5:159 (1986).

Orson, F.M., *et al., Nucleic Acids Res.* 19:3435-3441 (1988).

Pegoraro, I., *et al., J. Natl. Cancer Inst.* 70:447-450

(1983).
Perlakey, L., *et al., Anti-Cancer Drug Design* 8:3-14 (1993).
Postel, E.H., *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88*, 8227-8231 (1991).
Ratajczak, M.Z., *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:8474-8478 (1992).
Riley, M.J., *et al., J. Mol. Biol* 20:359-298 (1966).
Rittner, K., *et al., Nucleic Acids Res.* 19:1421-1426 (1991).
Roy, S., *et al., Genes Dev.* 4:1365-1373 (1990).
Sambrook, J., *et al.*, julkaisussa Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vol. 2 (1989).
Sauer, Robert T., toim., Methods in Enzymology Protein/DNA Interactions, Academic Press (1991).
Seelig, R., *et al., Leukemia* 7(11):1886-1887 (1993).
Shabarova, Z.A., *Biochemie* 70:1323-1334 (1988).
Stein, C.A. ja Cheng, Y.-C., *Science* 261:1004-1012 (1993).
Szczylik, C., *et al., Science* 253:562-565 (1991).
Tidd, D.M., *et al., Anti-Cancer Drug Design* 3:117-127 (1988).
Uhlman, E., *et al., Chem. Rev.* 90:544-584 (1990).
Vickers, T., *et al., Nuc. Acids Res.* 19(12):3359-3368 (1991).
Weeks, K.M., *et al., Science* 249:1281-1285 (1990).
Wickstrom, E., toim., Prospects for Antisense Nucleic Acid Therapy of Cancer and AIDS, Wiley-Liss, New York, NY (1991).
Wilson, W.D., *et al., Biochemistry* 32(40):10614-10621 (1993).
Zalewski, A., *et al., Circulation Res.* 88:1190-1195 (1993).
Zamecnik, P.C., *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:4143-4146 (1986).
Zielinski, W.S., *et al., Nucl. Acids Res.* 15:1699-1715 (1987).

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

I. Määritelmät

"Alkyyliryhmä" viittaa alkyyliin tai substituoituun alkyyliryhmään, jossa on 1 - 20 hiiliatomia, kuten metyyli, etyyli, propyyli ja niiden kaltaiset. Alempi alkyyli viittaa tyypillisesti C_{1-5}:een. Välialkyyli viittaa tyypillisesti C_{6-10}:een. Samalla tavalla "sykloalkyyliryhmä" viittaa tyydyttyneeseen karbosykliseen rengasryhmään, jossa voi olla alkyy-

li-, aryyli-, aralkyylisubstituentit, kuten syklopropyyli, syklopentyyli, sykloheksyyli ja niiden kaltaiset, tai sen substituoituun muotoon.

"Alkenyyliryhmä" viittaa hiilivetyryhmään, joka sisältää hiili-hiili-kaksoissidoksen, kuten vinyyli, allyyli, syklopentyyli ja niiden kaltaiset. "Alkenyyliryhmä" viittaa myös substituoituihin alkenyyleihin. Alempi alkenyyli viittaa tyypillisesti C_{1-5}:een. Välialkenyyli viittaa tyypillisesti C_{6-10}:een.

"Aryyliryhmä" viittaa aromaattiseen rengasryhmään, jossa on 5 - 20 hiiliatomia, kuten fenyyli, naftyyli, antryyli tai substituoidut aryyliryhmät, kuten alkyyli- tai aryylisubstituutiot, kuten tolyyli, etyylifenyyli, bifenylyyli, jne. Lisäksi kuuluvat heterosykliset aromaattiset rengasryhmät, joissa on yksi tai useampi typpi-, happi- tai rikkiatomi renkaassa.

"Aralkyyliryhmä" viittaa substituoituun alkyyliryhmään, kuten aryylisubstituutiot, kuten bentsyyli, fenetyyli, naftyyli, jne., ja alkyyli on määritelty edellä.

"Substituoidulla" tarkoitetaan yleensä, että ryhmä derivatisoidaan yhdellä tai useammalla pienellä kemiallisella ryhmällä, esim. metoksi, etoksi, halogeeni, hydroksyyli, syano, amido, amiini ja etyleenioksidi. Mikä tahansa edellä määritellyistä ryhmistä voi olla substituoitu, esimerkiksi ($-CF_3$).

"Oligonukleotidit" viittaa tyypillisesti nukleosidialayksikköpolymeereihin, joissa on noin 4 - 50 viereistä alayksikköä. Nukleosidialayksiköt voidaan yhdistää erilaisilla alayksiköiden välisillä sidoksilla, mukaan lukien ne, näihin kuitenkaan rajoittumatta, jotka on esitetty kuvissa 2A - 2E. Lisäksi, "oligonukleotidit" käsittää modifikaatiot, jotka alan ammattimies tuntee, sokerirunkoon (esim. riboosi- tai deoksiriboosialayksiköt), sokeriin (esim. 2'-substituutiot), emäkseen, ja 3'- ja 5'-päähän. "Oligodeoksiribonukleotidit" käsittävät tällaiset modifikaatiot, kuten fluorin 2'-sokerisubstituutio. Kaavassa 1 n on tyypillisesti 4 - 100 tai 5 - 100, edullisesti 6 - 60, edullisemmin 6 - 40, ja edullisimmin 6 - 30. Yleensä oligonukleotidin kokonaispituus on 6 - 100 nukleotidia, edullisesti 6 - 50 nukleotidia, ja edulli-

semmin 10 - 30 nukleotidia. Oligonukleotideissä yleensä ainakin 2 viereistä alayksikköä yhdistetään N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välisillä, edullisesti ainakin 3 viereistä alayksikköä, edullisemmin ainakin 4 viereistä alayksikköä ja edullisimmin ainakin 5 viereistä yksikköä. Yleensä keksinnön oligonukleotideillä ei ole epäsopivuuksia kohdesekvenssiin. Jos oligonukleotidi on pidempi kuin noin 20 - 30 nukleotidia, sallitaan 1 tai 2 tai 3 emäksen epäsopivuudet.

"Nukleosidi" määritellään tässä pentoosisokerina (riboosi, deoksiriboosi tai niiden modifikaatio), joka on sitoutunut emäkseen, joka pystyy muodostamaan vetysidoksia (tyypillisesti puriini tai pyrimidiini).

"Emäs" määritellään tässä käsittämään (i) tyypilliset DNA- ja RNA-emäkset (urasiili, tymiini, adeniini, guaniini ja sytosiini), ja (ii) modifioidut emäkset tai emäsanalogit (esim. 5-metyylisytosiini, 5-bromiurasiili tai inosiini). Emäsanalogi on kemikaali, jonka molekyylirakenne matkii tyypillisen DNA- tai RNA-emäksen rakennetta.

"Tripleksissä" on kolme nukleiini- ja happosäiettä. Yleensä keksinnön oligonukleotideillä ei ole epäsopivuuksia kohdesekvenssiin. Jos oligonukleotidi on pidempi kuin noin 20 - 30 nukleotidiä, sallitaan 1 tai 2 tai 3 emäksen epäsopivuus.

II. Tämä keksintö

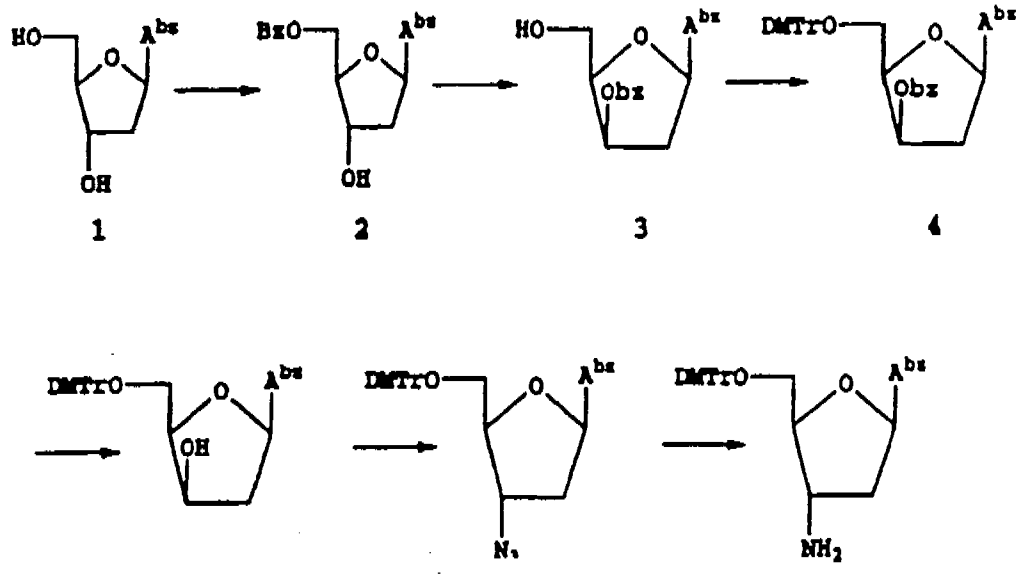
Kokeet, jotka suoritetaan tämän keksinnön tukemiseksi, osoittavat, että oligonukleotidit, jotka sisältävät akiraalisia nukleosidien välisiä 3'-NHP(O)(O^-)O-5' fosforamidaattisidoksia (N3'→P5'), ovat resistentimpiä nukleaasidigestoinnille ja niillä on parantuneet RNA ja dsDNA hybridisaatio-ominaispiirteet suhteessa oligonukleotideihin, jotka eivät sisällä N3'→P5' fosforamidaattisidoksia. Oligonukleotideillä, jotka sisältävät N3'→P5' sidoksia, on erinomainen antisense-aktiivisuus komplementaarisia mRNA-kohteita vastaan in vitro solun kasvun inhibitioanalyyseissä. Lisäksi, oligonukleotidit osoittavat alhaista sytotoksisuutta.

A. Nukleosidien välisiä 3'-NHP(O)(O^-)O-5' fosforamidaattisidoksia sisältävien oligonukleotidien synteesi ja karakterisointi

Oligonukleotidit, jotka sisälsivät yksittäisen N3'→P5'

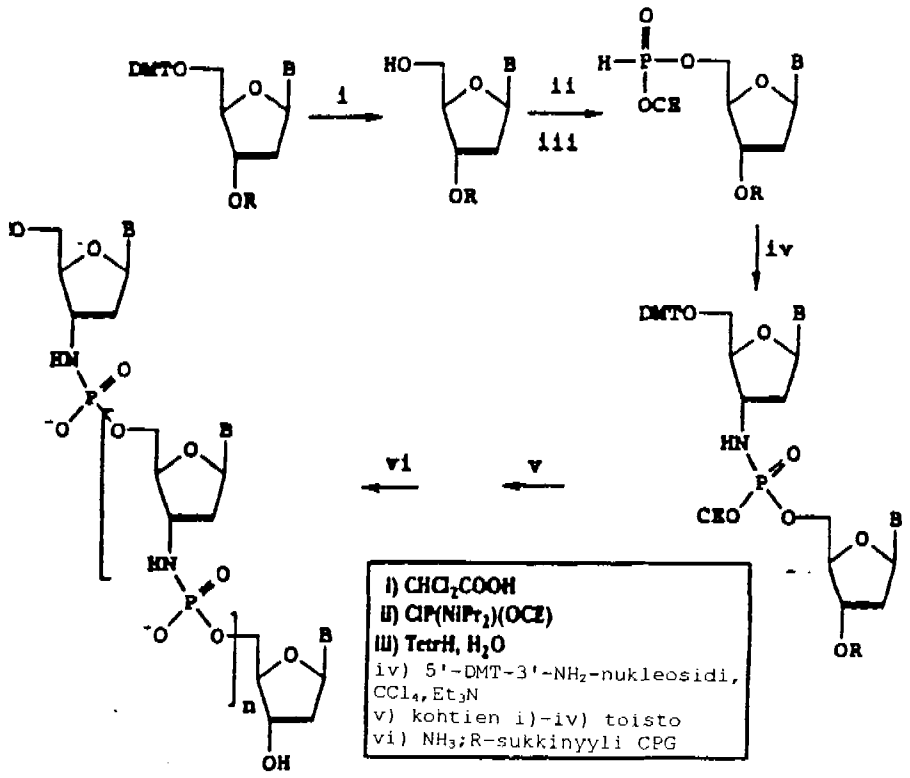
fosforamidaattisidoksen, valmistettiin kemiallisella ligaatiolla vesipitoisessa välaineessa (oleellisesti kuten Shabarova, 1988, on kuvannut). Vaihtoehtoisesti oligonukleotidit, jotka sisälsivät N3'→P5' sidoksia kahden alayksikön välillä, jossa seuraava alayksiköiden välinen sidos oli ainakin yksi fosfodiesterisidos, syntetisoitiin kantaja-aineella ennalta muodostettujen fosforamidaattidimeerilohkojen kytkennän kautta (Gryaznov, et al., 1992; Mag, et al., 1992). Satunnaisen kokoisia ribo-oligonukleotidi N3'→P5' fosforamidaatteja saatiin dimeerilohkojen itsepolymeroitumisen kautta (Zielinski, et al., 1987). Azhayer, et al., kuvaavat määriteltyjen sekvenssioligoribonukleotidien synteesin.

Tämä keksintö käsittää kantaja-ainesynteesimenetelmät oligodeoksiribonukleotidien muodostamiseksi, joissa viereiset nukleosidialayksiköt on yhdistetty N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välisillä sidoksilla (np) (esimerkki 1, kuva 1). Oligodeoksiribonukleotidien peräkkäinen synteesi käyttää 5'-dimetoksitrityyli-3'-aminodeoksiribonukleotidialayksiköitä. Kunkin näistä alayksiköistä valmistus kuvataan esimerkissä 1 (katso esimerkiksi kuva 20) ja esitetään seuraavasti:



Oligonukleotidit, joissa viereiset alayksiköt on yhdistetty N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välisillä sidoksilla (esim. yhtenäisesti modifioitu), syntetisoitiin kantaja-aineella käyttäen vaiheittaista pidennysmenetelmää, joka on

esitetty esimerkissä 1 ja osoitettu alla:



Synteettinen sykli yksittäisen aminonukleosidin lisäämiseksi koostuu oleellisesti seuraavista operaatioista: detritylointi (kuva 1, kohta i); 5'-hydroksyyliryhmän fosfitylointi, jolloin muodostuu polymeerituettu 5'-H-fosfonaattidiesteri (kuva 1, kohdat ii, iii); Atherton-Todd-tyypin (Atherton, et al., 1945; Gryaznov, et al., 1992; Gryaznov, et al., 1986, Gryaznov, et al., 1990) 5'-dimetoksitrityyli-3'-aminonukleosidin (Glinski, et al., 1970) kytkentä 5'-H-fosforaatin kanssa hiilitetrakloridin ollessa läsnä (kuva 1, kohta iv). Tätä sykliä voidaan toistaa useita kertoja, jolloin saadaan fosforamidaattioligonukleotidi suojauksen poiston ammoniakilla jälkeen (kuva 1, kohta v, vi). Keskimääräiset kytkentäsaannot olivat 94 - 96 % vaihetta kohti dimetoksitrityyli (DMT) kationianalyysin perusteella pääteltynä.

Tyypillisiä oligodeoksiribonukleotidejä, jotka sisältävät N3'→P5' fosforamidaattisidoksia ("np"), esitetään kuvassa 3 ja läpi koko selityksen.

Tämän keksinnön oligodeoksiribonukleotidit sisältävät

ainakin kaksi viereistä alayksikköä yhdistettynä N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välisillä sidoksilla (esimerkiksi 5'-T-np-G-np-A-3'), tai enemmän kuin yhteensä kolme N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välistä sidosta. Yhdessä toteutusmuodossa oligodeoksiribonukleotidit sisältävät täysin modifioituja N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välisiä sidoksia (esim. kuva 3, koe 13, oligonukleotidi 6). Toisessa toteutusmuodossa oligodeoksiribonukleotideillä on vuorottelevat N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden väliset sidokset alayksiköiden välillä, tyypillisesti fosfodiesteri- tai fosforotiaattisidosten kanssa vuorotteleva (katso esimerkiksi sidokset alla kuvassa 2). Esimerkki tällaisesta oligodeoksiribonukleotidista, jossa on vuorottelevat sidokset, esitetään kuvassa 3, koe 3, oligonukleotidi 2. Oligonukleotidin 2 synteesi kuvataan esimerkissä 1.

Oligonukleotidit eristettiin ioninvaihto suuren suorituskyvyn nestekromatografialla (IE HPLC; esimerkki 2, kuva 4A). Eristettyjen oligonukleotidivalmisteiden puhtaudet arvioitiin kapillaarielektroforeesilla ja levygeelielektroforeesianalyysillä (esimerkki 2, kuva 4B).

Fosforamidaattisidosten läsnäolo puhdistetuissa oligonukleotideissä vahvistettiin ^{31}P-NMR:llä (esimerkki 2, kuva 4C) ja selektiivisellä happokatalysoidulla fosforamidaattisidosten hydrolyysillä (esimerkki 2).

Syanoesteriryhmä kuvassa 1 (kohta i, iii) voidaan korvata muilla sivuryhmillä, mukaan lukien alkyyli- (yleensä alempi tai välialkyylit), alkenyyli-, aryyli- ja aralkyyliryhmät (tai minkä tahansa edeltävän ryhmän substituutiot). Tyypillisesti tällaiset sivuryhmät eivät häiritse oligonukleotidien synteesiä tai oligonukleotidin kykyä hybridisoitua kohteeseen. Yksi tyypillinen sivuryhmä on $-CH_3$ (Gryaznov, et al., 1992). Tyypillinen toistoyksikkö esitetään kuvassa 2A, jossa "X" on "$-O^-$", "-OR" tai "-R", ja "R" on esimerkiksi mikä tahansa seuraavista sivuryhmistä tai niiden substituutioista: alkyyli, alkenyyli, aryyli ja aralkyyli.

Fosforamidaattianalogien ja kimeeristen fosforamidaatti/fosfodiesterianalogien (kuva 2C) lisäksi nukleosidien välisiä N3'→P5' fosforamidaattisidoksia voidaan sisällyttää oligonukleotideihin, joissa on yksi tai useampi muu modifioi-

tu alayksikön välinen sidos (selostanut Goodchild, 1990), mukaan lukien, näihin kuitenkaan rajoittumatta, fosfotriesterit (kuva 2D), metyylifosfonaatit (kuva 2B), fosforamidaatit (kuva 2F), fosforamidaatit P3'→N5' ja fosforotioaatit (kuva 2E).

B. Akiraalisia nukleosidien välisiä 3'-NHP(O)(O⁻)O-5' fosforamidaattisidoksia sisältävien oligonukleotidien nukleaasiresistenssi

Oligonukleotidifosforamidaattien stabiilisuus hydrolyysiä kohtaan käärmeenmyrkkyfosfodiesteraasilla arvioitiin verrattuna luonnollisiin fosfodiesteriyhdisteisiin (katso Materiaalit ja menetelmät). Fosfodiesteridekameeria oligonukleotidi 1 (kuva 3) käsiteltiin käärmeenmyrkkyfosfodiesteraasilla. Oligonukleotidi 1 hydrolysoitui täysin 10 minuutin kuluttua pääteltynä käänteisfaasi suuren suorituskyvyn nestekromatografian (HPLC) perusteella.

Vastakohtana, fosforamidaattianalogi oligonukleotidi 3 oli oleellisesti koskematon jopa 50 minuutin käärmeenmyrkkyfosfodiesteraasilla käsittelyn jälkeen. 4,5 tunnin kuluttua noin 50 % oligonukleotidista 3 oli muuttunut oletetuksi 9-meeri $(TnpT)_4T_{NH2}$:ksi, jossa on pääte 3'-aminoryhmä. Pääte 3'-aminoryhmän läsnäolo hidasti edelleen oligomeerin digestointia. 22 tunnin hydrolyysin jälkeen lähtöaine 10-meeri oligonukleotidi 3 oli muutettu täysin 3'-aminopääte 9-meeri $\{(Tnp)_8T_{NH2}\}$:ksi. Havaittiin vain noin 20 % $\{(Tnp)_8T_{NH2}\}$-yhdisteen lisädigestointia.

Nämä tulokset osoittavat oligonukleotidien, jotka sisältävät N3'→P5' fosforamidaattisidoksia ("np"), lisääntyneen nukleaasiresistenssin suhteessa oligonukleotideihin, joissa on standardi fosfodiesterirungot. Yhdessä tämän keksinnön toteutusmuodossa oligodeoksiribonukleotidien nukleaasiresistenssi muodostetaan asettamalla noin 3 viereistä alayksikköä, jotka on liitetty N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välisillä sidoksilla, oligodeoksiribonukleotidien 3'-päähän.

C. N3'→P5' fosforamidaattisidoksia sisältävien oligonukleotidien hybridisaatio-ominaisuudet

Fosforamidaattianalogien hybridisaatio-ominaisuuksia arvioitiin suhteessa komplementaarisiin DNA- tai RNA-säikeisiin, joissa on standardi fosfodiesterialayksiköiden välisiä

sidoksia. Lämpöstabiilisuustiedot duplekseille, jotka on muodostettu fosforamidaattianalogeista ja fosfodiesterioligomeereistä, on koottu kuvaan 3 (esimerkki 1).

Tyypilliset sulamiskäyrätiedot (esimerkki 4A) duplekseille, jotka fosfodiesteri- ja fosforamidaattianalogioligomeerit muodostavat, esitetään kuvissa 5A ja 5B. Kuvissa käyrät (A), (C), (B) ja (D) vastaavat kokeita 8, 9, 13 ja vastaavasti 14 kuvassa 3.

N3'→P5' fosforamidaattisidosten korvaus nukleosidien välisillä fosfodiesterisidoksilla muutti dramaattisesti oligonukleotidien hybridisaatio-ominaisuuksia. Dupleksien, jotka kokonaan modifioitu 10-meeri oligonukleotidi 3 muodosti poly Da:n (so. DNA) ja poly A:n (so. RNA) kanssa, sulamislämpötilat (T_m) olivat 36,0 °C ja 51,5 °C vastaavasti (kuva 3, kokeet 5 ja 6). Nämä T_m:t ovat 6,3 °C ja 24,5 °C korkeampia kuin duplekseilla, jotka fosfodiesteriä vastaava oligonukleotidi 1 muodosti poly Da:n ja poly A:n kanssa (kuva 3, kokeet 1 ja 2).

Sama suunta on totta sekaemäs undekanukleotidille 6 (kuva 3), jossa dupleksien T_m:t komplemetaarisen DNA- ja RNA-säikeiden kanssa olivat 49,2 °C ja 72,4 °C vastaavasti (kuva 3, kokeet 13, 14). Nämä arvot olivat 11,7 °C ja 22,9 °C korkeampia kuin fosfodiesterikantayhdisteelle oligodeoksiribonukleotidi 4 (kuva 3, kokeet 8 ja 9). Lisäksi, dupleksi, jolla on sama RNA-kohde ja jonka fosforamidaatti 11-meeri oligodeoksiribonukleotidi 6 muodostaa, on stabiilimpi (18 °C:lla) kuin se, jonka muodostaa homologinen RNA-oligomeeri 5 (kuva 3, koe 11).

Myös oligodeoksiribonukleotidi 2, jolla on vuorottelevat fosfodiesteri-fosforamidaattisidokset, sitoutuu tiukemmin RNA-säikeen kanssa, T_m 33,7 °C (kuva 3, koe 4), kuin vastaava fosfodiesteriyhdiste (oligodeoksiribonukleotidi 1, kuva 3, koe 2). Oligodeoksiribonukleotidi 2 sitoutuu kuitenkin vähemmän voimakkaasti DNA-mallin kanssa, T_m 25,8 °C (kuva 3, koe 3), suhteessa sen fosfodiesteriä vastaavaan yhdisteeseen (oligodeoksiribonukleotidi 1, kuva 3, koe 1). Fosforamidaattioligonukleotidien hybridisaatio komplementaaristen nukleiinihappojen kanssa on sekvenssispesifinen ja määritetty kunnollisella Watson-Crick emäspariutumisella. Dupleksi,

jonka muodostavat fosforamidaatti oligonukleotidi 6 yksittäisen epäsopivan RNA-kohteen kanssa (kuva 3, koe 15), on oleellisesti vähemmän stabiili (ΔT_m -12,2 °C) kuin dupleksi, joka muodostu täysin komplementaarisen RNA-oligomeerin kanssa (kuva 3, koe 13). Suunnilleen sama epäsopivuusero havaittiin fosfodiesterideoksiribo- ja ribo-oligonukleotideille, joissa ΔT_m oli -14,4 °C ja -12,4 °C vastaavasti (kuva 3, kokeet 10, 12).

Aikaisempi tutkimus fosforamidaattianalogeilla osoitti, että kolmen N3'→P5' fosforamidaattisidoksen liittämisestä saatiin epävakaaksi tekevä suuntaus, kahden tällaisen sidoksen takia, heteroduplekseille, jotka muodostuvat deoksiribo-oligonukleotidikohteiden kanssa (Gryaznov, et al., 1992). Verrattuna tunnetun tekniikan suuntaukseen, edellä esitetyt tulokset osoittavat, että jos jopa 50 % alayksiköiden välisistä sidoksista on fosforamidaattisidoksina, DNA/DNA heterodupleksien stabiilisuus tyypillisesti pienenee. Yli 50 % fosforamidaattialayksiköiden välisiä sidoksia yhdessä DNA-dupleksin säikeessä alkaa kuitenkin parantaa vastaavan dupleksin stabiilisuutta.

Kun DNA-dupleksi muodostetaan normaalin, fosfodiesterioligonukleotidin ja oligonukleotidin välille, joka on täysin modifioitu N3'→P5' fosforamidaattisidoksilla, dupleksin lämpöstabiilisuus on paljon suurempi kuin vastaavan dupleksin, jossa on vain fosfodiesterisidoksia molemmissa säikeissä (kuva 3, vertaa kokeita 1 ja 5).

Gryaznov, et al. (1992), sisältää vain tiedot, jotka koskevat DNA/DNA-dupleksin, joissa yksi säie sisältää enintään kolme N3'→P5' fosforamidaattisidosta (ei viereisiä), hybridisaatio-ominaisuuksia. Jyrkkänä vastakohtana tunnetun tekniikan esityksille koskien DNA-kohteita, tämän keksinnön tueksi suoritetut kokeet osoittavat, että kasvavan määrän fosforamidaattianalogisidoksia läsnäolo oligodeoksiribonukleotidissa lisää DNA/RNA-heterodupleksien stabiilisuutta. DNA/RNA-heterodupleksin stabilaation saavuttamiseksi tämän keksinnön edullinen toteutusmuoto käsittää oligodeoksiribonukleotidin, jossa on ainakin 2 viereistä alayksiköiden välistä, tai yhteensä enemmän kuin 3 alayksiköiden välistä sidosta modifoituna, jolloin on N3'→P5' fosfo-

ramidattisidoksia. Edullisemmin oligonukleotideillä on ainakin 5 viereistä alayksiköiden välistä sidosta N3'→P5' fosforamidaattisidoksten kanssa.

Kokeita suoritettiin myös arvioimaan dupleksien, joita muodostavat oligonukleotidit, jotka sisältävät fosforamidattisidoksia molemmissa komplementaarisissa säikeissä, stabiilisuutta. Useita kimeerisiä fosforamidaatti-fosfodiesteri hiusneulaoligomeerejä (kuva 6) syntetisoitiin (kuva 6, esimerkki 4B), joissa on tymidiinin sisältäviä sarana-alueita (T_4, kuva 6). Näille yhdisteille saadut sulamiskäyrät osoittavat, että stabiileimmat dupleksit muodostettiin hiusneuloilla oligonukleotideissä 9 ja 12, joissa molemmat säikeet sisältävät fosforamidaattisidoksia vastakkaisissa asemissa (kuva 6, kokeet 3, 6).

Lisäksi, dupleksit, jotka muodostuvat yksisäikeisistä DNA-molekyyleistä (so. hiusneulat), joissa yksi säie sisältää vuorottelevia fosforamidaatti-fosfodiesterisidoksia ja komplementaarisäikeissä on vain fosfodiesterisidoksia, ovat stabiilimpia kuin niiden vain fosfodiesterivastaosat (kuva 6, kokeet 1, 4).

Nämä tulokset viittaavat siihen, että kun molemmat DNA/DNA-dupleksin säikeet sisältävät fosforamidaattianalogisidoksia, dupleksi stabiloidaan N3'→P5' fosforamidaattisidoksien läsnäololla kussakin säikeessä. Stabiileja dupleksit voidaan muodostaa yhden fosforamidaattisidoksen kanssa kussakin säikeessä, yhdessä toteutusmuodossa fosforamidaattisidos on samassa asemassa kussakin säikeessä.

DNA/DNA-dupleksin stabilaation saavuttamiseksi tyypillisesti kaksi tai useampi alayksiköiden välinen sidos kussakin dupleksin muodostavan oligonukleotidin DNA-säikeessä modifioidaan niin, että siinä on N3'→P5' fosforamidaattisidoksia. Yhdessä toteutusmuodossa yksi hiusneulan muodostavan DNA-oligonukleotidin säie voidaan modifioida niin, että siinä on noin 50 - 100 % N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välisiä sidoksia.

D. Tripleksin muodostus käyttäen fosforamidaattianalogeja

Fosforamidaattianalogien kykyä muodostaa tripleksejä kaksisäikeisen DNA:n kanssa arvioitiin myös (esimerkki 4). Sulamiskäyrät saatiin triplekseille, joita muodostavat deka-

tymidiliinifosforamidaatti oligodeoksiribonukleotidi 6 ja dA_{10}:dT_{10} hiusneula DNA-kohteen dupleksialue $d(A_{10}C_4T_{10})$ (kuva 3, koe 7). Tripleksillä oli T_m 32 °C lähellä fysiologisia olosuhteita. Stabiilimpi tripleksi (T_m 42,2 °C) havaittiin magnesiumia sisältävässä puskurissa (kuva 3, koe 7). Sama T_m-arvo saatiin triplekseille, joita fosforamidaatti oligonukleotidi 3 muodosti poly dA:poly dT dupleksin kanssa. Tripleksien lämpödissosiaatiota tarkkailtiin absorbanssin muutoksella 260 nm:ssä (kuvat 7A ja 7C), samoin kuin 284 nm:ssä (kuvat 7B ja 7D), joka on karakteristinen T:AT triplekseille (Riley, et al., 1966).

Geelisiirtymäkokeiden tulokset käyttäen luonnollisia olosuhteita osoittavat myös stabiilin tripleksin muodostumisen fosforamidaattidekameerillä 3 ja dsdna-kohteella (kuva 8), samoin kuin stabiilin tripleksin muodostumisen oligonukleotidilla 6 (kuva 9).

Samoissa hybridisaatio-olosuhteissa ei fosfodiesteridekatymidiliinihappo oligonukleotidi 1 eikä oligonukleotidi 4 muodostanut triplekseja samojen kaksisäikeisten DNA-kohteiden kanssa päätellynä sulamiskäyrien ja geelisiirtymäkokeiden (kuva 8) perusteella. Siis, vastaavaa tripleksiä ei muodostunut oligonukleotideillä, joissa on fosfodiesterialayksiköiden välisiä sidoksia, mikä viittaa siihen, että fosforamidaattianalogit voivat helpommin muodostaa triplekseja kuin niiden fosfodiesterin sisältävät vastaosat.

Samanlaisia tuloksia saatiin, kun oligonukleotidistä 6 ja oligonukleotidistä 1 arvioitiin niiden kyky muodostaa tripleksirakenteita dupleksi DNA-kohteiden kanssa (esimerkki 5, kuva 9).

Edellä esitetyt tulokset viittaavat siihen, että fosforamidaattioligonukleotidit ovat tehokkaampia tripleksin muodostamista varten, dupleksisubstraatin kanssa, kuin standardi fosfodiesterioligonukleotidit.

III. Nukleosidin 3′-NHP(O)(O^-)5′ välisiä fosforamidaattisidoksia sisältävien oligonukleotidien sovellutuksia

Oligonukleotidi 3′-NHP(O)(O^-)O-5′ fosforamidaatit syntetisoitiin. Nämä yhdisteet ovat nukleaasiresistenttejä ja muodostavat yllättävän stabiileja komplekseja ssRNA- ja DNA-kohteiden kanssa. N3′→P5′ fosforamidaattianalogeilla on suuri

mahdollisuus anti-sense- ja antigeenidiagnostisia/terapeuttisia sovellutuksia varten. Tämän keksinnön edullisessa toteutusmuodossa oligonukleotidit ovat oligodeoksiribonukleotidejä.

A. Anti-sense-sovellutuksia

Antisense-terapia käsittää eksogeenisten oligonukleotidien antamisen, jotka sitoutuvat kohteena olevaan nukleiinihappoon, tyypillisesti RNA-molekyyliin, joka sijaitsee soluissa. Termi antisense annetaan, koska oligonukleotidit ovat tyypillisesti komplementaarisia mRNA-molekyyleille ("järkisäikeet"), jotka koodaavat solutuotteen.

Tässä kuvatut fosforamidaattianalogioligonukleotidit ovat käyttökelpoisia geeni-ilmentymisen antisense-inhibitiota varten (Matsukura et al., 1989; Agrawal et al., 1989; Zamecnik et al., 1986; Rittner ja Sczakiel, 1991; Stein ja Cheng, 1993). Oligonukleotideillä, jotka sisältävät N3'→P5' fosforamidaattisidoksia, on terapeuttisia sovellutuksia lukuisia lääketieteellisesti merkittäviä kohteita varten, mukaan lukien, näihin kuitenkaan rajoittumatta, syöpäsolun jakautumisen inhibition ja häirinnän infektioviruksilla. N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidit ovat käyttökelpoisia sekä eläinlääkintä- että ihmissovellutuksia varten. Näiden yhdisteiden alhainen sytotoksisuus ja niiden kyky toimia tehokkaasti antisense-molekyyleinä alhaisissa pitoisuuksissa (katso alla) tekevät oligonukleotideistä erittäin haluttuja terapeuttisina antisense-aineina.

Antisense-aineiden täytyy tyypillisesti jatkuvasti sitoa kaikki kohteena olevat RNA-molekyylit niin, että ne inaktivoidaan, tai vaihtoehtoisesti tarjota substraatti endogeenista ribonukleaasi H (Rnaasi H) aktiivisuutta varten. RNA/oligonukleotidi-kompleksien, jotka muodostetaan tämän keksinnön menetelmillä, herkkyys Rnaasi H digestoinnille voidaan arvioida standardimenetelmillä (Donia, et al., 1993; Kawasaki, et al., 1993).

Tämän keksinnön menetelmät tarjoavat useita etuja verrattuna tavanomaisempiin antisense-aineisiin. Ensiksi, fosforamidaattianalogioligonukleotidit sitoutuvat voimakkaammin RNA-kohteisiin kuin vastaavat fosfodiesterioligonukleotidit. Toiseksi, fosforamidaattianalogioligonukleotidit ovat resis-

tentimpiä hajoamiselle solunukleaaseilla.

Lisäksi, kun RNA koodataan pääasiassa dupleksikohdesekvenssin puriinisäikeellä, fosforamidaattianaloginukleotideillä, jotka on kohdistettu dupleksiin, on myös mahdollisuus DNA:n inaktivoimiseksi, so. kyky inaktivoida patogeeni sekä yksi- että kaksisäikeisissä muodoissa (katso antigeeni-terapioiden keskustelu alla).

Sekvenssispesifiset fosforamidaattianalogin sitovat molekyylit ovat mahdollisesti voimakkaita terapeuttisia aineita oleellisesti mitä tahansa sairautta tai sairaustilaa varten, joka jollain tavalla käsittää RNA:n. Tyypillisiin malleihin, joilla tällaiset sekvenssit voidaan kohdistaa terapeuttisia sovellutuksia varten, kuuluvat:

a) RNA-sekvenssien kohdistaminen, jotka sekvenssit ilmentävät tuotteita, jotka ovat sekaantuneet infektioaineiden etenemiseen ja/tai säilyttämiseen, kuten bakteerit, virukset, hiiva ja muut sienet, esimerkiksi infektioaineen koodaama spesifinen mRNA;

b) dupleksimolekyylin muodostus, joka johtaa RNA:n pilkkomisen aiheuttamiseen (esim. RNA/DNA-hybrididuplekSimolekyylien Rnaasi-pilkkominen);

c) proteiinin vuorovaikutuksen estäminen RNA-sekvenssin kanssa (esim. TAT:n ja TAR:n vuorovaikutus, katso alla); ja

d) sekvenssien kohdistaminen, jotka aiheuttavat epäsopivan ilmentymisen tai solugeenien lisääntymisen: esimerkiksi geenit, jotka liittyvät solusyklin säätelyyn; tulehdusprosessit; sileälihassolun (SMC) jakautuminen, kulkeutuminen ja matriisin muodostuminen (Liu, et al., 1989); tietyt geneettiset sairaudet; ja syövät (proto-onkogeenit). Yhdessä toteutusmuodossa epäsopivasti ilmentyneiden solugeenien translaatio tai RNA-prosessointi estetään.

Tyypillisiä mahdollisia kohdesekvenssejä ovat proto-onkogeenit, esimerkiksi, mukaan lukien, näihin kuitenkaan rajoittumatta, seuraavat: c-myc, c-myb, c-fos, c-kit, ras ja BCR/ABL (esim. Wickstrom; Zalewski, et al., 1993; Calabretta, et al., 1992, 1993), onkogeenit/kasvaimen tukahduttajageenit (esim. p53, Bayever, et al.), transkriptiotekijät (esim. NFκB, Cogswell, et al., 1993) ja virusgeenit (esim. papilloomavirukset, Cowsert, et al.; herpes simplex virus, Kulka, et

al.). Lisähavainnollistamista varten, kaksi HIV-1 proteiinin RNA-aluetta, jotka voivat olla tämän keksinnön menetelmän kohteena, ovat REV-proteiinivaste-elementti (RRE) ja TAT-proteiinin transaktivaatiovaste-elementti (TAR). REV-aktiivisuus vaatii REV-vaste-elementin läsnäolon (RRE; SEQ ID NO:23), joka sijaitsee HIV päällysgeenissä (Malim et al., 1989a, 1989b).

RRE on kartoitettu 234-nukleotidialueelle, jonka uskotaan muodostavan neljä runkosilmukkarakennetta ja yhden haarautuneen runkosilmukkarakenteen (Malim et al., 1989a). Tiedot, jotka saatiin jalanjälkitutkimuksista (Holland et al., 1990; Kjems et al., 1991), viittaavat siihen, että REV sitoutuu kuuteen emäspariin yhdessä runkorakenteessa ja kolmeen nukleotidiin RRE:n viereisessä runkosilmukkarakenteessa. Minimi REV sitomisalueen noin 40 nukleotidia runkosilmukassa II ovat identifioineet Cook, et al. (1991; SEQ ID NO:24). Tämä sitomisalue voidaan kohdistaa RNA/DNA-dupleksien muodostamista varten (esim. Li, et al., 1993) käyttäen yhtä tai useampaa oligonukleotidia, tämän keksinnön menetelmien mukaisesti.

HIV-1 TAT on oleellinen virusreplikaatiota varten ja se on voimakas pitkäpäätetoisto (LTR)-suunnatun virusgeeni-ilmentymisen transaktivaattori (Dayton et al., 1986; Fisher et al., 1986). TAT-proteiinin aiheuttama transaktivaatio vaatii TAR-elementin läsnäolon (SEQ ID NO:25), joka sijaitsee virus mRNA-elementin translatoimattomassa 5'-päässä.

TAR-elementti pystyy muodostamaan stabiilin runkosilmukkarakenteen (Muesing et al., 1987). Rungon ja 3 nukleotidin (nt) pullistuman kokonaisuuden TAR:n rungossa on osoitettu olevan oleellinen spesifiselle ja suuren affiniteetin TAT-proteiinin sitoutumiselle TAR-elementtiin (Roy et al., 1990; Cordingley et al., 1990; Dingwall et al., 1989; Weeks et al., 1990). Tämä alue voidaan kohdistaa antisenseterapiaa varten tämän keksinnön menetelmää seuraten.

Sen lisäksi, että REV-, RRE- ja TAT-proteiinien RNA-sitomiskohdat ovat kohteena, RNA:n koodaussekvenssit REV- ja TAT-proteiineille itsessään voivat olla kohteena proteiinien ilmentymisen estämiseksi.

N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidit tuottavat ainutlaatuisia kohdituskykyjä RNA-alueille, jotka itsessään yhdis-

tyvät, jolloin muodostuu RNA/RNA-hybridejä, kuten, näihin kuitenkaan rajoittumatta, RRE:n runkosilmukkarakenteet. N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidit korvaavat RNA/RNA-hybridit johtuen N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidien suuren affiniteetin sitoutumisesta RNA/RNA-hybridin yhteen säikeeseen. Ensimmäisen N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidin sitoutuminen RNA/RNA-hybridiin aiheuttaa RNA/DNA-dupleksin muodostumisen (yksi säie RNA ja yksi säie N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidi), mikä estää RNA/RNA-hybridin uudelleenyhdistämisen ja voi estää RNA/RNA-hybridin sitomisen tai tunnistamisen proteiinilla. Ensimmäisen N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidin sitominen voisi johtaa myös RNA:n lisääntyneeseen pilkkomiseen Rnaaseilla. Suurempi RNA/N3'→P5' fosforamidaattidupleksin stabiilisuus, verrattuna RNA/RNA-hybridiin, minimoi RNA:n uudelleenyhdistymisen mahdollisuudet, jolloin muodostuu RNA/RNA-hybridi. Vaihtoehtoisesti, N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidi, joka sitoutuu RNA/RNA-hybridin yhteen säikeeseen, avaa RNA/RNA-hybridin, altistaen siten toisen RNA-kohdan toisen oligonukleotidin sitoutumista varten. RNA-alueet, jotka yhdistyvät itsessään, jolloin muodostuu RNA/RNA-hybridejä, voidaan identifioida empiirisesti osoittamalla, että N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidit korvaavat tunnetut RNA sitomisproteiinit. RNA-alueet, joissa on RNA/RNA-hybridejä, kuten runkosilmukkarakenteet, voidaan myös identifioida RNA:n sekundaarisen rakenteen tietokoneavusteisilla väitteillä. Ohjelmat, kuten Sixou, S. et al., Nucleic Acid Res. 22:662-668 (1994), menetelmät sisällytetään tähän viittauksella, ovat erityisen käyttökelpoisia RNA-alueiden, jotka muodostavat RNA/RNA-hybridejä, identifioimiseksi, kuten palindromiset sekvenssit, jotka erotetaan ainakin 3 - 7 emäksellä.

Alun N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidien, jotka on suunnattu sitomaan mahdollisia antisense-kohdepaikkoja, seulominen käsittää tyypillisesti saatujen RNA/DNA-dupleksien lämpöstabiilisuuden testauksen. Kun identifioidaan fosforamidaattianalogioligonukleotidi, joka sitoo valitun RNA-kohdesekvenssin, analogista testataan edelleen RNA-funktion inhibitio in vitro. Soluanalyysisysteemejä käytetään tällaisia in vitro analyysejä varten (esim. herpes simplex virus,

Kulka, et al.; HIV-1, Li, et al., Vickers, et al.; sepelvaltimon sileälihassolujen jakautuminen restenoosissa, Zalewski, et al.; IL-2R, Grigoriev, et al.; c-myb, Baer, et al.; c-fos, Cutry, et al.; BCR/ABL, Szczylik, et al., 1991).

Esimerkki 5 esittää tulokset fosforamidaattioligonukleotidien testaamisesta yhdessä tällaisessa soluviljelysysteemissä. Analyysi mittaa leukemiasolujakautumisen selektiivisen inhibition BCR-ABL antisense oligonukleotideillä (Szczylik, et al., 1991). BCR-ABL kopioita havaitaan kroonisen luuydinperäisen leukemian (CML) potilaiden enemmistössä ja Ph^+ akuutin lymfosyyttisen leukemian potilaissa, ja niiden uskotaan olevan tarpeen leukemiafenotyypin ylläpitämiseksi (Gale, et al.; Collins, et al., 1984; Daley, et al.). BCR-ABL kopiot ovat proto-onkogeenin ABL (kromosomi 9) kuljetuksen taitepisteryhmäalueeseen (BCR) (kromosomi 22) tulosta, mikä johtaa BCR-ABL hybridigeenien muodostumiseen.

Täysin modifioitu N3'→P5' fosforamidaatti antisense oligonukleotidi 11-meeri (SEQ ID NO:6), joka on komplementaarinen identifioidulle BCR-ABL liitokselle B2A2 (solulinja BV173), syntetisoitiin ja puhdistettiin. Lisäksi valmistettiin vastaava oligonukleotidi 16-meeri (SEQ ID NO:26), (i) joka sisälsi 11-meerin sekvenssin, kuten edellä on annettu, ja (ii) jossa oli täysin modifioituja fosforotioaattialayksiköiden välisiä sidoksia. Oligonukleotidit annettiin soluihin 24 tunnin välein kolmen vuorokauden ajan (päivät 0, 1 ja 2) pitoisuudessa, joka esitetään kuvissa 10 - 15, 16 ja 18. Pitoisuudet kuvissa esitetään seuraavasti: 40/20/20 vastaa soluviljelmiin lisättyjen oligonukleotidien pitoisuuksia, µg/ml:ssa (esimerkki 5).

Kuvat 17 ja 18 esittävät tulokset kokeille, jotka on suoritettu käyttäen 16-meeriä, jossa on täysin modifioidut fosforotioaattialayksiköiden väliset sidokset, sekvenssiepäsopivuuksien kanssa BV173 BCR/ABL liitossolmuun.

Tulokset, jotka esitetään kuvissa 10, 12 ja 14, osoittavat, että fosforamidaattioligonukleotidit olivat erittäin tehokkaita inhiboimaan BV173 leukemiasolujakautumista, huolimatta pitoisuudesta, jossa oligonukleotidit annettiin.

Tulokset, jotka esitetään kuvissa 11, 13 ja 15, osoittavat, että fosforamidaattioligonukleotideillä on häviävän

pieni sytotoksisuus. Näissä kokeissa solulinja oli joko HL60, joka ei sisällä BCR/ABL-taitepistettä, tai K562, joka sisältää B3A2 BCR/ABL taitepisteen, joka on osittain ei-homogeeninen B2A2 BCR/ABL taitepisteeseen.

Toisaalta, kun samanlaiset kokeet suoritettiin käyttäen fosforotioaatti 16-meeriä, oligonukleotidit eivät olleet tehokkaita inhiboimaan BV173 leukemiasolujakautumista, kun ne annettiin fosforamidaattioligonukleotidiin verrattavissa olevissa pitoisuuksissa (kuvat 16 ja 18). Spesifisesti, näyttää siltä, että leukemiasoluja alkaa vapautua inhibitiosta fosforotioaatti 16-meerillä pitoisuudessa noin 1,25/0,625/0,625 verrattuna samanlaiseen inhibition vapautumiseen, joka nähdään, kun käytetään fosforamidaattioligonukleotidia pitoisuudessa 0,0196/0,0098/0,0098. Siis, tulokset osoittavat, että fosforamidaattioligonukleotidit ovat tehokkaita antisense-aineita huomattavasti alhaisemmissa pitoisuuksissa kuin laajasti käytetyt fosforotioaattioligonukleotidit.

Lisäksi inhibitiokäyrillä, jotka nähdään fosforamidaattioligonukleotidikäsittelyn kanssa, on laskeva mutka myöhemmissä aikapisteissä, jopa inhibition osittaisen vapautumisen jälkeen (kuva 14). Toisaalta, inhibitiokäyrillä, jotka nähdään fosforotioaattioligonukleotidikäsittelyn kanssa, on jyrkkä nouseva mutka myöhemmissä aikapisteissä, inhibition osittaisen vapautumisen jälkeen (kuva 18). Nämä tulokset viittaavat siihen, että vapautuminen inhibitiosta on dramaattisempi fosforotioaattinukleotideille verrattuna fosforamidaattioligonukleotideihin.

Sytotoksisuuden poissaolo fosforotioaatti 16-meerillä oli verrattavissa siihen, joka nähdään fosforamidaattioligonukleotidillä, jota käytetään samassa pitoisuudessa.

Edellä esitetyt tulokset vahvistavat soluviljelmässä N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidien paremmat ominaisuudet, jotka osoitetaan edellä kuvatuilla hybridisaatiotutkimuksilla. Nämä tulokset tukevat N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidien käyttökelpoisuutta ja tehokkuutta antisense ja antigeeni in vivo terapioissa.

Lisäksi, tulokset osoittavat, että N3'→P5' fosforamidaat-

tioligonukleotidit tarjoavat paremman antisense-toiminnan in vitro kuin fosforotioaattioligonukleotidit. Tähän päivään mennessä fosforotioaattirungon modifikaatiosta oligonukleotideissä on tullut standardi antisense-sovellutuksille, jotka edustavat kohdeanalogia yli 95-%:ssa ~2500 antisense aikakauslehtijulkaisusta vuonna 1993.

Lukuisissa erilaisissa analyysisysteemeissä, jotka käsittävät suuren määrän mRNA-kohteita, antisense fosforotioaattioligonukleotidit vaadittiin pitoisuuksissa 1 - 15 μM, jotta saavutettiin oleelliset inhibiittorivaikutukset. Siitä huolimatta inhibiittoriaktiivisuus sillä tasolla oli riittävä aloittamaan US FDA hyväksymät kliiniset kokeet kolmessa sairaudessa, jossa kohteena on kolme eri mRNA:ta: CML (krooninen luuydinperäinen leukemia), IND #42974 ja AML (akuutti luuydinperäinen leukemia IND #40453 (Antiviral Agents Bulletin, Vol. 5, No. 6, ss. 161-162 (1992), ISSN 0897-9871, Biotechnology Information Institute); samoin kuin Hepatitis B virus (HBV).

Esimerkissä 5 esitetyt tiedot osoittavat, että N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidit ovat tehokkaita antisense-aineita paljon alhaisemmissa pitoisuuksissa kuin vastaavat fosforotioaatit. Lisäksi, N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotideillä ei ole selvää sytotoksisuutta jopa suurimmissa käytetyissä pitoisuuksissa, jotka olivat paljon antisense-aktiivisuutta varten vaadittujen pitoisuuksien yläpuolella. Tulokset osoittavat, että N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidit ovat erinomaisia aineita terapeuttisia sovellutuksia varten.

Valitun fosforamidaattianalogioligonukleotidin in vitro vaikutukset voidaan vahvistaa in vivo systeemissä. Tällaisiin in vivo systeemeihin kuuluvat, näihin kuitenkaan rajoittumatta, seuraavat (kohde - mallisysteemi): hepatitis virus - simpanssi- tai apinamallit; c-myb, c-myc, bcr-abl - SCID hiirimallit (esim. Ratajczak, et al.); NF-κB - hiiri (Higgins, et al.); ja p120 - hiiri (Perlakey, et al.).

B. Antigeenisovellutuksia

Geeni-ilmentymisen inhibitio tripleksin muodostumisen kautta on aikaisemmin osoitettu (Cooney et al., 1989; Orson et al., 1991; Postel et al., 1991). Tripleksirakenteiden,

jotka muodostuvat, kun käytetään kolmannen säikeen fosforamidaattianalogioligonukleotidejä, kasvanut stabiilisuus tarjoaa vahvemman työkalun antigeenisovellutuksia varten, mukaan lukien eläinlääkintä- ja ihmisterapeuttiset sovellutukset.

Valinnan mukainen kohdealue valitaan perustuen tunnettuihin sekvensseihin käyttäen standardisääntöjä tripleksin muodostamiseksi (Helene ja Toulme, 1990). Tyypillisesti, fosforamidaattianalogin nukleiinihapposekvenssi kohdistetaan kaksisäikeisiä geneettisiä sekvenssejä vastaan, joissa yksi säie sisältää pääasiassa puriineja ja toinen säie sisältää pääasiassa pyrimidiinejä.

Tämän keksinnön fosforamidaattianalogin oligonukleotideista testataan tripleksin muodostaminen valittuja dupleksikohdesekvenssejä vastaan käyttäen vyösiirtymäanalyysejä (esimerkki 4). Tyypillisesti, suuren prosenttiosuuden polyakryyliamidigeelejä käytetään vyösiirtymäanalyysiä varten ja denaturointiolosuhteiden tasot (Ausubel et al.; Sauer et al.; Sambrook et al.) säädetään vähentämään kaikkea ei-spesifistä taustasitomista.

Dupleksikohde leimataan (esimerkiksi käyttäen radioaktiivista nukleotidia) ja sekoitetaan kolmannen säikeen oligonukleotidin kanssa, josta testataan sen kyky muodostaa tripleksirakenteita kohdedupleksin kanssa. Leimatun dupleksioligonukleotidin liikkuvuuden siirtymä osoittaa oligonukleotidin kykyä muodostaa tripleksirakenteita.

Tripleksin muodostuminen osoitetaan vyösiirtymäanalyysissä vähentyneellä liikkuvuudella leimatun tripleksirakenteen geelissä suhteessa leimattuun dupleksirakenteeseen.

Lukuisia mahdollisia kohdepaikkoja voidaan arvioida tällä menetelmällä, mukaan lukien kohdepaikat, jotka valitaan täydestä alueesta DNA-sekvenssejä, jotka vaihtelevat pituudessa samoin kuin monimutkaisuudessa. Sekvenssispesifisen fosforamidaattianalogin sitovat molekyylit ovat mahdollisesti tehokkaita terapeuttisia aineita oleellisesti mitä tahansa sairautta tai sairaustilaa varten, joka jollain tavalla käsittää DNA:n. Tyypillisiin kohdesekvensseihin tällaisia terapeuttisia aineita varten kuuluvat: a) DNA-sekvenssit, jotka liittyvät infektioaineiden etenemiseen ja/tai säilyttämiseen, kuten bakteerti, virukset, hiiva ja muut sienet,

esimerkiksi infektioaineen metabolian katkaiseminen; ja b) sekvenssit, jotka aiheuttavat solugeenien epäsopivan ilmentymisen tai jakautumisen, kuten onkogeenien, esimerkiksi epäsopivasti ilmentyneiden solugeenien transkription estäminen tai vähentäminen (kuten geenien, jotka liittyvät tiettyihin geneettisiin sairauksiin).

Geeni-ilmentyminen tai replikaatio voidaan estää muodostamalla tripleksirakenteita alueissa, joihin vaadittujen säätelyproteiinien (tai molekyylien) tiedetään sitoutuvan (esimerkiksi HIV-transkriptioon liittyvät tekijät, kuten promoottorialoituskohdat ja SP_1-sitomiskohdat, McShan, et al.). Vaihtoehtoisesti, geenin (esim. onkogeenit) proteiinin koodaavissa alueissa olevat spesifiset sekvenssit voivat myös olla kohteena.

Kun identifioidaan fosforamidaattianalogioligonukleotidi, joka sitoo valitut dupleksikohdesekvenssikokeet, esimerkiksi edellä kuvatulla geelivyösiirtymäliikkuvuusanalyysillä, analogista testattiin vielä sen kyky muodostaa stabiileja tripleksirakenteita in vitro. Käytetään soluviljelmä- ja in vivo -analyysisysteemejä, kuten niitä, jotka on kuvattu edellä kohdassa "Antisense-sovellutuksia".

Kohdepaikat voidaan valita geenien kontrollialueessa, esim. kopioinnin aloituskohdassa tai säätelyproteiinien sitomiskohdissa (Helene ja Toulme, 1990; Birg et al., 1990; Postel et al., 1991; Cooney et al., 1988). Lisäksi, kohdepaikat voidaan valita siten, että kohde esiintyy myös mRNA-sekvensseissä (so. kopioitu sekvenssi), jolloin sallitaan oligonukleotidien, jotka on suunnattu kohtaa vastaan, toimia myös antisense-välittäjinä (katso edellä).

Lisäksi, fosforamidaattimodifioituja DNA-molekyylejä voidaan käyttää muodostamaan tripleksimolekyylejä kolmannen säikeen kohteen kanssa (so. yksisäikeinen nukleiinihappo). Esimerkiksi voidaan syntetisoida DNA-molekyyli, jossa on kaksi aluetta, jotka pystyvät muodostamaan tripleksirakenteen valitun kohteen kolmannen säikeen molekyylin kanssa. Tyypillisesti kaksi aluetta liitetään taipuvalla alueella, joka sallii kahden alueen yhdistymisen kolmannen säikeen kanssa, jolloin muodostuu tripleksi. Yksi esimerkki tällaisesta DNA-molekyylistä on T_{10}(täysin fosforamidaattimodifioitu)-C_4(sara-

na-alue)-T_{10}(fosfodiesterisidokset). Tämä molekyyli muodostaa tripleksirakenteita polyA RNA-kohteen kanssa. Vastaava DNA-molekyyli, jossa on T_{10}(fosfodiesterisidokset)-C_4(sarana-alue)-T_{10}(fosfodiesterisidokset), ei muodosta tripleksiä polyA RNA-kohteen kanssa.

Sarana-alueet voivat käsittää minkä tahansa taipuvan alueen, joka pitää kaksi tripleksin muodostavaa aluetta yhdessä ja sallii niiden yhdistyä kolmannen säikeen kanssa, jolloin muodostuu tripleksi. Kolmannen säikeen kohteet valitaan siten, että niissä on sopiva puriini/pyrimidiinipitoisuus, jotta sallitaan tripleksimolekyylien muodostuminen.

Taipuva sidos voi yhdistää kaksi tripleksin muodostavaa aluetta (tyypillisesti komplementaariset DNA-säikeet) missä tahansa valitussa orientaatiossa riippuen kohteen emässekvenssin luonteesta. Esimerkiksi, kahdella tripleksin muodostavalla alueella kummallakin on 5′- ja 3′-päät, nämä päät voidaan yhdistää taipuvalla sarana-alueella seuraavissa orientaatioissa: 5′ - 3′, 3′ - 5′, 3′ - 3′ ja 5′ - 5′.

Lisäksi, kaksisäikeisiä DNA-molekyylejä, jotka sisältävät ainakin yhden fosforamidaattisidoksen kussakin säikeessä, voidaan käyttää houkutinmolekyyleinä kopiointitekijöille tai DNA-sitomisproteiineille (esim. c-myb).

Yksisäikeistä DNA:ta voidaan myös käyttää kohdenukleiinihappona tämän keksinnön oligonukleotideille käyttäen esimerkiksi fosforamidaattialayksiköiden välistä sidosta, joka sisältää hiusneularakenteita (esim. kuva 6). Kaksi fosforamidaattianalogioligonukleotidia voidaan valita yksisäikeiseen DNA-kohteeseen suunnattua sitomista varten. Kahden fosforamidaattianalogisäikeen sitoutumisesta yksisäikeiseen DNA-kohteeseen saadaan aikaan tripleksin muodostuminen.

C. Farmaseuttisia koostumuksia

Tämä keksintö käsittää farmaseuttisia koostumuksia, jotka ovat käyttökelpoisia antisense- ja antigeeniterapioissa. Koostumukset käsittävät tehokkaan määrän N3′→P5′ fosforamidaattioligonukleotidejä yhdistelmässä farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan kanssa. Yksi tai useampi N3′→P5′ fosforamidaattioligonukleotidi (jossa on erilaiset emässekvenssit) voidaan sisällyttää annettuun formulaatioon.

N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidit, kun niitä käytetään terapeuttisissa sovellutuksissa, voidaan formuloida puhtaina tai farmaseuttisen kantajan lisäyksen kanssa. Farmaseuttinen kantaja voi olla kiinteä aine tai neste. Formulaatio annetaan sitten terapeuttisesti tehokkaassa annoksessa sen tarpeessa olevalle kohteelle.

Nestemäisiä kantajia voidaan käyttää liuosten, emulsioiden, suspensioiden ja paineistettujen koostumusten valmistuksessa. N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidit liuotetaan tai suspendoidaan farmaseuttisesti hyväksyttävään nestemäiseen kantajaan, kuten veteen, orgaaniseen liuottimeen, molempien seokseen, tai farmaseuttisesti hyväksyttäviin öljyihin tai rasvoihin. Nestemäinen kantaja voi sisältää muita sopivia farmaseuttisia lisäaineita mukaan lukien, näihin kuitenkaan rajoittumatta, seuraavat: solubilisointiaineita, suspendointiaineta, emulgointiaineita, puskureita, sakeutusaineita, värejä, viskositeetin säätelyaineita, säilöntäaineita, stabilointiaineita ja osmolaarisuuden säätelyaineita. Sopiviin esimerkkeihin nestemäisistä kantajista N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidivalmisteiden parenteraalista antamista varten kuuluvat vesi (joka sisältää osittain lisäaineita, esim. selluloosajohdannaisia, edullisesti natriumkarboksimetyyliselluloosaliuosta), alkoholit (mukaan lukien yksiarvoiset alkoholit ja moniarvoiset alkoholit, esim. glykolit) ja niiden johdannaiset, ja öljyt (esim. jakotislattu kookosöljy ja maapähkinäöljy).

N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidien parenteraalista antamista varten kantaja voi olla myös öljymäinen esteri, kuten etyylioleaatti ja isopropyylimyristaatti. Steriilit kantajat ovat käyttökelpoisia steriileissä nestemäisen muodon koostumuksissa parenteraalista antamista varten.

Steriilejä nestemäisiä farmaseuttisia koostumuksia, liuoksia tai suspensioita voidaan käyttää esimerkiksi vatsakalvonsisäisessä injektiossa, ihonalaisessa injektiossa, laskimonsisäisesti tai paikallisesti. Esimerkiksi antisense-oligonukleotidit, jotka on suunnattu verkkokalvon sytomegalovirusinfektiota vastaan, voidaan antaa paikallisesti silmätippoina. N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidit voidaan antaa myös suonensisäisesti tai suoniosuuden kautta, joka on impregnoitu

mykofenolihapolla, esimerkiksi ilmapallokatetroimisen aikana, jolloin saadaan paikallistetut antirestenoosivaikutukset heti vaurion jälkeen.

Nestemäinen kantaja paineistettuja koostumuksia varten voi olla halogenoitu hiilivety tai muu farmaseuttisesti hyväksyttävä ponneaine. Tällaiset paineistetut koostumukset voivat olla myös lipidi, joka on kapseloitu inhalaation kautta kuljetettavaksi. Nenänsisäistä tai keuhkoputkensisäistä inhalaatio- tai insuflaatioantamista varten N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidit voidaan formuloida vesipitoiseksi tai osittain vesipitoiseksi liuokseksi, jota voidaan sitten käyttää aerosolin muodossa, esimerkiksi keuhkojen infektioiden, kuten *Pneumocystis carnii*, hoitamiseksi.

N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidit voidaan antaa paikallisesti liuoksena, voiteena tai lotionina formulaatiolla farmaseuttisesti hyväksyttävien vehikkeleiden kanssa, jotka sisältävät aktiivisen yhdisteen. Esimerkiksi sukupuolielimen syylien hoitamiseksi.

N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidejä voidaan antaa liposomikantajissa. Liposomien käyttö helpottamaan solun ottokykyä kuvataan esimerkiksi US-patenteissa nrot 4 897 355 (Eppstein, D., et al., myönnetty 30.1.1990) ja 4 394 448 (Szoka, F., et al., myönnetty 19.7.1983). Lukuisat julkaisut kuvaavat liposomien formulaatioita ja valmistusta.

Annosvaatimukset N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotideillä käsittelyä varten vaihtelevat tiettyjen käytettyjen koostumusten, antamisreitin, esitettyjen oireiden vakavuuden, N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidien muodon ja tietyn hoidettavan kohteen mukaan.

Yleensä, N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidit annetaan pitoisuudessa, josta saadaan vaikuttavat tulokset ilman, että aiheutetaan mitään haitallisia tai vahingollisia sivuvaikutuksia (esim. tehokas määrä). Tällainen pitoisuus voidaan saavuttaa antamalla joko yksittäinen yksikköannos tai antamalla annos jaettuna sopiviin alayksiköihin sopivilla aikaväleillä läpi koko vuorokauden ajan.

D. Diagnostisia sovellutuksia

Fosforamidaattianalogioligonukleotidit ovat käyttökelpoisia myös diagnostisissa analyyseissä RNA:n tai DNA:n, joissa

on annettu kohdesekvenssi, havaitsemista varten. Yhdessä yleisessä sovelluksessa fosforamidaattianalogit leimataan (esim. isotooppisesti tai muulla havaittavalla reportteriryhmällä) ja niitä käytetään koettimina DNA- tai RNA-näytteille, jotka ovat sitoutuneet kantaja-aineeseen (esim. nailonmembraaneihin).

Vaihtoehtoisesti, fosforamidaattianalogioligonukleotidit voidaan sitoa kantaja-aineeseen (esimerkiksi magneettihelmet) ja homologiset RNA- ja DNA-molekyylit näytteessä erottaa muista näytteen komponenteista perustuen niiden hybridisaatioon immobilisoituihin fosforamidaattianalogeihin. Fosforamidaattianalogien sitominen kantaja-aineeseen voidaan suorittaa tavanomaisilla menetelmillä. Sitoutuneen RNA:n tai DNA:n läsnäolo voidaan havaita standardimenetelmillä, esimerkiksi käyttäen toista leimattua reportteria tai polymeraasiketjureaktiota (Mullis; Mullis, et al.).

Diagnostiset analyysit voidaan suorittaa standardimenetelmien mukaisesti sopivalla hybridisaatio-olosuhteiden säädöllä, jolloin sallitaan fosforamidaattianalogin hybridisaatio kohdealueeseen. Fosforamidaattianalogioligonukleotidien kyky sitoutua kohotetussa lämpötilassa voi myös auttaa minimoimaan kilpailua sitoutumisesta kohdesekvenssiin fosforamidaattianalogikoettimen ja minkä tahansa vastaavan yksisäikeisen fosfodiesteerioligonukleotidin välillä, joka on läsnä diagnostisessa näytteessä.

E. Muita sovellutuksia

Yhdessä aspektissa fosforamidaattianalogioligonukleotidejä voidaan käyttää menetelmissä lisäämään RNA:n tai DNA:n eristämistä näytteistä. Esimerkiksi, kuten edellä on keskusteltu, fosforamidaattianalogit voidaan kiinnittää kantaja-aineeseen ja käyttää eristämään komplementaarisia nukleiinihapposekvenssejä, esimerkiksi spesifisen mRNA:n puhdistus polyA fraktiosta (Goldberg, et al.). Fosforamidaattianalogit ovat edullisia tällaisia sovellutuksia varten, koska ne voivat muodostaa stabiilimpia vuorovaikutuksia RNA:n ja kaksisäikeisen DNA:n kanssa kuin standardi fosfodiesterioligonukleotidit.

Reportterileimatuille fosforamidaattianalogeille voidaan löytää suuri määrä sovellutuksia molekyylibiologiassa, eri-

tyisesti RNA:n havaitsemiseksi näytteissä. Fosforamidaattianalogit voidaan leimata radioaktiivisilla reporttereilla (^{3}H, ^{14}C, ^{32}P tai ^{35}S nukleotidit), biotiinilla tai fluoresoivilla leimoilla (Gryaznov, et al.). Leimattuja fosforamidaattianalogioligonukleotidejä voidaan käyttää tehokkaina koettimina esimerkiksi RNA-hybridisaatioreaktioissa (Ausubel, et al., Sambrook, et al.).

Lisäksi, kaksisäikeisiä DNA-molekyylejä, joissa kukin säie sisältää ainakin yhden fosforamidaattisidoksen, voidaan käyttää DNA-dupleksin sitovien proteiinien eristämistä varten. Tässä toteutusmuodossa dupleksi, joka sisältää fosforamidaattialayksiköiden välisiä sidoksia, kiinnitetään tyypillisesti kantaja-aineeseen ja näyte, joka sisältää epäillyn sitovan proteiinin, viedään sitten alustan yli käyttäen puskuriolosuhteita, jotka helpottavat proteiinin sitoutumista sen DNA-kohteeseen. Proteiini eluoidaan tyypillisesti kolonnista vaihtamalla puskuriolosuhteita.

Edellä kuvattuja tripleksin muodostavia DNA-molekyylejä, jotka sisältävät fosforamidaattimodifioituja sidoksia, voidaan käyttää myös diagnostisina reagensseina esimerkiksi havaitsemaan RNA-molekyylin läsnäolo näytteessä.

Lisäksi komplekseja, jotka sisältävät oligodeoksiribonukleotidejä, joissa on N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välisiä sidoksia, voidaan käyttää seulomaan käyttökelpoiset pienet molekyylit tai sitovat proteiinit: esimerkiksi N3'→P5' fosforamidaattioligodeoksiribonukleotidikomplekseja kaksisäikeisen DNA:n kanssa voidaan käyttää seulomaan pienet molekyylit, jotka edelleen pystyvät stabiloimaan tripleksirakenteen. Samanlaiset seulat ovat käyttökelpoisia N3'→P5' fosforamidaattioligodeoksiribonukleotidikompleksien kanssa, joita muodostuu yksisäikeisten DNA- ja RNA-molekyylien kanssa.

F. Muunnelmia

Tämän keksinnön menetelmissä käytettyihin fosforamidaattianalogioligonukleotidien muunnelmiin kuuluvat modifikaatiot helpottamaan solun oligonukleotidin ottokykyä (esim. koleste-roliryhmän lisäys (Letsinger, 1990); kimeeristen oligonukleotidien tuotanto käyttäen muita alayksiköiden välisiä sidoksia (Goodchild); modifikaatio interkalatointiaineiden kanssa

(esimerkiksi, tripleksiä stabilisoivat interkalatointiaineet, Wilson, et al., 1993); ja riboosin käyttö deoksiriboosialayksiköiden sijasta.

Lisämodifikaatioihin kuuluvat 5'- ja 3'-pään modifikaatiot oligonukleotideiksi (esim. -OH, -OR, -NHR, NH_2 ja kolesteroli). Lisäksi, riboosin 2'-asema voi olla lukuisien modifikaatioiden kohta, mukaan lukien, näihin kuitenkaan rajoittumatta, halogenoinnin (esim. -F).

N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidit voidaan modifioida myös konjugaatiolla polypeptidiin, joka pidätetään spesifisillä soluilla. Tällaisiin käyttökelpoisiin polypeptideihin kuuluvat peptidihormonit, antigeenit ja vasta-aineet. Esimerkiksi, voidaan valita polypeptidi, joka pidätetään spefisesti neoplastisilla soluilla, jolloin saadaan spesifinen N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidien kuljetus siihen solutyyppiin. Polypeptidi ja oligonukleotidi voidaan kytkeä alalla tunnetuilla keinoilla (katso esimerkiksi PCT kansainvälinen hakemusjulkaisu nro PCT/US89/02363, WO8912110, julkaistu 12/14/89, Ramachandr K., et al.).

Tällaisten modifioitujen fosforamidaattianalogioligonukleotidien ominaisuudet, kun niitä käytetään tämän keksinnön menetelmiin, voidaan määrittää tässä kuvatuilla menetelmillä.

Vaikka tämän keksinnön edullisia toteutusmuotoja, käyttöjä ja käytännön toteutusmenetelmiä on kuvattu yksityiskohtaisesti, on ymmärrettävä, että erilaiset muut käytöt, formulaatiot ja käytännön toteutusmenetelmät, kuten tässä on mainittu, ovat tämän keksinnön tarkastelussa.

Materiaalit ja menetelmät

Metyyli- ja syanoetyylifosforamidaatit ja H-fosfaattinukleosidireagenssit hankittiin Glen Researchistä (Sterling, VA) ja Applied Biosystems Inc:stä (Foster City, CA). Nukleosidimetyylifosfonoamidiittireagenssit hankittiin Glen Researchistä, ja DMT-dT-LCAA CPG, 500 Å, hankittiin Applied Biosystems Inc:stä.

Oligonukleotidejä entsymaattista hydrolyysiä varten, valitun oligonukleotidin 0,2 A_{260} yksiköt ja fosfodiesteraasin 0,22 U Crotalus durissus:sta (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN), inkuboitiin 100 µl:ssa 10 mM Tris·HCl:a ja 10 mM $MgCl_2$:a. Otettiin näytteet analyysiä varten 0, 10 ja 40

minuuttia, 4,5 ja 22 tuntia fosfodiesteraasin lisäyksen jälkeen. Tuotteet analysoitiin RP HPLC:llä oleellisesti kuten esimerkissä 2D on kuvattu.

Standardin nukleiinihappokemian, mukaan lukien nukleiinihappojen kemiallisen synteesin, on selostanut Miller (1990).

Kemikaalit hankittiin Aldrichilta (Milwaukee, WI), Sigmalta (St. Louis, MO) ja Calbiochemiltä (San Diego, CA).

HPLC suoritettiin tyypillisesti käyttäen Dionex kromatografia (Sunnyvale, CA). "HYPERSIL ODS" kolonnia (4,6 x 200 mm, 5 μ hiukkaskoko; Hewlett Packard, Palo Alto, CA) ja 0,5 %/minuutti CH_3CN:n gradienttia 0,05 M TEAH-puskurissa, pH 7,0, käytettiin RP HPLC:tä varten. Ioninvaihtokromatografiaa varten käytettiin Dionex "OMNI PAK" NA 100 kolonnia (4 x 250 mm) 1 %/min 1,5 M NaCl:n gradientin kanssa vedessä. "NAP 5" kolonneja Pharmacialta (Uppsala, Ruotsi) käytettiin oligonukleotidien suolan poistoa varten. Kapillaarielektroforeesi (CE) suoritettiin ABI 270A syteemillä 10-%:isten MICROGEL™ kapillaarien kanssa (0,1 x 500 mm) 35 mM Tris-boraattipuskurissa, pH 9,0. Lämpödissosiaatiokokeet tehtiin Varian IE spektrofotometrillä ja lämpötilakontrollointilaitteella. Absorbanssiarvot 260 nm:ssä ja 284 nm:ssä saatiin 1 minuutin aikavälein kuumennusnopeudella 1,0 °C/minuutti.

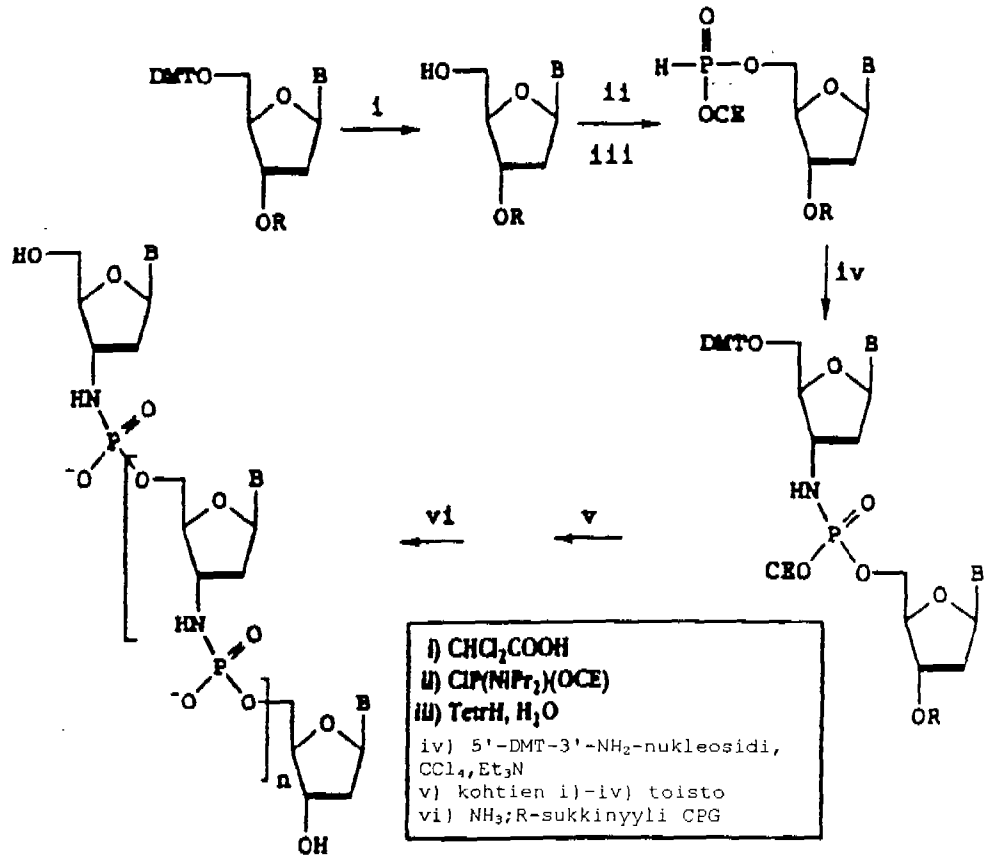
Esimerkki 1

Oligodeoksiribonukleotidi N3'→P5' fosforamidaatteja sisältävien oligonukleotidien synteesi

A. Yleisiä menetelmiä

Fosforamidaattianalogien synteesi suoritettiin joko manuaalisesti ruiskussa tai automaattisesti ABI 384 syntetisaattorilla (ABI, Foster City, CA).

Yhdenmukaisesti modifioitujen oligonukleotidien synteesin kaavamainen esitys kantaja-aineella käyttäen vaiheittaista pidennysmenetelmää esitetään alla:



Jossa R on sukkinyyli CPG (kontrolli huokoslasi), B on emäs, n on 4 - 100 ja CEO on ß-syanoetyyliryhmä.

Annetulle syklille kemialliset vaiheet, reagenssit ja reaktioajat olivat (i) detritylaatio, 3-%:inen dikloorietikkahappo dikloorimetaanissa, 1,5 min (kuva 1, kohta i); (ii) fosfitylaatio, 0,2 M 2-syanoetyyli-N,N-di-isopropyylikloorifosfiini ja 0,2 M di-isopropyylietyyliamiini dikloorimetaanissa, 10 min (kuva 1, kohdat ii); (iii) hydrolyysi, 0,4 M tetratsoli asetonitriili/vedessä, 9/1 tilavuus/tilavuus, 5 min (kuva 1, kohta iii); (iv) kytkentä, 0,2 M 5'-DMT-3'-aminonukleosidi ja 0,2 M trietyyliamiini hiilitetrakloridi/asetonitriilissä, 1/1 tilavuus/tilavuus, 20 min (kuva 1, kohta iv).

Standardi oligonukleotidit, joissa on fosfodiesterialayksiköiden välisiä sidoksia, syntetisoitiin standardimenetelmillä (ABI 384 syntetisaattori).

Kimeeristen oligomeerien rakentamiseksi 5'-DMT-N-suojattuja 3'-fosforamidaattidimeerirakennuslohkoja, joissa on 3'-

NHP(O)(OCE)O-5' fosforamidaattinukleosidin välinen sidosryhmä, käytettiin synteesiä varten tavanomaisen fosforamidaattimenetelmän kanssa (oleellisesti, kuten Gryaznov, et al., ovat aikaisemmin kuvanneet, sisällytetty tähän viittauksella).

Tyypillisiä oligonukleotidejä, jotka on syntetisoitu tämän keksinnön menetelmällä, esitetään kuvassa 3. Synteesin lisäyksityiskohdat ovat tässä.

B. Oligonukleotidi N3'→P5' fosforamidaattien manuaalinen synteesi

Kontrolloitu huokoslasi (CPG) polymeerialusta, joka sisältää 1 μmol 5'-DMT-N-suojattua nukleosidia, asetettiin 1 ml Hamilton kaasutiiviiseen ruiskuun, joka oli varustettu lasivillatulpalla pohjalla.

Annetulle synteesin syklille reagenssit vedettiin sisään ja työnnettiin ruiskusta seuraavan käytännön mukaisesti:

1. Detritylaatio - 3-%:inen dikloorietikkahappo dikloorimetaanissa, 5 x 0,5 ml, 1,5 min.

2. Pesu - asetonitriili, 6 x 0,5 ml.

3. Fosfitilaatio - 0,2 M 2-syanoetyyli-N,N-di-isopropyylikloorifosfiini ja 0,2 M di-isopropyylietyyliamiini dikloorimetaanissa, 0,5 ml, 10 min ravistellen ajoittain. 4 . Hydrolyysi - 0,4 M tetratsoli asetonitriili/vedessä, 9/1 tilavuus/tilavuus, 5 min ravistellen ajoittain.

5. Pesu - vedetön asetonitriili, 10 x 0,5 ml.

6. Kytkentä - 0,2 M 5'-DMT-3'-aminonukleosidi ja 0,2 M trietyyliamiini hiilitetrakloridi/asetonitriilissä, 1/1 tilavuus/tilavuus, 20 min ravistellen. Kytkennän jälkeen liuos otettiin talteen reagoimattoman nukleosidin saamiseksi talteen.

7. Pesu - asetonitriili, 6 x 0,5 ml.

Kohtia 1 - 7 toistettiin, kunnes haluttu oligonukleotidi valmistettiin. Keskimääräiset kytkentäsaannot olivat 94 - 96 % pääteltynä DMT-kationianalyysin perusteella. Lopetettaessa syklit alustaan sidottu oligomeeri detrityloitiin. Alustasta pilkkomisesta ja N-suojauksen poistosta väkevällä ammoniumhydroksidilla saatiin raa'at oligonukleotidit, jotka puhdistettiin ioninvaihto-HPLC:llä.

C. Vaihtoehtoisia N3'→P5' fosforamidaatti- O3'→P5' fosfodiesterisidoksia sisältävän oligonukleotidin 2 manuaalinen

synteesi

5'-DMT-3'-aminotymidiini- ja 5'-DMT-tymidiini-3'-fosforamidaattialayksiköitä käytettiin syntetisoimaan oligonukleotidejä, joissa on vaihtoehtoisia N3'→P5' fosforamidaatti- ja O3'→P5' fosfodiesterisidoksia.

Oligonukleotidin 2 (SEQ ID NO:2) synteesiä varten yksi mikromooli T-CPG:tä (tymidiiniliitetty CPG) laitettiin 1 ml:n Hamilton kaasutiiviiseen ruiskuun. 5'-DMT-3'-aminotymidiinialayksiköiden lisäys suoritettiin kuten edellä on kuvattu. 5'-DMT-tymidiini-3'-fosforamidaattialayksiköiden lisäys suoritettiin standardi synteettisillä menetelmillä (Applied Biosystems, Foster City CA).

Yhdeksännen kytkentäreaktion jälkeen polymeerialustaa käsiteltiin väkevällä ammoniumhydroksidilla raa'an oligomeerin vapauttamiseksi. Oligonukleotidi puhdistettiin ioninvaihto-HPLC:llä (esim. esimerkki 2). Oligonukleotidi 2 analysoitiin CE:llä ja ^{31}P NMR:llä (esim. esimerkki 2).

D. 5'-DMT-N-isobutyryyli-3'-amino-2',3'-dideoksiguanosiinin synteesi

Seuraavat vaiheet kuvaavat 5'-DMT-N-isobutyryyli-3'-amino-2',3'-dideoksiguanosiinin synteesimenetelmää, joka on analoginen menetelmän kanssa, joka on kuvattu tässä adenosiinialayksiköille.

1. 5'-O-bentsoyyli-N-isobutyryyli-2'-deoksiguanosiini valmistettiin N-isobutyryyli-2'-deoksiguanosiinista oleellisesti Nishino, et al. (1986) menetelmän mukaisesti, menetelmät sisällytetään tähän viittauksella, paitsi että tuote puhdistettiin seuraavasti: jakouuttaminen CH_2Cl_2:lla ja vedellä, CH_2Cl_2-kerroksen väkevöinti tyhjössä ja tuotteen kiteytys eetterillä. Suodatuksella talteen ottamisen jälkeen tuotetta sekoitettiin yön yli uudessa eetterissä ja otettiin uudelleen talteen suodattamalla. 5'-O-bentsoyyli-N-isobutyryyli-2'-deoksiguanosiinin kokonaissaanto oli 50 - 80 %.

2. 5'-O-bentsoyyli-N-isobutyryyli-2'-deoksiksyloguanosiini valmistettiin 5'-O-bentsoyyli-N-isobutyryyli-2'-deoksiguanosiinista oleellisesti Herdewijn ja van Aerschotin (1989) menetelmän mukaisesti, menetelmät sisällytetään tähän viittauksella. Tuote puhdistettiin kuivaamalla raaka seos tyhjössä, sitten liuotettiin CH_2Cl_2:iin. 3'-O-bentosyyli-N-isobuty-

ryyli-2'-deoksiksyloguanosiinituote saostui spontaanisti ja saatiin suodattamalla.

3. 5'-O-(4,4'-dimetoksitrityyli)-3'-O-bentsoyyli-N-isobutyryyli-2'-deoksiksyloguanosiini. Kuiva 3'-O-bentsoyyli-N-isobutyryyli-2'-deoksiksyloguanosiini (7,3 g) ja 7,9 g 4,4'-dimetoksitrityylikloridia liuotettiin 150 ml:aan vedetöntä pyridiiniä. 24 tunnin kuluttua seokseen lisättiin 1 ml vettä. Sitten seos väkevöitiin tyhjössä vaahdoksi, joka sisälsi 5'-O-(4,4'-dimetoksitrityyli)-3'-O-bentsoyyli-N-isobutyryyli-2'-deoksiksyloguanosiinituotteen. Vaahto liuotettiin 300 ml:aan CH_2Cl_2:a, pestiin 250 ml:lla vettä ja väkevöitiin uudelleen tyhjössä.

4. 5'-O-(4,4'-dimetoksitrityyli)-N-isobutyryyli-2'-deoksiksyloguanosiini. Raaka 5'-O-(4,4'-dimetoksitrityyli)-3'-O-bentsoyyli-N-isobutyryyli-2'-deoksiksyloguanosiini liuotettiin 1,2 l:aan 5:4:1 dioksaani:metanoli:vettä ja jäähdytettiin jäähauteessa. Tähän seokseen lisättiin 120 ml 2 N NaOH:-a. Saatua seosta sekoitettiin 0 °C:ssa 25 minuutin ajan ja neutraloitiin pyridinium H^+-muodon Dowex 50 ioninvaihtohartsilla. 2 - 3 minuutin kuluttua hartsi poistettiin suodattamalla ja tuote väkevöitiin lietteeksi tyhjössä. Valkoinen sakka lietteessä (5'-O-(4,4'-dimetoksitrityyli)-N-isobutyryyli-2'-deoksiksyloguanosiini) poistettiin suodattamalla, pestiin vedellä, kuivattiin ilmalla ja kuivattiin tyhjössä P_2O_5:lla.

5. 5'-O-(4,4'-dimetoksitrityyli)-3'-amino-N-isobutyryyli-2',3'-dideoksiguanosiini. Raakaan 5'-O-(4,4'-dimetoksitrityyli)-N-isobutyryyli-2'-deoksiksyloguanosiiniin lisättiin 7,9 g trifenyylifosfiinia ja 4,8 g LiN_3:a. Seosta kuivattiin edelleen tyhjössä P_2O_5:lla 3 tunnin ajan. Nämä kuivat yhdisteet liuotettiin 450 ml:aan vedetöntä dimetyyliformamidia. Tähän liuokseen lisättiin 5,3 ml dietyyliatsodikarboksylaattia. Seosta sekoitettiin yön yli, 1 ml vettä lisättiin ja liuotin poistettiin tyhjössä.

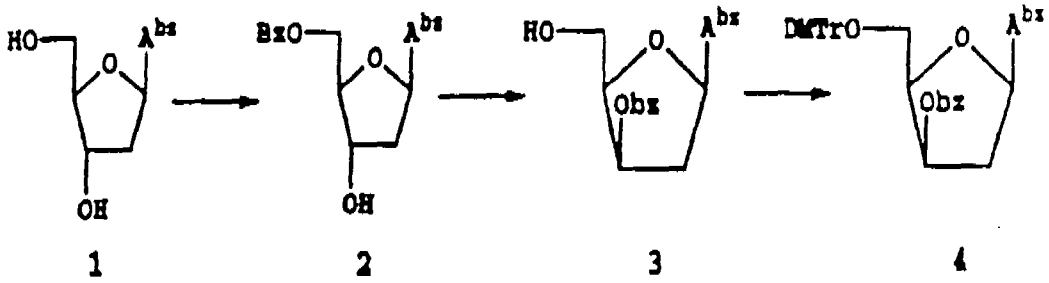
Yksi litra CH_2Cl_2:a lisättiin kuivattuun seokseen ja saatua seosta pestiin kahdesti kullakin kerralla 1 l:lla vettä. CH_2Cl_2-kerros väkevöitiin tyhjössä vaalean ruskeaksi öljyksi, joka sitten liuotettiin 600 ml:aan 10-%:ista trietyyliamiinia pyridiinissä. Tämä seos jäähdytettiin jää-

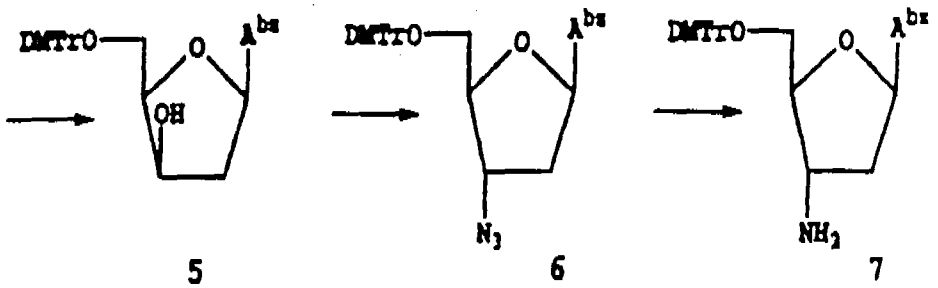
hauteessa ja H_2S lisättiin kuplittamalla. 30 minuutin kuluttua jäähaude poistettiin ja H_2S-virtausta jatkettiin vielä 3 tuntia. Liuos väkevöitiin tyhjössä vaalean ruskeaksi öljyksi.

Öljyn flash-kromatografia silikageelipylväällä, jota oli esikäsitelty 0,5-%:isella pyridiinillä CH_2Cl_2:ssa, sitten eluoitu 0 - 5-%:isen metanolin gradientilla CH_2Cl_2:ssa, tuotti 3,5 g 5'-O-(4,4'-dimetoksitrityyli)-3'-amino-N-isobutyryyli-2',3'-dideoksiguanosiinia (kuva 1C).

E. 5'-DMT-N-bentsoyyli-3'-amino-2',3'-dideoksiadenosiinin synteesi

3'-amino-N^6-5'-dimetoksitrityyli-2',3'-dideoksiadenosiinin synteesin vaiheet havainnollistetaan alla:





1. N^6-5'-dibentsoyyli-2'-deoksiadenosiinin valmistus. Bentsoyylikloridin (2,45 ml, 21 mmol) liuos pyridiinissä (150 ml) lisättiin tipoittain N^6-bentsoyyli-2'-deoksiadenosiinin (yhdiste 1, kuva 20) (5 g, 14 mmol) liuokseen pyridiinissä (45 ml) huoneenlämpötilassa yli noin 1 tunnin aikana. Reak-

tioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa vielä tunnin ajan. Reaktioseos vaimennettiin metanolilla (5 ml) ja haihdutettiin kuiviin.

Jäännös liuotettiin CH_2Cl_2:iin, pestiin kyll. vesipit. $NaHCO_3$:lla ja H_2O:lla. Orgaaninen kerros kuivattiin sitten Na_2SO_4:lla ja haihdutettiin kuiviin. Jäännös liuotettiin CH_2Cl_2:iin ja altistettiin pylväskromatografialle (silikageeli, 70 - 230 mesh, 200 g), eluoitiin 5-%:isella CH_3OH/CH_2Cl_2:lla ja liuotin poistettiin haihduttamalla, jolloin saatiin 6 g (93 %) haluttua N^6-5'-dibentsoyyli-2'-deoksiadenosiinituotetta (yhdiste 2, kuva 20).

2.N^6-bentsoyyli-9-(3'-O-bentsoyyli-2'-deoksi-ß-D-treopenteofuranosyyli)adeniinin valmistus. Trifluorimetaanisulfonihapon anhydridi (4,2 ml, 25 mmol) lisättiin N^6-5'-dibentsoyyli-2'-deoksiadenosiinin (7,5 g, 16,3 mmol) suspensioon 10-%:isessa pyridiini/CH_2Cl_2:ssa (150 ml) 0 °C:ssa. Reaktioseosta sekoitettiin 0 °C:ssa 30 minuutin ajan, minkä jälkeen lisättiin H_2O (26 ml). Sitten reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli ja haihdutettiin kuiviin.

Jäännös liuotettiin uudelleen CH_2Cl_2:iin, pestiin kyll. vesipit. $NaHCO_3$:lla, H_2O:lla ja kuivattiin Na_2SO_4:lla. Orgaaninen kerros haihdutettiin kuiviin, jolloin saatiin ruskea öljy, joka sisälsi N^6-bentsoyyli-9-(3'-O-bentsoyyli-2'-deoksi-ß-D-treopenteofuranosyyli)adeniinituotteen (yhdiste 3, kuva 20), jota käytettiin ilman lisäpuhdistusta.

3. N^6-bentsoyyli-9-(3'-O-bentsoyyli-5'-dimetoksitrityyli-2'-deoksi-ß-D-treopentofuranosyyli)adeniinin valmistus. N^6-bentsoyyli-9-(3-O-bentsoyyli-2'-deoksi-ß-D-treopenteofuranosyyli)adeniini liuotettiin pyridiiniin (60 ml). Dimetoksitrityylikloridia sekoitettiin sitten huoneenlämpötilassa yön yli. Reaktio vaimennettiin CH_3OH:lla. Seos haihdutettiin kuiviin. Jäännös liuotettiin uudelleen CH_2Cl_2:iin, pestiin kyll. vesipit. $NaHCO_3$:lla, H_2O:lla, kuivattiin Na_2SO_4:lla ja haihdutettiin. Jäännös liuotettiin CH_2Cl_2:iin ja altistettiin pylväskromatografialle (silikageeli, 70 - 230 mesh, 400 g), eluoitiin 4-%:isella CH_3OH/CH_2Cl_2:lla. Haluttu fraktio, joka sisälsi N^6-bentsoyyli-9-(3-O-bentsoyyli-5-dimetoksitrityyli-2-deoksi-ß-D-treopentofuranosyyli)adeniinituotteen (yhdiste

4, kuva 20), otettiin talteen ja haihdutettiin kuiviin. Tuotteen saanto oli 7 g (56 % N^6-5'-dibentsoyyli-2'-deoksiadenosiinista).

4. N^6-bentsoyyli-9-(5'-O-dimetoksitrityyli-2'-deoksi-ß-D-treopentofuranosyyli)adeniinin valmistus. Vesipitoinen NaOH (2 M, 40 ml) lisättiin N^6-bentsoyyli-9-(3-O-bentsoyyli-5-dimetoksitrityyli-2-deoksi-ß-D-treopentofuranosyyli)adeniinin (7 g, 9,2 mmol) liuokseen seoksessa, jonka muodostivat p-dioksaani (200 ml), CH_3OH (160 ml) ja H_2O (40 ml) 0 °C:ssa. Reaktioseosta sekoitettiin 0 °C:ssa 25 minuutin ajan. Reaktio päätettiin lisäämällä Dowex 50 x 2-100 ioninvaihtohartsi (pyridiniummuoto), jolloin neutraloitiin liuos pH-arvoon 7. Kiinteä aine poistettiin suodattamalla ja liuotin haihdutettiin kuiviin.

Jäännös liuotettiin CH_2Cl_2:iin, pestiin kyll. vesipit. $NaHCO_3$:lla, kuivattiin Na_2SO_4:lla ja haihdutettiin kuiviin, jolloin saatiin vaalean keltainen kiinteä aine, joka sisälsi N^6-bentsoyyli-9-(5-O-dimetoksitrityyli-2-deoksi-ß-D-treopentofuranosyyli)adeniinituotteen (yhdiste 5, kuva 20). Tätä tuotetta käytettiin ilman lisäpuhdistusta. Tuotteen saanto edeltävästä kohdasta oli 6 g (99 %).

5. 3'-amino-N^6-bentsoyyli-5'-dimetoksitrityyli-2',3'-dideoksiadenosiinin valmistus. Dietyyliatsodikarboksylaatti (1,42 ml, 9 mmol) lisättiin N^6-bentsoyyli-9-(5-O-dimetoksitrityyli-2-deoksi-ß-D-treopentofuranosyyli)adeniinin (2 g, 3 mmol) suspensioon DMF:ssa (40 ml), suspensio sisältää lisäksi trifenyylifosfiinin (2,4 g, 9 mmol) ja LiN_3:n (4,1 g, 83,8 mmol). Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli ja haihdutettiin kuiviin. Jäännös liuotettiin CH_2Cl_2:iin, pestiin kyll. vesipit. $NaHCO_3$:lla, H_2O:lla, kuivattiin Na_2SO_4:lla ja haihdutettiin, jolloin saatiin ruskea öljy. Ruskea öljy liuotettiin CH_2Cl_2:iin ja altistettiin pylväskromatografialle (silikageeli, 70 - 230 mesh, 100 g), eluoitiin 3-%:isella CH_3OH/CH_2Cl_2:lla, jolloin saatiin yhdiste 6 (kuva 20) vaalean ruskeana öljynä.

Tämä öljy liuotettiin 15-%:iseen trietyyliamiini/pyridiiniin (36 ml). Vetysulfidia kuplitettiin sitten liuokseen 0 °C:ssa 30 minuutin ajan. Liuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 30 lisäminuutin ajan. Liuotin haihdu-

tettiin kuiviin. Jäännös liuotettiin CH_2Cl_2:iin, pestiin kyll. vesipit. $NaHCO_3$:lla, H_2O:lla, kuivattiin Na_2SO_4:lla ja haihdutettiin kuiviin. Jäännös liuotettiin CH_2Cl_2:iin ja altistettiin pylväskromatografialle (silikageeli, 70 - 230 mrsh, 100 g), eluoitiin 5-%:isella CH_3OH/CH_2Cl_2:lla, jolloin saatiin lopputuote 3'-amino-N^6-bentsoyyli-5'-dimetoksitrityyli-2',3'-dideoksiadenosiini (yhdiste 7, kuva 20; kuva 1e). Tuotteen saanto edellisestä kohdasta oli 1,6 g (80 %). Vaihtoehtoisesti, pelkistys voidaan saada aikaan käyttäen H_2:ä Pt/hiili-katalyytillä.

F. Muiden DMT-alayksiköiden synteesi

5'-DMT-3'-aminotymidiinin ja 5'-DMT-N-bentsoyyli-3'-aminosytidiinin synteesi suoritettiin Glinski, et al. (1970) mukaisesti.

Esimerkki 2

N3'→P5' fosforamidaattisidoksia sisältävien oligonukleotidien karakterisointi

Oligonukleotidit, jotka syntetisoitiin kuten esimerkissä 1 on kuvattu, arvioitiin seuraavilla menetelmillä.

A. Puhdistus ioninvaihtokromatografialla

Oligonukleotidit puhdistettiin ylimäärästä reaktiokomponentteja ioninvaihto (IE) HPLC:llä. IE HPLC -analyysit suoritettiin Dionex (Sunnyvale, CA) kromatografilla. Käytettiin Dionex "OMNIPAC NA100" 4 x 25 mm kolonnia, 1 %/min tai 2 %/min gradientti 1,0 M NaCl:a 0,03 M TEAA-puskurissa, pH 7,0; virtausnopeus 1,0 ml/min.

Kuva 4A esittää reaktioseoksen tyypillisen HPLC-kromatogrammin fosforamidaatti oligonukleotidin 3 synteesin jälkeen (kuva 3). Suurin piikki kuvassa vastaa oligonukleotidi 3 tuotetta. 3'-NHP(O)(O^-)O-5' fosforamidaattien retentioaika IE HPLC kolonnilla oli 1,0 - 1,5 minuutti lyhyempi kuin retentioaika vastaaville fosfodiesteriyhdisteille. Sitten tuote väkevöitiin saostamalla etanolilla ja suspensoitiin uudelleen veteen.

B. Oligonukleotidien puhtaus

Syntetisoitujen oligonukleotidien puhtaus arvioitiin tyypillisesti kapillaarigeelielektroforeesilla. Kapillaarielektroforeesi suoritettiin käyttäen Applied Biosystems Incorporated Model 270A konetta "MICKROGEL" kapillaariputkil-

la seuraten oleellisesti valmistajan ohjeita.

Kuva 4B esittää reaktioseoksen tyypillisen kapillaarigeelielektroforeesin profiilin undekafosforamidaatin 6 synteesin jälkeen (kuva 3).

Vaihtoehtoisesti, eristettyjen oligonukleotidien puhtaus arvioidaan näytteiden elektroforeettisella erottamisella suuren prosenttiosuuden polyakryyliamidigeeleissä, esimerkiksi 20 % akryyliamidia, 5 % bis-akryyliamidia (Ausubel, et al.; Maniatis, et al.). Oligonukleotidit visualisoitiin värjäämällä etidiumbromidilla ja altistettiin UV-valolle. Suhteelliset liikkuvuudet polyakryyliamidigeeleissä 3'-NHP(O)(O^-)O-5' fosforamidaattien elektroforeettisen erottamisen jälkeen olivat 10 - 15 % pienempiä kuin vastaaville fosfodiesteriyhdisteille.

C. Ydinmagneettisen resonanssin analyysi

NMR-spektrit tallennettiin Varian XL-400 (Varian Associates, Palo Alto, CA) spektrometrillä 162 MHz:ssä ^{31}P-spektrille, 85-%:inen ortofosforihappo D_2O:ssa ulkoisena standardina, ja 400 MHz:ssä ^{1}H-spektrille, tetrametyylisilaani (TMS) ulkoisena standardina.

Tyypilliset tulokset esitetään kuvassa 4C, joka esittää puhdistetun dekafosforamidaattioligonukleotidin 3 ^{31}P-NMR-spektrin (kuva 3). Spektri esittää piikin δ:ssä, ppm, 7,12, joka on karakteristinen fosforamidaattiryhmille.

D. Hydrolyysituotteiden käänteisfaasi suuren suorituskyvyn nestekromatografia -analyysi

Puhdistettu fosforamidaatti 10-meeri oligonukleotidi 3 (kuva 3) hydrolysoitiin käsittelemällä 80-%:isella etikkahapolla 48 tunnin ajan 25 °C:ssa. Hydrolyysituotteet arvioitiin käänteisfaasi (RP) HPLC:llä. RP HPLC -analyysit suoritettiin Dionex-kromatografilla "HYPERSIL ODS" 5 μ:lla, 4,6 x 200 mm kolonnin Hewlett Packardilta (Palo Alto, CA), käyttäen 1 % minuutissa asetonitriilin gradienttia 0,03 M TEAA-puskurissa, pH 7,0; virtausnopeus 1 ml/min. Hydrolyysituotteet identifioitiin 3'-amino-5'-tymidiliinihapoksi, 5'-tymidiliinihapoksi ja 3'-aminitymidiiniksi. Lisäksi, noin 7 % hydrolyysituotteista (kokonaispiikit) oli vähäisiä sivutuotteita. Nämä tulokset vahvistavat N3'→P5' fosforamidaattisidosten läsnäolon oligonukleotidissa.

Esimerkki 3

Lämpödissosiaatio

A. Dupleksin sulaminen

Lämpödissosiaatiokäyrät saatiin käyttäen Carry 1E spektrofotometriä (Varian, Palo Alto, CA), joka oli varustettu lämpötilan kontrollointilaitteella (Varian). Reaktioliuokset sisälsivät ekvivalentit pitoisuudet oligomeeriä ja komplementtiä (noin 6 μM oligomeerisäikeessä) 15 mM fosfaattipuskurissa pH:ssa 7,05, NaCl lisättiin, jolloin saatiin Na+ kokonaispitoisuus 100 mM.

Molaariset ekstinktiokertoimet, joita käytettiin oligo(dT):lle, poly(dA):lle ja poly(A):lle olivat 8,2, 8,4 ja vastaavasti 10,2 A_{260} x 10^3. Ekstinktiokerrointa 109 A_{260} yksikköä/μM käytettiin sekaemäksisiä oligomeerejä varten, ekstinktiokerroin laskettiin taulukosta, jonka on koonnut P.N. Borer (1975).

Reaktioliuokset tasapainotettiin 0 °C:ssa ja absorbanssia 260 nm:ssä seurattiin, kun lämpötila kohosi 3 °C:n nousuna 5 minuuttia kohti. Oligomeerin fraktio sitoutuneessa tilassa, α, annetussa lämpötilassa määritettiin käyttämällä ylä- ja alaperusviivoja, kuten Abergo, et al. (1981) kuvaavat. T_m-arvot määriteltiin lämpötilana, jossa α = 0,5. Ink-käyrät (Marky, et al., 1987) versus 1/T olivat lineaarisia näille yhdisteille.

Lämpödenaturointitutkimusten tulokset piirrettiin myös normalisoituna absorbanssina 260 nm:ssä lämpötilaa °C:ssa vastaan. Kuvat 5A ja 5B esittävät tyypilliset sulamiskäyrät duplekseille, jotka fosfodiesteri- ja fosforamidaattioligomeerit muodostavat. Kuvissa: (A),(C) ja (B),(D), vastaavasti, vastaavat kuvaa 3, kokeita 8, 9, käyttäen fosfodiesteri oligonukleotidia 4); ja kuvaa 3, kokeita 13, 14 käyttäen fosforamidaatti oligonukleotidia 6).

Lämpöstabiilisuustiedot on koottu kuvaan 3 {T_m(°C)}. Taulukossa T_m on lämpötila sulamiskäyrän keskipisteessä; np on lyhenne 3'-NHP(O)(O^-)O-5' fosforamidaattisidokselle.

Oligonukleotidien pitoisuudet olivat tyypillisesti 5 μM oligomeerisäikeissä. Puskuria A (10 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH 7,02) käytettiin dupleksin lämpöstabiilisuustutkimuksia varten.

B. Oligonukleotidihiusneuloja

Oligonukleotidien, jotka sisältävät fosforamidaattisidoksia molemmissa komplementaarisissa säikeissä, muodostamien dupleksien stabiilisuutta arvioitiin oleellisesti kuten edellä on kuvattu. Syntetisoitiin kuvassa 6 esitetyt kimeeriset fosforamidaatti-fosfodiesterihiusneulaoligomeerit.

Kaikki kuvassa 6 olevat molekyylit rakennettiin käyttäen 2'-deoksiribonukleotidejä.

Lämpödissosiaatiokokeet suoritettiin oleellisesti kuten edellä on kuvattu, mutta seuraavilla reaktio-olosuhteilla: 10 mM Tris HCl puskuri, pH 7,02 oligonukleotidipitoisuudessa 2,5 μM.

T_m-arvot, jotka saatiin näistä kokeista, on koottu kuvaan 6.

C. Tripleksin sulaminen

Tripleksin lämpöstabiilisuudet arvioitiin oleellisesti kuten edellä on kuvattu duplekseille. Puskuriolosuhteet olivat joko kuten edellä on kuvattu (puskuri A) tai käytettiin toista puskuria, puskuri B (10 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, pH 7,02).

Kuvat 7A - 7D esittävät tyypillisiä tripleksin sulamiskäyriä. Kuvat 7A ja 7C esittävät normalisoidun absorbanssin 260 nm:ssä piirrettynä lämpötilaa vastaan. Kuvat 7B ja 7D esittävät normalisoidun absorbanssin 284 nm:ssä piirrettynä lämpötilaa vastaan. Kuvissa: kaksisäikeisen DNA:n ja fosforamidaatti oligonukleotidin 3 muodostamat tripleksit vastaavat mustien ympyröiden viivaa; tripleksit, jotka muodostuvat fosfodiesteri oligonukleotidin 1 kanssa, vastaavat avoimien neliöiden viivaa.

Tiedot vastaavat kuvan 3 koetta 7, jossa käyrät (A) ja (C) olivat lämpöstabiilisuustutkimuksia, jotka suoritettiin käyttäen puskureita A ja vastaavasti B, hyperkromisuutta tarkkailtiin 260 nm:ssä. Käyrät (B) ja (D) ovat (A) ja vastaavasti (C), mutta joissa hyperkromisuutta tarkkailtiin 284 nm:ssä.

Kuvissa 7A - 7D esitetyt tiedot osoittavat, että fosfodiesteri oligonukleotidi 1 ei muodostanut tripleksejä samojen kaksisäikeisten DNA-kohteiden kanssa kuin fosforamidaatti oligonukleotidi 3.

Esimerkki 4

Geelivyön liikkuvuussiirtymäanalyysit

Tripleksirakenteita arvioitiin edelleen käyttäen geelivyön liikkuvuussiirtymäanalyysejä.

A. Fosforamidaatti oligonukleotidi 3

Geelivyön liikkuvuussiirtymäanalyysin olosuhteet olivat seuraavat: 20 % akryyliamidia, 5 % bis-akryyliamidia 10 mM $MgCl_2$:ssa, 80 mM Tris-boraattipuskurissa, pH 8,2, 10 °C. Geelit ajettiin tyypillisesti luonnollisissa (ei-denaturoivissa) olosuhteissa. Tyypilliset tulokset tällaisesta geelivyön liikkuvuussiirtymäanalyysistä esitetään kuvassa 8. Kuvassa kaistat ovat seuraavat: 1 - 10-meeri fosfodiesteri oligonukleotidi 1; 2 - 10-meeri fosforamidaatti oligonukleotidi 3; 3 - 24-meeri hiusneulakohde $d(A_{10}C_4T_{10})$ (kuva 3, koe 7). Kaistassa 3 hitaasti liikkuva vähäinen vyö vastaa todennäköisesti bimolekulaarista $d(A_{10}C_4T_{10})$:n dupleksia; 4 - hiusneulakohde ja oligonukleotidi 1; 5 - hiusneulakohde ja oligonukleotidi 3.

Geeli värjättiin STAINS-ALL™:lla (Kodak, Rochester NY) ja kuvannettiin Molecular Dynamics (sunnyvale, CA) densitometrillä. Fosforamidaatti oligonukleotidi 3 värjäytymisen tehokkuus on erilainen kuin fosfodiesteriyhdisteillä (oligonukleotidi 1 ja dupleksi).

Kuvassa tripleksirakenteen liikkuvuus merkitään nuolella. Kuten kuvassa esitetyistä tuloksista voidaan nähdä, geelivyön liikkuvuussiirtymäanalyysin tulokset vahvistavat lämpödenaturaatiotutkimuksista saadut tulokset, so. että oligonukleotidi 1 ei pysty muodostamaan tripleksiä saman kohteen kanssa kuin oligonukleotidi 3.

B. Fosforamidaatti oligonukleotidi 6

Fosforamidaatti oligonukleotidin 6 analogin tripleksin muodostaminen kaksisäikeisen DNA-kohteen kanssa vahvistettiin myös geelivyön liikkuvuussiirtymäanalyysillä.

Geelivyön liikkuvuussiirtymäanalyysin olosuhteet olivat oleellisesti kuten edellä on kuvattu. Analyysien tulokset esitetään kuvassa 9. Kuvassa kaistat olivat seuraavat: 1 - 11-meeri fosfodiesteri oligonukleotidi 4; 2 - 11-meeri fosforamidaatti oligonukleotidi 6; 3 - 26-meeri hiusneulakohde (SEQ ID NO:22); 4 - hiusneulakohde ja oligonukleotidi 4; 5 -

hiusneulakohde ja oligonukleotidi 6.

Kuvassa tripleksirakenteen liikkuvuus merkitään nuolella. Kuten edellä on nähty, fosfodiesterioligonukleotidi 4 ei pysty muodostamaan tripleksiä saman kohteen kanssa kuin oligonukleotidi 6.

Esimerkki 5

Fosforamidaattianalogien in vitro arviointi

Syntetisoitiin N3'→P5' fosforamidaattisidoksia sisältävät antisense-oligonukleotidit, jotka olivat komplementaarisia BCR/ABL fuusioliitoksen (B2A2) kanssa leukemiasolulinjassa BV173. Seuraava analyysi mittaa leukemiasolijakautumista ja se suoritetaan oleellisesti kuten Anfossi et al. (1989) kuvaavat.

Lyhyesti, kuva 10 havainnollistaa BCR-ABL oligomeerien vaikutuksen BV173-solujen, joissa on B2A2-tyypin taitepisteet, leukemiasolujakautumiseen. BV173 on leukemiasolulinja, jossa on B2A2 BCR/ABL fuusioliitos (Pegoraro, et al., 1983). HL60 on promyelosyyttinen leukemiasolulinja, jossa on normaali c-abl kohta (Collins, et al., 1977). K562 on leukemiasolulinja, jossa on B3A2 BCR/ABL fuusioliitos (Seelig, et al., 1993).

Solut (5×10^4) laitettiin 0,2 ml:aan nestemäistä supensioviljelmää (Iscoven modifioitu Dulbeccon modifioitu väliaine, jossa on 2 % ihmisen AB-seerumia, Life Technologies, Gaithersburg, MD).

Oligonukleotidit annettiin viljelmiin 24 tunnin aikavälein kolmen vuorokauden ajan (päivinä 0, 1 ja 2), jolloin saatiin aikaan kasvavat pitoisuudet, jotka on esitetty kuvien 10 - 19 selityksissä (kaikki pitoisuudet µg/ml), esimerkiksi kuva 10 - 40/20/20; 20/10/10; 10/5/5 ja 5/2,5/2,5. Huomaa, että esimerkiksi 40/20/20 heijastaa lopullisen kokonaispitoisuuden 80 µg/ml soluviljelyväliaineessa viimeisen oligonukleotidilisäyksen jälkeen. Solulaskennat suoritettiin standardimenetelmillä.

Kuva 10 esittää analyysin tulokset käyttäen täysin modifioitua N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidia 6 (SEQ ID NO:6) kuvatekstissä esitetyissä pitoisuuksissa. Kohdesolut olivat BV173-soluja. Tulokset osoittavat, että fosforamidaattioligonukleotidi on erittäin tehokas inhiboimaan leukemiasolujen

kasvua, jopa alhaisimmissa käytetyissä pitoisuuksissa.

Kuva 11 esittää HL60-solujen, ei-BRC-ABL ilmentävä solulinja, käsittelyn tulokset oligonukleotidin 6 kanssa. Tulokset osoittavat, että kaikissa pitoisuuksissa solut sietivät hyvin oligonukleotidia. Selvää sytotoksisuutta ei ollut.

Kuvat 12 ja 13 esittävät samanlaisten kokeiden tulokset tuloksiin, jotka on esitetty kuvissa 10 ja 11, vastaavasti. Jopa alhaisimmissa pitoisuuksissa (0,3125/0,15625/0,15625) N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidi 6 on erittäin tehokas inhiboimaan leukemiasolujakautumista (kuva 12) samalla, kun se säilyttää merkityksettömän toksisuuden (kuva 13).

Kuvat 14 ja 15 esittävät samanlaisten kokeiden tulokset tuloksiin, jotka on esitetty kuvissa 10 ja 11, vastaavasti. Kuitenkin kokeessa, joka vastaa kuvassa 15 esitettyjä tietoja, kohdesolu oli K562, joka sisältää B3A2 BCR/ABL fuusioliitoksen. Kuvassa 14 esitetyn kokeen tiedoissa esitetään siirtymäpitoisuudet N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidin 6 tehokkuudelle viljelmässä. Spesifisesti, pitoisuudessa 0,0198/0,0098/0,0098 jonkin verran jakautumisen inhibition vapautumista voidaan nähdä oligonukleotidilla 6.

Lisäksi, kuvassa 15 esitetyt tiedot osoittavat, että fosforamidaattioligonukleotidilla 6 ei oleellisesti ollut vaikutusta K562-solujen, joissa on B3A2 fuusioliitos, jakautumiseen. Nämä tulokset osoittavat, että solun jakautumisen vastainen vaikutus liittyy spesifisesti B2A2 BCR/ABL fuusioliitokseen, jonka kanssa fosforamidaattioligonukleotidi 6 on komplementaarinen.

Verrattuna, kuvat 16 - 19 esittävät samanlaiset tiedot 16-meerille (SEQ ID NO:26), jossa on täysin modifioidut fosforotioaattialayksiköiden väliset sidokset. Kuva 16 esittää analyysin tulokset käyttäen täysin modifioitua fosforotioaatti 16-meeriä (SEQ ID NO:26) kuvatekstissä esiteyissä pitoisuuksissa, kun kohdesolulinja oli BV173. Tulokset ovat samanlaisia kuin ne, jotka nähdään oligonukleotidilla 6 (kuva 6), mutta tiedot osoittavat, että fosforotioaattioligonukleotidi ei ole yhtä tehokas kuin oligonukleotidi 6 inhiboimaan leukemiasolujen kasvua.

Kuva 17 esittää tulokset BV173 BRC/ABL-solulinjan käsittelystä 16-meeri fosfortioaattioligonukleotidillä (SEQ ID

NO:27), jossa on sekvenssi, joka on komplementaarinen B3A2 BCR/ABL fuusioliitoksen kanssa: B3A2:lla on kahden emäsparin sekvenssin epäsopivuus B2A2 BCR/ABL fuusioliitokseen. Tulokset osoittavat, että kaikissa pitoisuuksissa solut sietivät oligonukleotidiä.

Kuvat 18 ja 19 esittävät samanlaisten kokeiden tulokset tuloksiin, jotka on esitetty kuvissa 16 ja 17, vastaavasti. Näiden kokeiden tiedoissa solujakautumisen inhibition vapautuminen nähdään paljon alhaisemmissa pitoisuuksissa fosforotioaattioligonukleotidille kuin N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidille 6.

Tulokset osoittavat, että in vitro N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidit ovat tehokkaita antisense-yhdisteitä alhaisissa pitoisuuksissa. Lisäksi, N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidit ovat parempia antisense-aineita kuin fosforotioaattioligonukleotidit.

Esimerkki 6

Antisense-inhibitio c-myc:llä

N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidejä, jotka ovat komplementaarisia ihmisen c-myc mRNA:n kanssa, käytettiin myös inhiboimaan c-myc geeni-ilmentymistä ja N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidin tehokkuutta verrattiin fosforotioaattioligonukleotideihin. HL60-soluja inkuboitiin yhden seuraavan c-myc oligonukleotidin kanssa:

SEQ. ID NO. 28 TTTCATTGTT TTCCA (Antisense)

SEQ. ID NO. 29 T T T C T A T T G T T T C C A (Negatiivinen kontrolli; epäsopivuus)

SEQ. ID NO. 30 AACGTTGAGG GGCAT (Antisense; toinen eksoni)

SEQ. ID NO. 31 AACGAGTTGG GGCAT (Negatiinen kontrolli; epäsopivuus)

SEQ. ID NO. 32 UUUCAUUGUU UUCCA (Antisense; T:t korvattu U:lla)

Kaikki c-myc oligonukleotidien nukleotidin väliset sidokset olivat N3'→P5' fosforamidaattisidoksia ellei toisin mainita. Kun jokaista c-myc oligonukleotidin tyyppiä oli yksitellen inkuboitu mainituissa pitoisuuksissa 72 tunnin ajan viljelmässä HL-60 solujen kanssa, soluista analysoitiin joko jakautuminen alalla tunnetuilla mikroskopiatekniikoilla tai c-myc

ilmentyminen Western blot:lla, kuten on kuvattu julkaisussa Holt et al., Mol. and Gen. Bio. 8:963-973 (1988), jonka menetelmät sisällytetään viittauksella. Tulokset esitetään taulukossa 3.

Taulukko 3

c-myc ilmentymisen parantunut inhibitio HL60-soluissa käyttäen N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidejä verrattuna fosforotioaattioligonukleotideihin

SEQ. ID NO.	Kuvaus	Oligonukleotidi pit.	% "ei DNA:sta" Kontrolli (Western Blot densitometri)
	ei oligoa	0 μM	100 %
31	tioaatti negatiivinen kontrolli	10 μM	85 % kontrollista
30	tioaatti antisense	10 μM	35 % kontrollista
31	amidaatti negatiivinen kontrolli	1 μM	81 % kontrollista
30	amidaatti antisense	1 μM	38 % kontrollista
28	amidaatti antisense	1 μM	38 % kontrollista
32	amidaatti antisense korvaten T:t U:llä	1 μM	33 % kontrollista

N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidi SEQ ID NO 29 myös osoitti progressiivisesti enemmän H60-solujakautumisen inhibitiota pitoisuudessa 0,1 μM, 0,5 μM ja 1 μM (kun jakautumista mitattiin kussakin pitoisuudessa päivinä 0, 3 ja 6) kuin N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidi 31 (negatiivinen kontrolli; epäsopivuus) pitoisuudessa 0,1 μM, 0,5 μM ja 1 μM, joka osoitti jakautumistasot, jotka on verrattavissa ei

DNA:ta kontrolliin. Päivänä nolla kussakin viljelmässä oli noin 10 000 solua. Päivään kuusi mennessä molemmissa kontrolliviljelmissä oli noin 50 000 solua viljelmää kohti ja N3'→P5' fosforamidaatti 1 μM viljelmässä oli noin 25 000 solua viljelmää kohti.

Nämä tulokset osoittavat c-myc N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidien kykyä inhiboida solujakautumista annosja sekvenssiriippuvaisella tavalla ja N3'→P5' fosforamidaattioligonukleotidien suurempaa tehokkuutta verrattuna fosforotioaattioligonukleotideihin c-myc ilmentymisen inhiboinnissa. Nämä tiedot korreloivat Western Blot:lla esitetyn c-myc inhibition kanssa.

Vaikka keksintöä on kuvattu viittauksella spesifisiin menetelmiin ja toteutusmuotoihin, on ymmärrettävä, että erilaisia modifikaatioita ja muutoksia voidaan tehdä ilman, että erotaan keksinnöstä.

SEKVENSSILUETTELO

YLEISTIEDOT

HAKIJAT: Lynx Therapeutics, Inc.

KEKSINNÖN NIMI/SELITYS: Oligonukleotidi-N3' P5'-fosforiamidaatit: hybridisaatio ja nukleaasiresistenssiominaisuudet

SEKVENSSIEN LUKUMÄÄRÄ: 31

KIRJEENVAIHTO-OSOITE:
NIMI: Ruska & Co Oy
OSOITE: Runeberginkatu 5 00100 HELSINKI

KONEELLISESTI LUETTAVA MUOTO:
VÄLINETYYPPI: Levyke
TIETOKONE: IBM PC yhteensopiva
KÄYTTÖJÄRJESTELMÄ:PC-DOS/MS-DOS
SOVELLUSOHJELMA:PatentIn Release #1.0 versio #1.25

HAKEMUKSEN TIEDOT:
HAKEMUSNUMERO:
JÄTTÖPÄIVÄ:
LUOKITUS:

ASIAMIESTIEDOT:
NIMI: Ruska & Co Oy

YHTEYSTIEDOT:
PUHELIN: 694 9099
TELEFAX: 694 9865

SEKVENSSIN NO 1 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET
(A) PITUUS: 10 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) ANTI-SENSE: Ei

(vi) ALKUPERÄ:

(C) Erillinen isolaatti: DNA-oligonukleotidi 1, kuvio 2

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKV. NO 1:

TTTTTTTTTT 10

(2)SEKVENSSIN NO 2 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET

(A) PITUUS: 10 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) ANTI-SENSE: Ei

(vi) ALKUPERÄ:

(C) Erillinen isolaatti: DNA-oligonukleotidi 1, kuvio 2

(ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus

(B) ASEMA: 1..2

(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

(ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus

(B) ASEMA: 3..4

(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

(ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 5..6
(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

(ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 7..8
(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

(ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 9..10
(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKV. NO. 2:

TTTTTTTTTT 10

(2)SEKVENSSIN NO 3 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET

(A) PITUUS: 10 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) ANTI-SENSE: Ei

(vi) ALKUPERÄ:

(C) Erillinen isolaatti: DNA-oligonukleotidi 3, kuvio 2

(ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 1..11

(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden väliset sidokset ovat 'np' "

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKV. NO. 3:

TTTTTTTTTT T 11

(2)SEKVENSSIN NO 4 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET

(A) PITUUS: 11 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) ANTI-SENSE: Ei

(vi) ALKUPERÄ:

(C) Erillinen isolaatti: DNA-oligonukleotidi 4, kuvio 2

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKV. NO. 4

CTTCTTCCTT A 11

(2)SEKVENSSIN NO 5 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET

(A) PITUUS: 11 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: RNA

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) ANTI-SENSE: Ei

(vi) ALKUPERÄ:

(C) Erillinen isolaatti: RNA-oligonukleotidi 5, kuvio 2

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKV. NO. 5

CTTCTTCCTT A 11

(2)SEKVENSSIN NO 6 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET

(A) PITUUS: 11 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) ANTI-SENSE: Ei

(vi) ALKUPERÄ:

(C) Erillinen isolaatti: DNA-oligonukleotidi 6, kuvio 2

(ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 1..11
(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden väliset sidokset ovat 'np' "

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKV. NO. 6

CTTCTTCCTT A 11

(2)SEKVENSSIN NO 7 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET

(A) PITUUS: 24 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: molemmat
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) ANTI-SENSE: Ei

(vi) ALKUPERÄ:
(C) Erillinen isolaatti: DNA-oligonukleotidi 7, kuvio 5

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKV. NO. 7

TATATATATA TTTTTATATA TATA 24

(2)SEKVENSSIN NO 8 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET
(A) PITUUS: 20 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: molemmat
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) ANTI-SENSE: Ei

(vi) ALKUPERÄ:
(C) Erillinen isolaatti: DNA-oligonukleotidi 8, kuvio 5

ix) OMINAISUUS:
(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 1..2
(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

(ix) OMINAISUUS:
(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 3..4
(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

(ix) OMINAISUUS:
(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 5..6

(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

(ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 7..8
(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKV. NO. 8:

TATATATATT TTTATATATA

(2)SEKVENSSIN NO 9 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET

(A) PITUUS: 24 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: molemmat
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) ANTI-SENSE: Ei

(vi) ALKUPERÄ:

(C) Erillinen isolaatti: DNA-oligonukleotidi 9, kuvio 5

ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 1..2
(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

(ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 3..4
(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

(ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 5..6

(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

(ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 7..8
(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 9..10
(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

(ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 15..16
(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

(ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 17..18
(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

(ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 19..20
C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

(ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 21..22
(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

(ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 23..24
(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKV. NO. 9:

TATATATATA TTTTTATATA TATA 24

(2)SEKVENSSIN NO 10 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET

(A) PITUUS: 24 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: molemmat
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) ANTI-SENSE: Ei

(vi) ALKUPERÄ:

(C) Erillinen isolaatti: DNA-oligonukleotidi 10, kuvio 5

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKV. NO. 10:

TACGTACGTA TTTTTACGTA CGAT 24

(2)SEKVENSSIN NO 11 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET

(A) PITUUS: 24 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: molemmat
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) ANTI-SENSE: Ei

(vi) ALKUPERÄ:

(C) Erillinen isolaatti: DNA-oligonukleotidi 11, kuvio 5

ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 1..2

(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

(ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 3..4
(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

(ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 5..6
(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

(ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 7..8
(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 9..10
(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKV. NO. 11:

TACGTACGTA TTTTTACGTA CGTA 24

(2)SEKVENSSIN NO 12 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET

(A) PITUUS: 24 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: molemmat
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) ANTI-SENSE: Ei

(vi) ALKUPERÄ:

(C) Erillinen isolaatti: DNA-oligonukleotidi 12, kuvio 5

ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 1..2
(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

(ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 3..4
(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

(ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 5..6
(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

(ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 7..8
(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 9..10
(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 15..16
(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

(ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 17..18
(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

(ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus

(B) ASEMA: 19..20
(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

(ix) OMINAISUUS:
(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 21..22
(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

ix) OMINAISUUS:
(A) NIMI/SELITYS: muu ominaisuus
(B) ASEMA: 23..24
(C) LISÄTIEDOT: /huom.= "missä alayksiköiden välinen sidos on 'np' "

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKV. NO. 12:

TACGTACGTA TTTTTACGTA CGTA 24

(2)SEKVENSSIN NO 13 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET
(A) PITUUS: 24 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: molemmat
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) ANTI-SENSE: Ei

(vi) ALKUPERÄ:
(C) Erillinen isolaatti: DNA-kohde, koe 7, kuvio 2

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKV. NO. 13:

AAAAAAAAAA CCCCTTTTTT TTTT 24

(2)SEKVENSSIN NO 14 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET

(A) PITUUS: 13 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: molemmat
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) ANTI-SENSE: Ei

(vi) ALKUPERÄ:
(C) Erillinen isolaatti: DNA-kohde, koe 8, kuvio 2

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKV. NO. 14:

ATAAGGAAGA AGC 13

(2)SEKVENSSIN NO 15 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET
(A) PITUUS: 13 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: molemmat
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: RNA

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) ANTI-SENSE: Ei

(vi) ALKUPERÄ:
(C) Erillinen isolaatti: RNA-kohde, koe 9, kuvio 2

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKV. NO. 15:

AUAAGGAAGA AGC 13

(2)SEKVENSSIN NO 16 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET
(A) PITUUS: 13 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: molemmat
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: RNA

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) ANTI-SENSE: Ei

(vi) ALKUPERÄ:
(C) Erillinen isolaatti: RNA-kohde, koe 10, kuvio 2

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKV. NO. 16:

AUAAGGUAGA AGC 13

(2)SEKVENSSIN NO 17 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET
(A) PITUUS: 13 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: molemmat
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: RNA

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) ANTI-SENSE: Ei

(vi) ALKUPERÄ:
(C) Erillinen isolaatti: RNA-kohde, koe 11, kuvio 2

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKV. NO. 17:

AUAAGGAAGA AGC 13

(2)SEKVENSSIN NO 18 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET
(A) PITUUS: 13 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) JUOSTEISUUS: molemmat
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: RNA

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) ANTI-SENSE: Ei

(vi) ALKUPERÄ:
(C) Erillinen isolaatti: RNA-kohde, koe 12, kuvio 2

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKV. NO. 18:

AUAAGGUAGA AGC 13

(2)SEKVENSSIN NO 19 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET
(A) PITUUS: 13 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: molemmat
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) ANTI-SENSE: Ei

(vi) ALKUPERÄ:
(C) Erillinen isolaatti: DNA-kohde, koe 13, kuvio 2

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKV. NO. 19:

ATAAGGAAGA AGC 13

(2)SEKVENSSIN NO 20 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET
(A) PITUUS: 13 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: molemmat

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: RNA

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) ANTI-SENSE: Ei

(vi) ALKUPERÄ:

(C) Erillinen isolaatti: RNA-kohde, koe 14, kuvio 2

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKV. NO. 20:

AUAAGGAAGA AGC 13

(2)SEKVENSSIN NO 21 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET

(A) PITUUS: 13 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: molemmat
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: RNA

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) ANTI-SENSE: Ei

(vi) ALKUPERÄ:

(C) Erillinen isolaatti: RNA-kohde, koe 15, kuvio 2

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKV. NO. 21:

AUAAGGUAGA AGC 13

(2)SEKVENSSIN NO 22 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET

(A) PITUUS: 26 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: molemmat
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) ANTI-SENSE: Ei

(vi) ALKUPERÄ:

(C) Erillinen isolaatti: DNA-kohteen duplek-si, kuvio 8

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKV. NO. 22:

TTCCTTCTTT CTTTTGAAAG AAGGAA 26

(2)SEKVENSSIN NO 23 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET

(A) PITUUS: 244 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: molemmat
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: RNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(vi) ALKUPERÄ:

(C) Erillinen isolaatti: HIV-1 REV vaste-elementti

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKV. NO. 23:

CAGUGGGAAU AGGAGCUUUG UUCCUUGGGU UCUUGGGAGC AGCAGGAAGC ACUAUGGGCG 60

CAGCGUCAAU GACGCUGACG GUACAGGCCA GACAAUUAUU GUCUGGUAUA GUGCAGCAGC 120

AGAACAAUUU GCUGAGGGCU AUUGAGGCGC AACAGCAUCU GUUGCAACUC ACAGUCUGGG 180

GCAUCAAGCA GCUCCAGGCA AGAAUCCUGG CUGUGGAAAG AUACCUAAAG GAUCAACAGC 240

UCCU 244

(2)SEKVENSSIN NO 24 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET
(A) PITUUS: 69 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: molemmat
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: RNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(vi) ALKUPERÄ:
(C) Erillinen isolaatti: hiv-1 rev vaste-elementin runkosilmukka

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKV. NO. 24:

AGCACUAUGG GCGCAGCGUC AAUGACGCUG ACGGUACAGG CCAGACAAUU AUUGUCUGGU 60

AUAGUGCAG 69

(2)SEKVENSSIN NO 25 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET
(A) PITUUS: 58 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: molemmat
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: RNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) ANTI-SENSE: Ei

(vi) ALKUPERÄ:
(C) Erillinen isolaatti: HIV-1 vaste-elementin runkosilmukka II

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKV. NO. 25:

GGUCUCUCUG GUUAGACCAG AUCUGAGCCU GGGAGCUCUC UGGCUAACUA GAGAACCC 58

(2)SEKVENSSIN NO 26 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET

(A) PITUUS: 16 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) ANTI-SENSE: Ei

(vi) ALKUPERÄ:

(C) Erillinen isolaatti: 16-meeri, fosforitioaattialayksiköiden väliset sidokset

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKV. NO. 26:

AAGGGCTTCT TCCTTA 16

(2)SEKVENSSIN NO 27 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET

(A) PITUUS: 16 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) ANTI-SENSE: Ei

(vi) ALKUPERÄ:

(C) Erillinen isolaatti: 16-meeri, fosforitioaattialayksiköiden väliset sidokset

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKV. NO. 27:

GAGTTCAAAA GCCCTT 16

(2)SEKVENSSIN NO 28 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET

(A) PITUUS: 15 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: molemmat
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA

xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKV. NO. 28:

TTTCATTGTT TTCCA 15

(2)SEKVENSSIN NO 29 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET
(A) PITUUS: 15 emästä
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA

xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKV. NO. 29:

TTTCTATTGT TTCCA 15

(2)SEKVENSSIN NO 30 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET
(A) PITUUS: 15 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA

xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKV. NO. 30:

AACGTTGAGG GGCAT 15

(2)SEKVENSSIN NO 31 TIEDOT:

(i)SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET
(A) PITUUS: 15 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

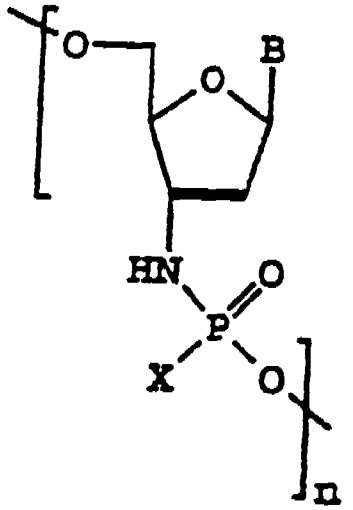
(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA

xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKV. NO. 31:

AACGAGTTGG GGCAT

Patenttivaatimukset

1. Oligodeoksiribonukleotidi, joka käsittää oligodeoksiribonukleotidin, jossa viereiset nukleosidialayksiköt on yhdistetty alayksiköiden välisillä sidoksilla, ja jolla on kaava:



jossa X on $-O^-$, -OR tai -R, ja R valitaan ryhmästä, joka koostuu alkyylistä, alkenyylistä, aryylistä ja aralkyylistä, jossa yksikään R ei sisällä pidempää hiiliketjua kuin 10 hiiltä, mainitut alayksiköiden väliset sidokset on siroteltu oligonukleotidiin, jonka pituus on ainakin 6 - 100 emästä, n on 4 - 100 ja B on emäs.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen oligodeoksiribonukleotidi, jossa mainitulla oligodeoksiribonukleotidillä on ainakin 3 viereistä alayksikköä yhdistetty N3'→P5' fosforamidaattisidoksilla.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen oligodeoksiribonukleotidi, jossa mainitulla oligodeoksiribonukleotidillä on OH-ryhmät 5'- ja 3'-päässä ja mainitut viereiset sidokset alkavat 3'-pään nukleosidialayksiköstä.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen oligodeoksiribonukleotidi, jossa kaikki alayksiköiden välisistä sidoksista on N3'→P5' fosforamidaattisidoksia.

5. Patenttivaatimuksen 2 mukainen oligodeoksiribonukleotidi,

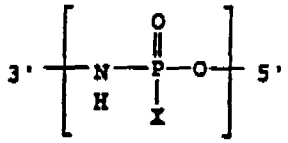
jossa ainakin 50 % alayksiköiden välisistä sidoksista on N3'→P5' fosforamidaattisidoksia.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen oligodeoksiribonukleotidi, jossa toinen sidos valitaan ryhmästä, joka koostuu fosfodiesteristä, fosfotriesteristä, metyylifosfonaatista, fosforamidaatista P3'→N5' ja fosforotioaatista.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen oligodeoksiribonukleotidi, jossa mainittu toinen sidos on fosfodiesterisidos.

8. Menetelmä kaksisäikeisen nukleiinihappomolekyylin muodostamiseksi, joka menetelmä käsittää vaiheet, joissa:

muodostetaan oligodeoksiribonukleotidi, jossa viereiset nukleosidialayksiköt on yhdistetty alayksiköiden välisillä sidoksilla, joissa ainakin 3 viereistä alayksikköä yhdistetään N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välisillä sidoksilla, tai enemmän kuin kolme alayksiköiden välisten sidosten kokonaismäärästä on N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välisiä sidoksia, seuraavasti:



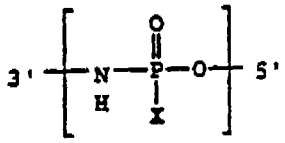
jossa X on $-O^-$, -OR tai -R, ja R valitaan ryhmästä, joka koostuu alkyylistä, alkenyylistä, aryylistä ja aralkyylistä, mainitulla oligodeoksiribonukleotidillä on nukleosidialayksiköiden sekvenssi, joka on tehokas muodostamaan dupleksi kohteena olevan nukleiinihappomolekyylin kanssa,

ja saatetaan mainittu oligodeoksiribonukleotidi kosketuksiin kohteena olevan nukleiinihappomolekyylin kanssa olosuhteissa, jolloin sallitaan dupleksin muodostuminen mainitun oligodeoksiribonukleotidin ja mainitun kohteena olevan nukleiinihappomolekyylin välille.

9. Menetelmä proteiinin vuorovaikutuksen estämiseksi polynukleotidin kanssa, joka menetelmä käsittää vaiheet, joissa:

muodostetaan oligodeoksiribonukleotidi, jossa viereiset

nukleosidialayksiköt on yhdistetty alayksiköiden välisillä sidoksilla, joissa ainakin 2 viereistä alayksikköä yhdistetään N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välisillä, tai enemmän kuin 3 alayksiköiden välisten sidosten kokonaismäärästä on N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välisiä sidoksia, seuraavasti:

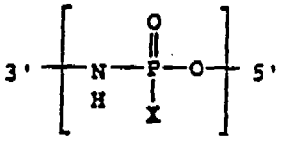


jossa X on $-O^-$, -OR tai -R, ja R valitaan ryhmästä, joka koostuu alkyylistä, alkenyylistä, aryylistä ja aralkyylistä, mainitulla oligodeoksiribonukleotidillä on nukleosidialayksiköiden sekvenssi, joka on tehokas muodostamaan kompleksi mainitun polynukleotidin kanssa,

ja saatetaan mainittu oligodeoksiribonukleotidi kosketuksiin mainitun polynukleotidin kanssa olosuhteissa, jolloin sallitaan kompleksin muodostuminen mainitun oligodeoksiribonukleotidin ja mainitun polynukleotidin välille.

10. Menetelmä tripleksimolekyylin muodostamiseksi, joka menetelmä käsittää vaiheet, joissa:

muodostetaan oligodeoksiribonukleotidi, jossa viereiset nukleosidialayksiköt on yhdistetty alayksiköiden välisillä sidoksilla, joissa ainakin 2 viereistä alayksikköä yhdistetään N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välisillä, tai enemmän kuin 3 alayksiköiden välisten sidosten kokonaismäärästä on N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välisiä sidoksia, seuraavasti:



jossa X on $-O^-$, -OR tai -R, ja R valitaan ryhmästä, joka koostuu alkyylistä, alkenyylistä, aryylistä ja aralkyylistä, mainitulla oligodeoksiribonukleotidillä on nukleosidialayksiköiden sekvenssi, joka on tehokas muodostamaan kolmisäikeinen kierrerakenne kohteena olevan kaksisäikeisen DNA:n kanssa,

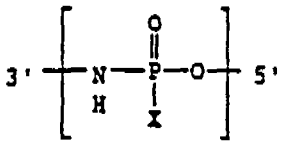
ja saatetaan mainittu oligodeoksiribonukleotidi kosketuksiin mainitun kaksisäikeisen DNA:n kanssa olosuhteissa, jotka ovat tehokkaita sallimaan tripleksin muodostumisen oligodeoksiribonukleotidin ja kohteena olevan kaksisäikeisen DNA:n välille.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, jossa 50 % tai enemmän alayksiköiden välisistä sidoksista on N3'→P5' fosforamidaattisidoksia.

12. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, jossa jäljelle jääneet alayksiköiden väliset sidokset valitaan ryhmästä, joka koostuu fosfodiesteristä, fosfotriesteristä, metyylifosfonaatista, fosforamidaatista P3'→N5' ja fosforotioaatista.

13. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, jossa kaikki alayksiköiden välisistä sidoksista on N3'→P5' fosforamidaattisidoksia.

14. Tripleksimolekyyli, jossa on kolme nukleiinihapposäiettä ja joka käsittää kaksisäikeisen DNA-molekyylin, jossa on kaksi komplementaarista säiettä ja sitoutuneena mainittuun dupleksiin kolmannen säikeen oligodeoksiribonukleotidin, jossa viereiset nukleosidialayksiköt on yhdistetty alayksiköiden välisillä sidoksilla, joissa ainakin kaksi viereistä alayksikköä yhdistetään N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välisillä, tai enemmän kuin kolme alayksiköiden välisten sidosten kokonaismäärästä on N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välisiä sidoksia seuraavasti:



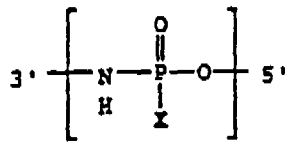
jossa X on $-O^-$, -OR tai -R, ja R valitaan ryhmästä, joka koostuu alkyylistä, alkenyylistä, aryylistä ja aralkyylistä.

15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen tripleksimolekyyli, jossa 50 % tai enemmän kolmannen säikeen alayksiköiden välisistä sidoksista on N3'→P5' fosforamidaattisidoksia.

16. Patenttivaatimuksen 14 mukainen tripleksimolekyyli, jossa kaikki kolmannen säikeen alayksiköiden väliset sidokset ovat N3'→P5' fosforamidaattisidoksia.

17. Menetelmä oligodeoksiribonukleotidin resistenssin lisäämiseksi nukleaasidigestoinnille, joka menetelmä käsittää vaiheet, joissa:

muodostetaan oligodeoksiribonukleotidi, jossa viereiset nukleosidialayksiköt yhdistetään alayksiköiden välisillä sidoksilla, joissa ainakin 3 viereistä alayksikköä yhdistetään N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välisillä, tai enemmän kuin 3 alayksiköiden välisten sidosten kokonaismäärästä on N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välisiä sidoksia, seuraavasti:



jossa X on $-O^-$, -OR tai -R, ja R valitaan ryhmästä, joka koostuu alkyylistä, alkenyylistä, aryylistä ja aralkyylistä, ja

altistetaan mainittu oligodeoksiribonukleotidi nukleaasille, jossa mainittu oligodeoksiribonukleotidi on resistentimpi nukleaasidigestoinnille kuin vastaava oligodeoksiribonukleotidi, jossa on vain fosfodiesterialayksiköiden välisiä sidoksia.

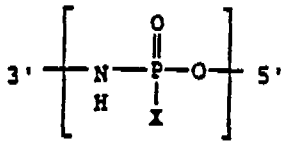
18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen menetelmä, jossa 50 % tai enemmän oligodeoksiribonukleotidin alayksiköiden välisistä sidoksista on N3'→P5' fosforamidaattisidoksia.

19. Patenttivaatimuksen 17 mukainen menetelmä, jossa kaikki oligodeoksiribonukleotidin alayksiköiden väliset sidokset

ovat N3'→P5' fosforamidaattisidoksia.

20. Kokoonpano kohteena olevan nukleiinihapon eristämiseksi näytteestä, joka kokoonpano käsittää:

(i) oligodeoksiribonukleotidin, jossa viereiset nukleosidialayksiköt on yhdistetty alayksiköiden välisillä sidoksilla, joissa ainakin 2 viereistä alayksikköä yhdistetään N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välisillä sidoksilla, tai enemmän kuin 3 alayksiköiden välisten sidosten kokonaismäärästä on N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välisiä sidoksia, seuraavasti:



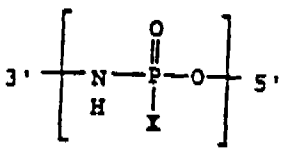
jossa X on $-O^-$, -OR tai -R, ja R valitaan ryhmästä, joka koostuu alkyylistä, alkenyylistä, aryylistä ja aralkyylistä,

(ii) mainittu oligodeoksiribonukleotidi on tehokas hybridisoitumaan mainittuun kohteena olevaan nukleiinihapposekvenssiin, ja

(iii) mainittu oligodeoksiribonukleotidi liitetään kantajaaineeseen.

21. Menetelmä nukleiinihapon, jossa on kohdesekvenssi näytteessä, havaitsemiseksi, joka menetelmä käsittää vaiheet, joissa:

muodostetaan oligodeoksiribonukleotidi, jossa viereiset nukleosidialayksiköt on yhdistetty alayksiköiden välisillä sidoksilla, joissa ainakin 3 viereistä alayksikköä yhdistetään N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välisillä sidoksilla, tai enemmän kuin 3 alayksiköiden välisten sidosten kokonaismäärästä on N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välisiä sidoksia, seuraavasti:



jossa X on $-O^-$, -OR tai -R, ja R valitaan ryhmästä, joka koostuu alkyylistä, alkenyylistä, aryylistä ja aralkyylistä, ja mainittu oligodeoksiribonukleotidi on tehokas muodostamaan hybridisaatiokompleksi mainitun kohdesekvenssin kanssa,

saatetaan mainittu oligodeoksiribonukleotidi kosketuksiin mainitun näytteen kanssa olosuhteissa, jotka ovat tehokkaita sallimaan hybridisaatiokompleksin muodostumisen oligodeoksiribonukleotidin ja kohdesekvenssin välille, ja

havaitaan hybridisaatiokompleksin läsnäolo.

22. Patenttivaatimuksen 21 mukainen menetelmä, jossa mainitussa oligodeoksiribonukleotidissa on reportteriryhmä ja mainittu havaitseminen käsittää mainitun reportteriryhmän havaitsemisen.

23. Patenttivaatimuksen 22 mukainen menetelmä, jossa mainittu reportteriryhmä valitaan ryhmästä, joka koostuu radioaktiivisista leimoista, biotiinileimoista ja fluoresoivista leimoista.

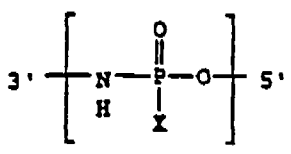
24. Patenttivaatimuksen 21 mukainen menetelmä, jossa mainittu kosketuksiin saattaminen suoritetaan solunsisäisesti.

25. Patenttivaatimuksen 21 mukainen menetelmä, jossa mainittu nukleiinihappo on yksisäikeinen.

26. Menetelmä kaksisäikeisen DNA:n havaitsemiseksi, jossa on kohdesekvenssi näytteessä, joka menetelmä käsittää vaiheet, joissa:

muodostetaan oligodeoksiribonukleotidi, jossa on viereisiä nukleosidialayksiköitä ja alayksiköiden välisiä sidoksia, joissa

(i) ainakin 3 viereistä alayksikköä yhdistetään N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välisillä, tai enemmän kuin 3 alayksiköiden välisten sidosten kokonaismäärästä on N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välisiä sidoksia, seuraavasti:



jossa X on $-O^-$, -OR tai -R, ja R valitaan ryhmästä, joka

koostuu alkyylistä, alkenyylistä, aryylistä ja aralkyylistä, ja mainittu oligodeoksiribonukleotidi on tehokas muodostamaan hybridisaatiokompleksi mainitun kohdesekvenssin kanssa,

saatetaan mainittu oligodeoksiribonukleotidi kosketuksiin mainitun näytteen kanssa olosuhteissa, jotka ovat tehokkaita sallimaan hybridisaatiokompleksin muodostumisen oligodeoksiribonukleotidin ja kohdesekvenssin välille, ja

havaitaan hybridisaatiokompleksin läsnäolo.

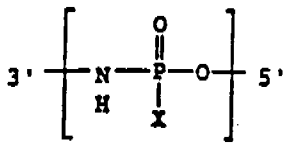
27. Patenttivaatimuksen 26 mukainen menetelmä, jossa mainittu altistus suoritetaan solunsisäisesti.

28. Patenttivaatimuksen 17 mukainen menetelmä, jossa maini tussa oligodeoksiribonukleotidissa on reportteriryhmä ja mainittu havaitseminen käsittää mainitun reportteriryhmän havaitsemisen.

29. Patenttivaatimuksen 17 mukainen menetelmä, jossa mainittu hybridisaatiokompleksi identifioidaan geelivyösiirtymällä.

30. Patenttivaatimuksen 17 mukainen menetelmä, jossa mainittu kosketuksiin saattaminen suoritetaan solunsisäisesti.

31. Dupleksioligodeoksiribonukleotidi, jossa on kaksi komp lementaarista säiettä, ja (ii) ainakin yhdessä säikeessä on viereiset nukleosidialayksiköt yhdistetty alayksiköiden välisillä sidoksilla, joissa ainakin 2 viereistä alayksiköä yhdistetään N3′→P5′ fosforamidaattialayksiköiden välisillä sidoksilla, tai enemmän kuin 3 alayksiköiden välisten sidos ten kokonaismäärästä on N3′→P5′ fosforamidaattialayksiköiden välisiä sidoksia, seuraavasti:



jossa X on $-O^-$, -OR tai -R, ja R valitaan ryhmästä, joka koostuu alkyylistä, alkenyylistä, aryylistä ja aralkyylistä.

32. Patenttivaatimuksen 31 mukainen dupleksioligodeoksiri-

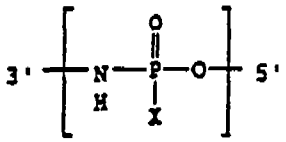
bonukleotidi, jossa 50 % tai enemmän ainakin yhden säikeen alayksiköiden välisistä sidoksista on N3'→P5' fosforamidaat tisidoksia.

33. Patenttivaatimuksen 31 mukainen dupleksioligodeoksiribonukleotidi, jossa kaikki ainakin yhden säikeen alayksiköiden väliset sidokset ovat N3'→P5' fosforamidaattisidoksia.

34. Patenttivaatimuksen 31 mukainen dupleksioligodeoksiribonukleotidi, jossa mainitut komplementaariset säikeet yhdistetään taipuvalla sarana-alueella.

35. Patenttivaatimuksen 34 mukainen dupleksioligodeoksiribonukleotidi, jossa kullakin komplementaarisella säikeellä on 5'- ja 3'-päät, ja mainittu taipuva sarana-alue yhdistää komplementaariset säikeen päät yhdessä valituista orientaatioista, joka valitaan ryhmästä, joka koostuu seuraavista 5' - 3', 3' - 5', 3' - 3' ja 5' - 5'.

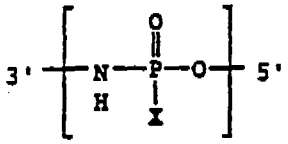
36. Farmaseuttinen koostumus, joka käsittää oligodeoksiribonukleotidin, jossa viereiset nukleosidialayksiköt on yhdistetty alayksiköiden välisillä sidoksilla, joissa (i) ainakin 2 viereistä alayksikköä yhdistetään N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välisillä sidoksilla, tai enemmän kuin 3 alayksiköiden välisten sidosten kokonaismäärästä on N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välisiä sidoksia, seuraavasti:



jossa X on $-O^-$, -OR tai -R, ja R valitaan ryhmästä, joka koostuu alkyylistä, alkenyylistä, aryylistä ja aralkyylistä, ja (ii) mainitulla oligodeoksiribonukleotidillä on nukleosidialayksikköjen sekvenssi, joka on tehokas muodostamaan tripleksi kohteena olevan kaksisäikeisen DNA:n kanssa, ja farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan.

37. Farmaseuttisia koostumuksia, jotka käsittävät oligo-

deoksiribonukleotidin, jossa viereiset nukleosidialayksiköt on yhdistetty alayksiköiden välisillä sidoksilla, joissa mainittu oligodeoksiribonukleotidi pystyy muodostamaan dupleksin RNA:n kanssa ja joissa ainakin 2 viereistä alayksikköä yhdistetään N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välisillä sidoksilla, tai enemmän kuin 3 alayksiköiden välisten sidosten kokonaismäärästä on N3'→P5' fosforamidaattialayksiköiden välisiä sidoksia, seuraavasti:



jossa X on $-O^-$, -OR tai -R, ja R valitaan ryhmästä, joka koostuu alkyylistä, alkenyylistä, aryylistä ja aralkyylistä, ja mainitulla oligodeoksiribonukleotidillä on nukleosidialayksikköjen sekvenssi, joka on tehokas muodostamaan dupleksirakenne RNA-kohteen kanssa, ja

farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan.

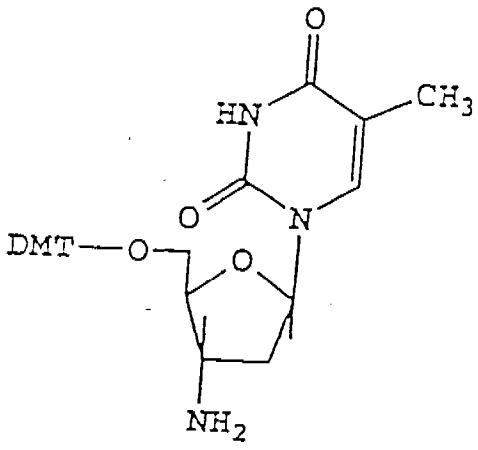


Fig. 1A

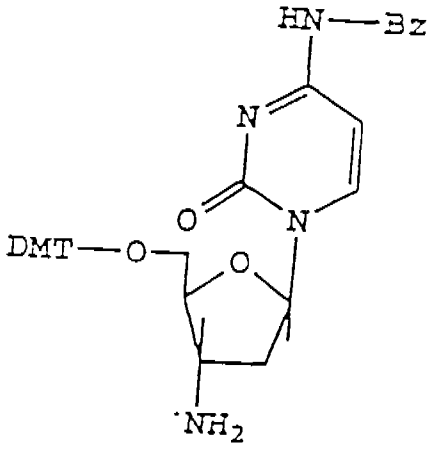


Fig. 1B

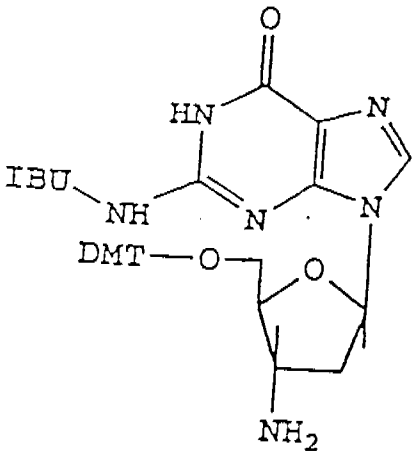


Fig. 1C

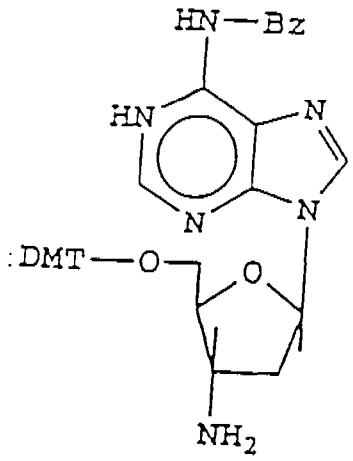


Fig. 1D

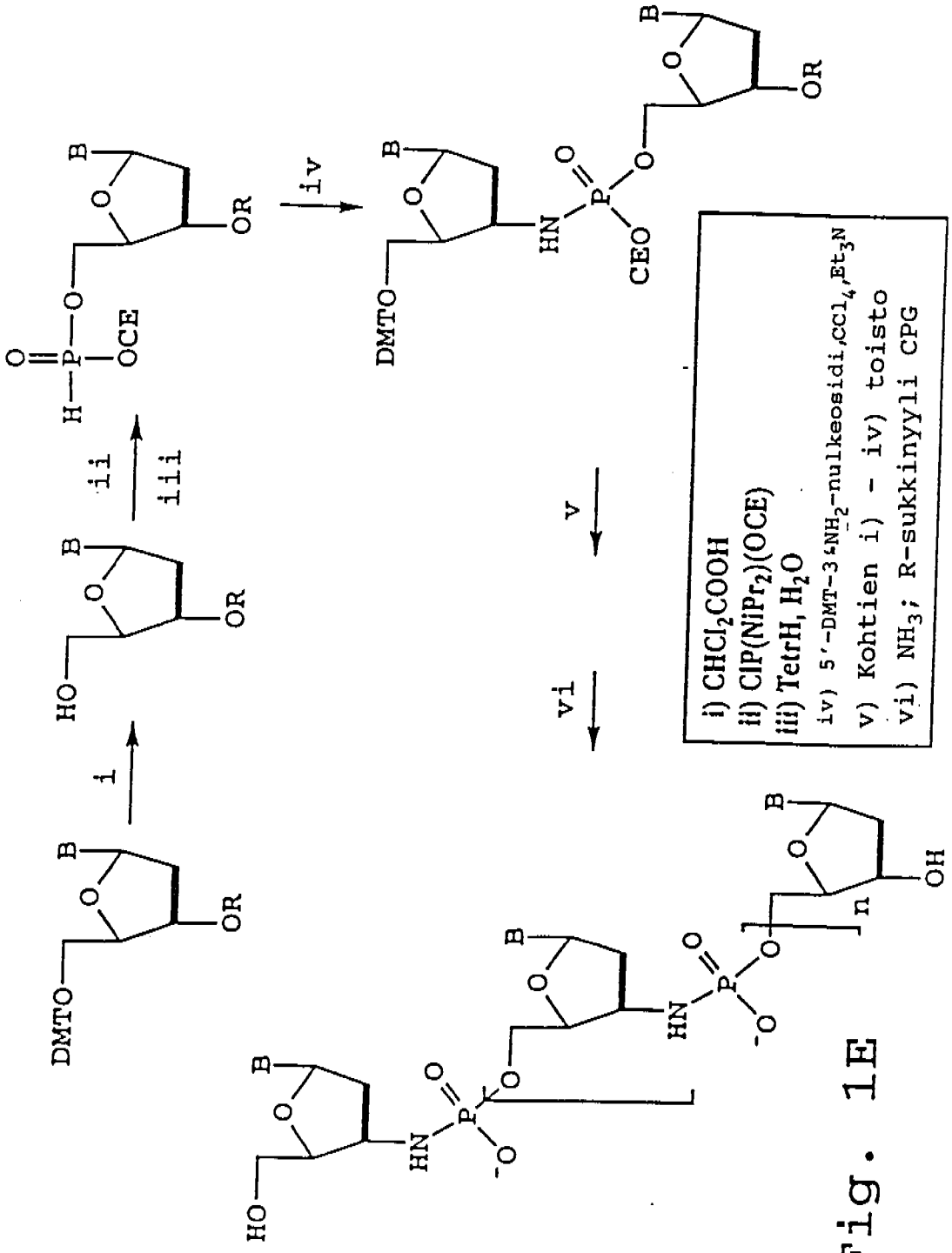

i) $CHCl_2COOH$
ii) $ClP(NiPr_2)(OCE)$
iii) TetrH, H_2O
iv) 5'-DMT-3'NH_2-nulkeosidi,CCl_4,Et_3N
v) Kohtien i) - iv) toisto
vi) NH_3; R-sukkinyyli CPG

Fig. 1E

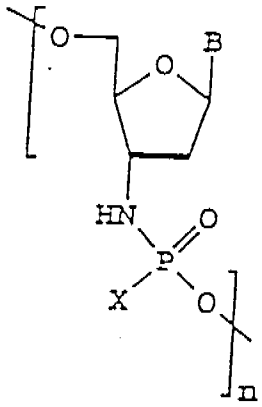


Fig. 2A

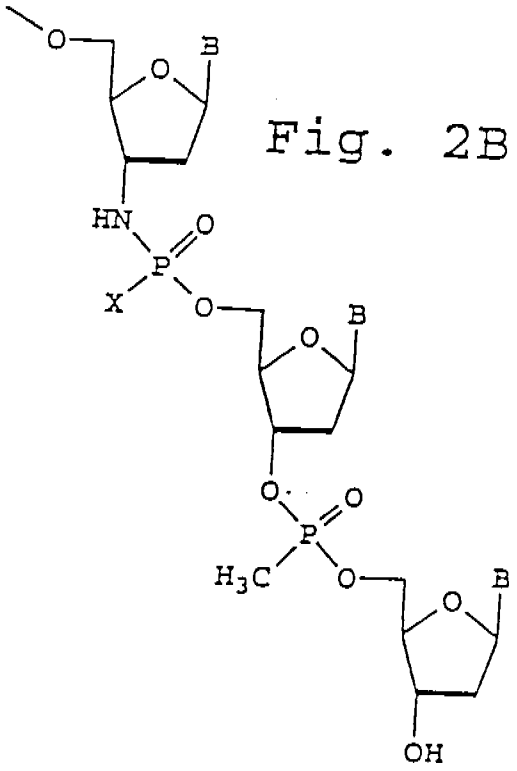


Fig. 2B

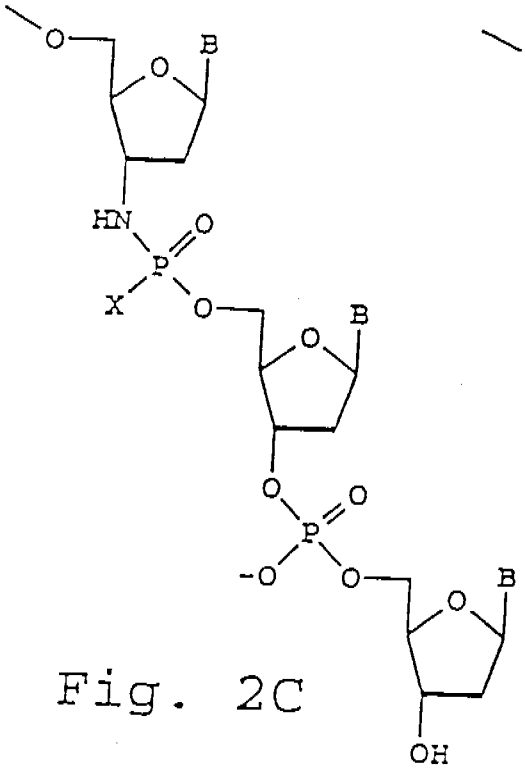


Fig. 2C

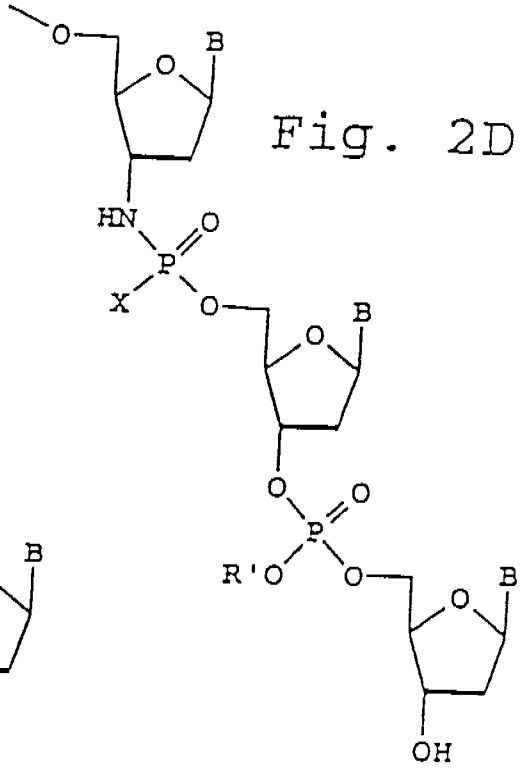


Fig. 2D

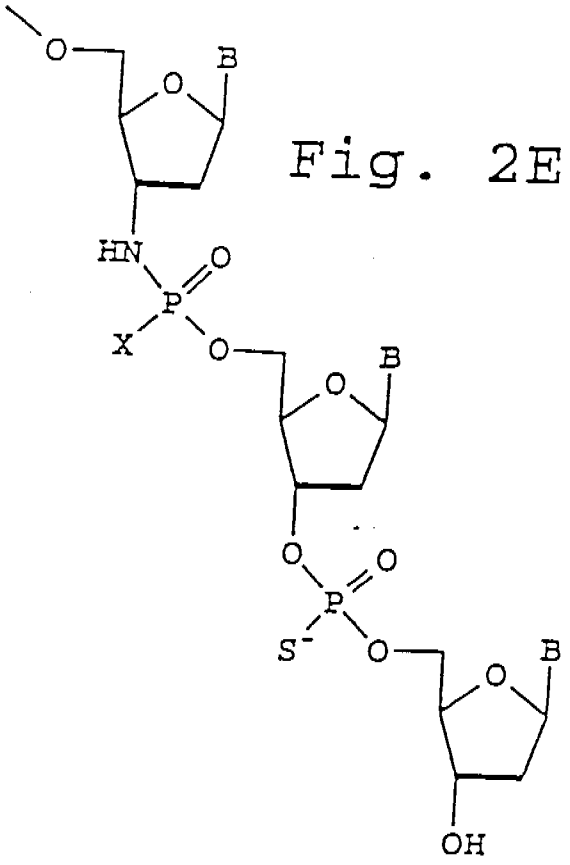


Fig. 2E

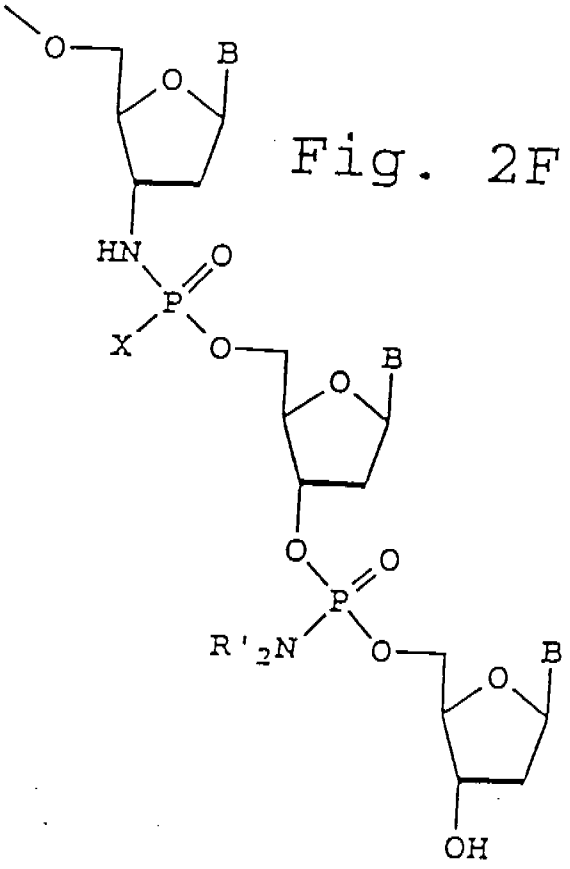


Fig. 2F

Koe	Oligonukleotidi		Kohde	T_m(°C)^
	Sekvenssit	nro		
1	TTTTTTTTTT; 1	1	poly dA	29.7
2	sama kuin koe 1	1	poly A	27.0
3	TnpTTnpTTnpTTnpTTnpT; 2	2	poly dA	25.8
4	sama kuin koe 3	2	poly A	33.7
5	TnpTnpTnpTnpTnpTnpTnpTnpTnpTnpT; 3	3	poly dA	36.0
6	sama kuin koe 5	3	poly A	51.5
7	sama kuin koe 5	3	5'dAAAAAAAAAA C_4 5'TTTTTTTTTT	32.0; 47.2[ii]
8	d CTTCTTCCTTA; 4	4	dATAAGGAAGAAGC	37.5
9	sama kuin koe 8	4	rAUAAGGAAGAAGC	49.5
10	sama kuin koe 8	4	rAUAAGGUAGAAGC[c]	35.1
11	rCTTCTTCCTTA; 5	5	rAUAAGGAAGAAGC	54.4
12	sama kuin koe 11	5	rAUAAGGUAGAAGC	42.0
13	dCnpTnpTnpCnpTnpTnpCnpCnpTnpTnpA; 6	6	dATAAGGAAGAAGC	49.2
14	sama kuin koe 13	6	rAUAAGGAAGAAGC	72.4
15	sama kuin koe 13	6	rAUAAGGUAGAAGC	60.2
16	sama kuin koe 13	6	5'dTTCCTTCTTTC T_4 3'AAGGAAGAAAG	57.0; 62.0[ii]

Fig. 3

Fig. 4A

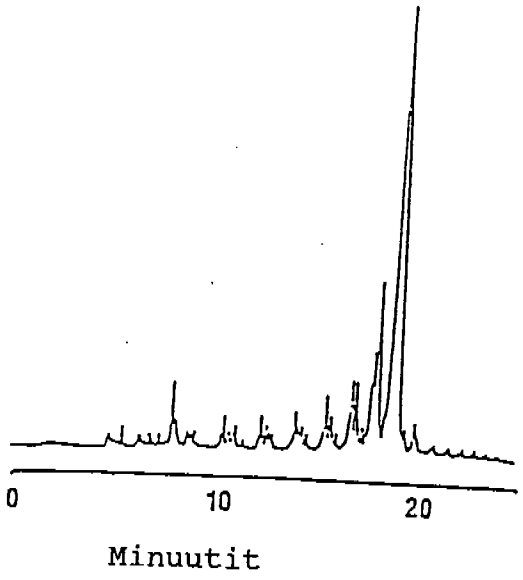


Fig. 4B

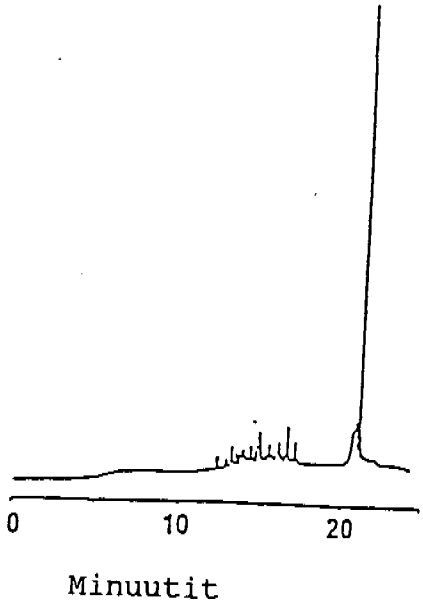
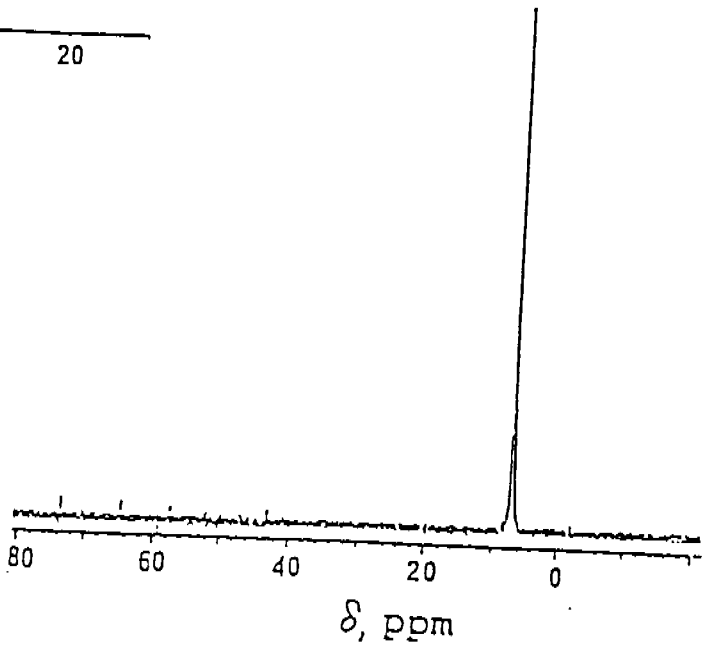


Fig. 4C



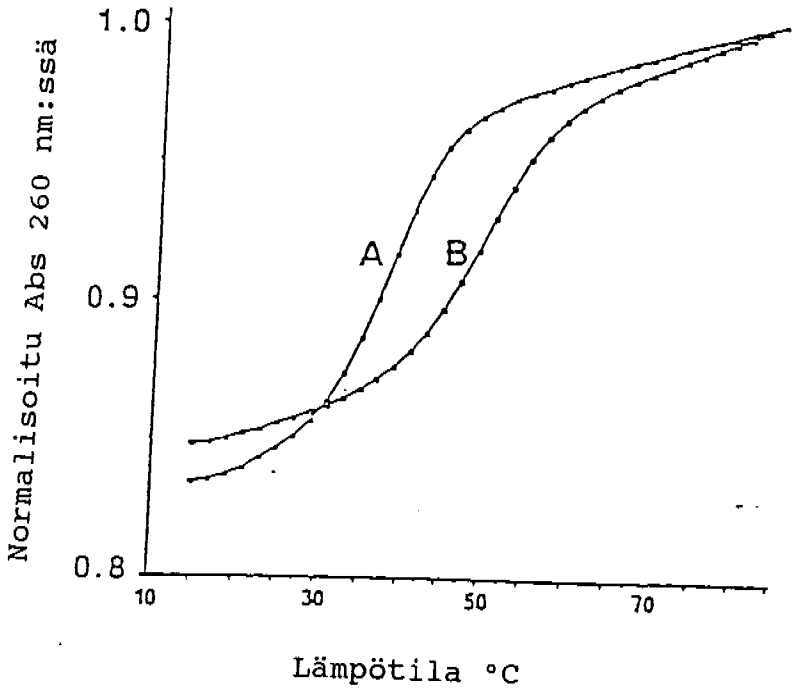

1.0
0.9
0.8
Normalisoitu Abs 260 nm:ssä
A
B
10
30
50
70
Lämpötila °C

Fig. 5A

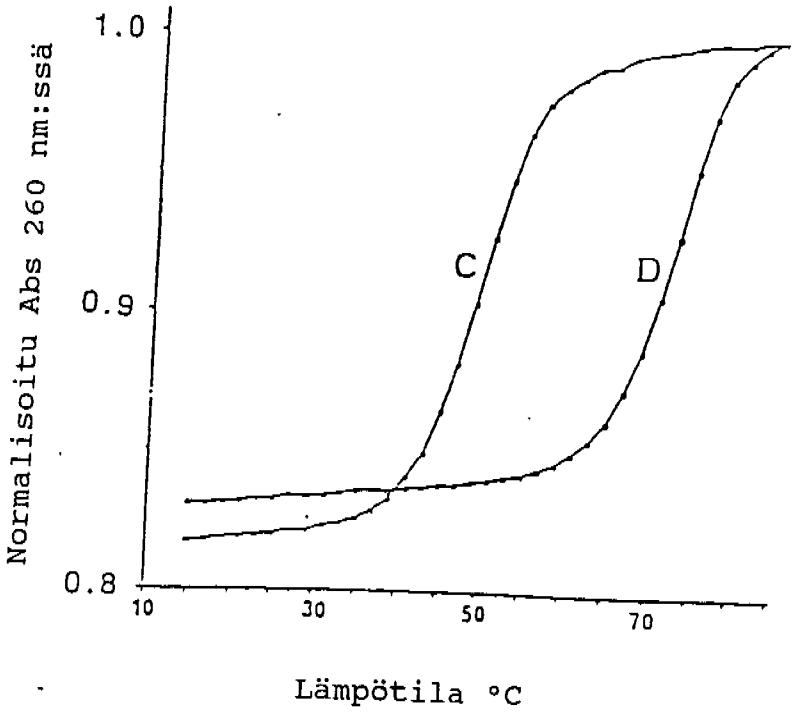

1.0
0.9
0.8
Normalisoitu Abs 260 nm:ssä
C
D
10
30
50
70
Lämpötila °C

Fig. 5B

Koe	Oligonukleotidi		Tm
1	TATATATATA T4; ATATATATAT	7	37.0
2	TnpATnpATnpATnpA T4; A TA TA TA T	8	42.0
3	TnpATnpATnpATnpATnpA T4; ApnTApnTApnTApnTApnT	9	61.5
4	TACGTACGTA T4; ATGCATGCAT	10	59.5
5	TnpACnpGTnpACnpGTnpA T4; A T G CA TG CA T	11	62.2
6	TnpACnpGTnpACnpGTnpA T4; ApnTGpnCApnTGpnCApnT	12	67.0

Fig. 6

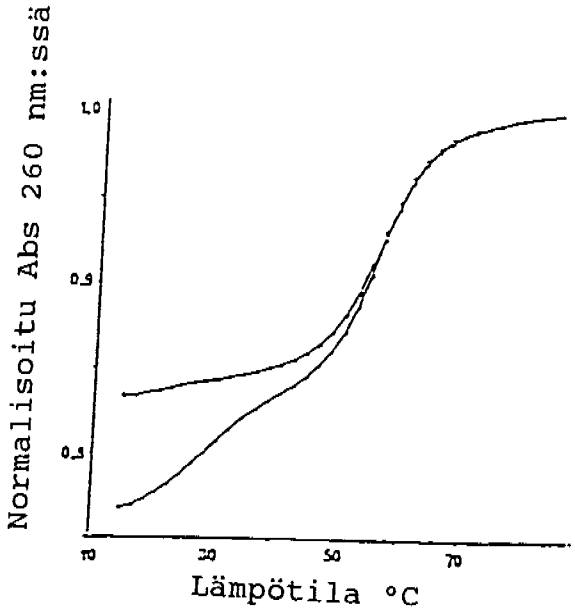


Fig. 7A

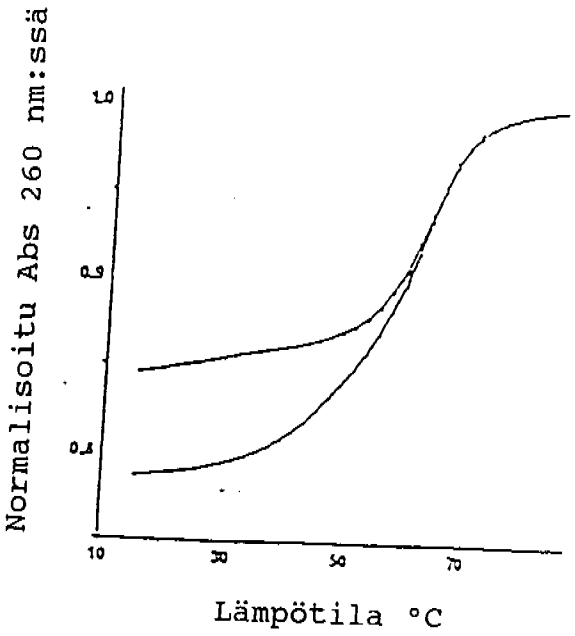


Fig. 7C

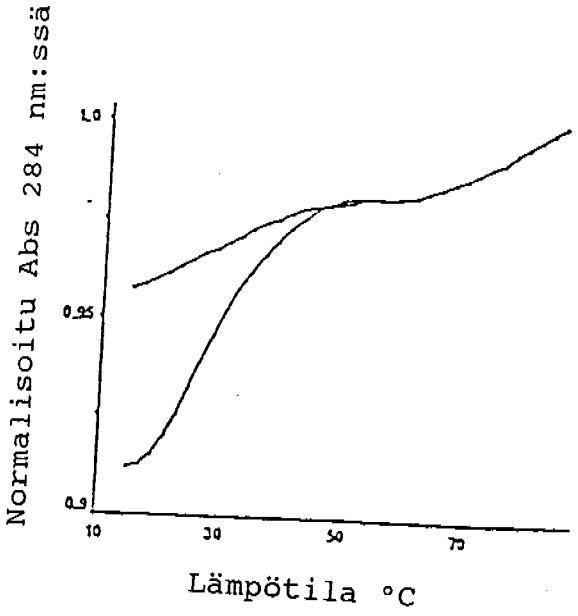


Fig. 7B

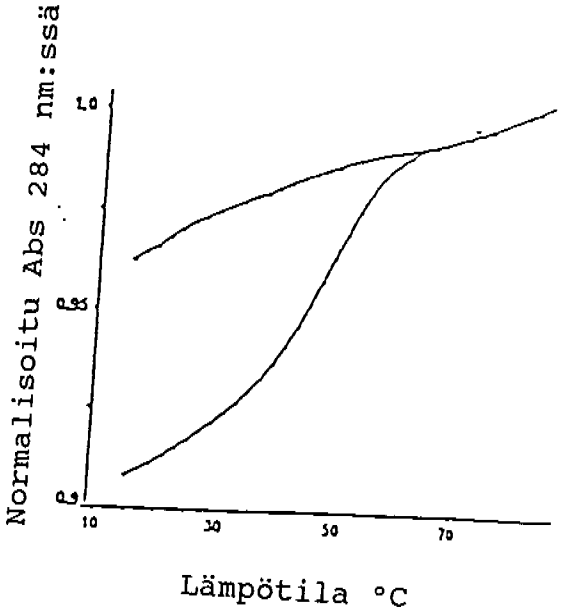


Fig. 7D

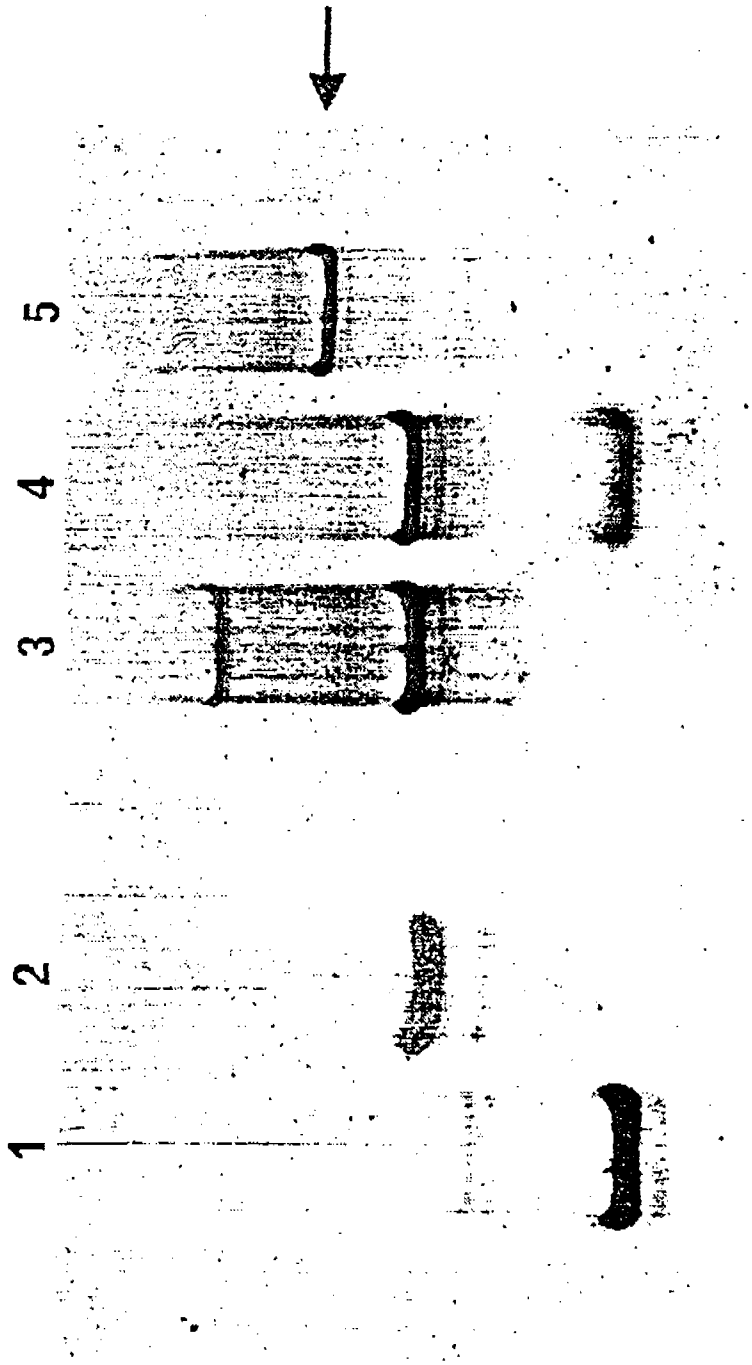


FIG. 8

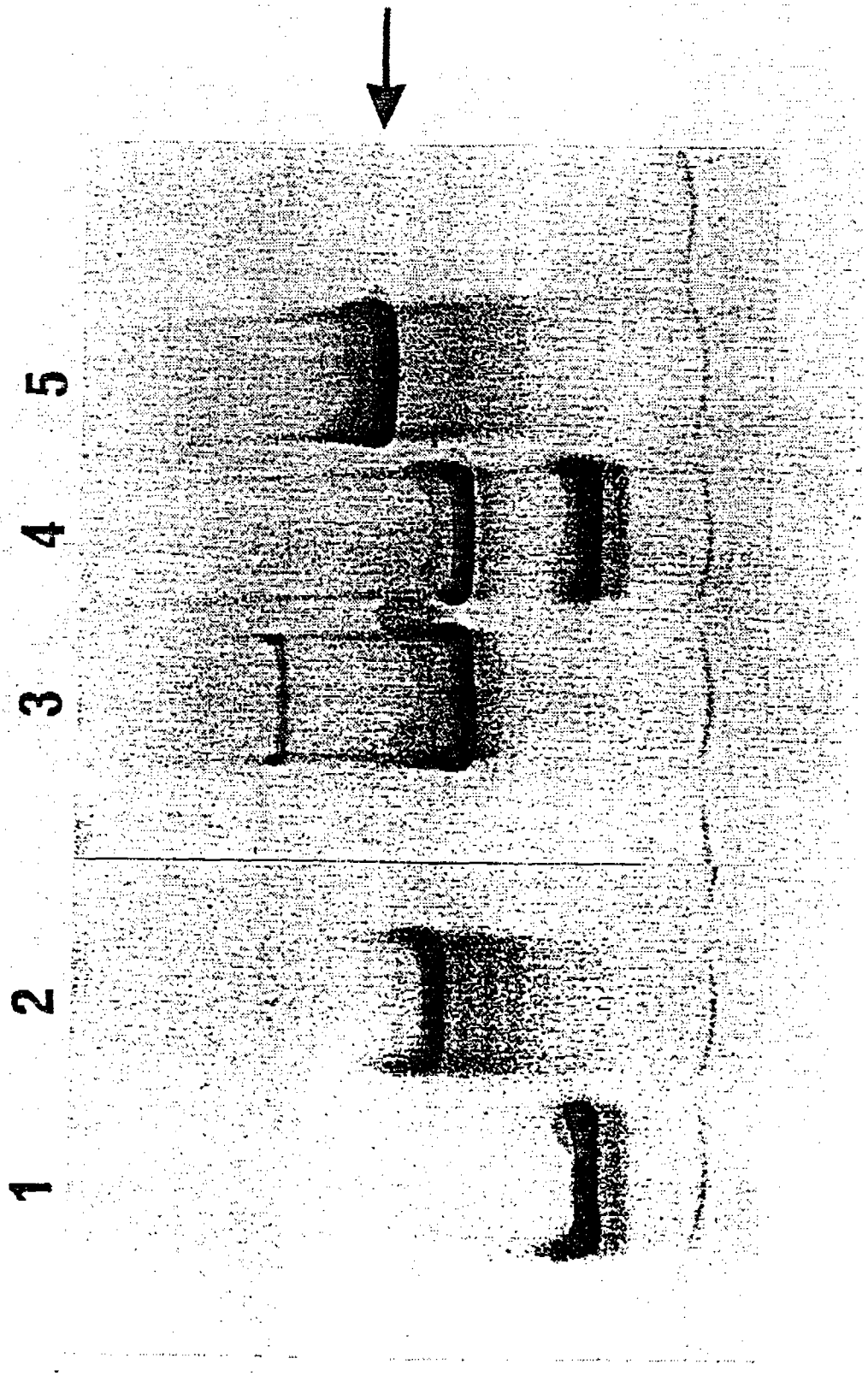


FIG. 9

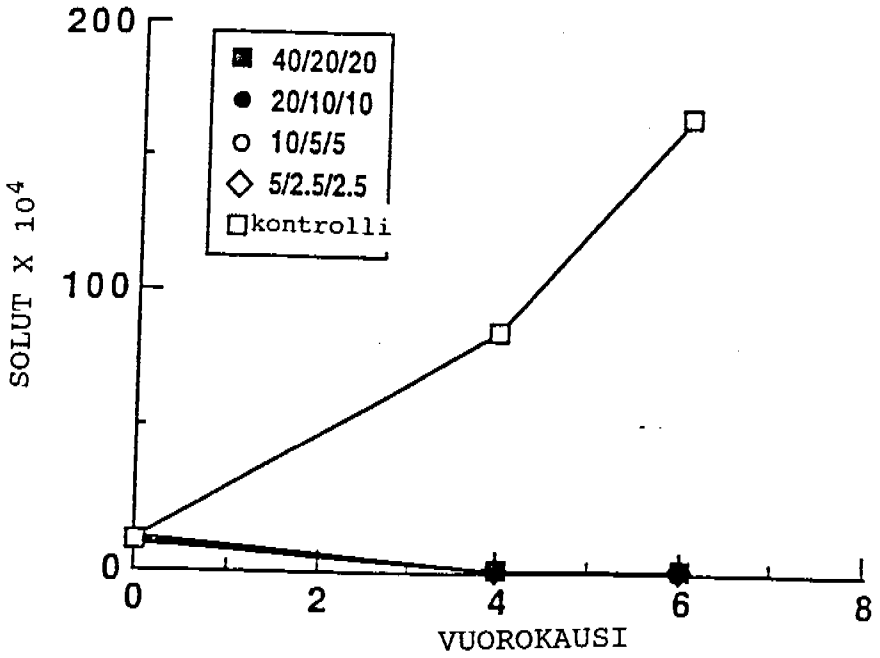

200
100
0
SOLUT X 10^4
40/20/20
20/10/10
10/5/5
5/2.5/2.5
kontrolli
0
2
4
6
8
VUOROKAUSI

Fig. 10

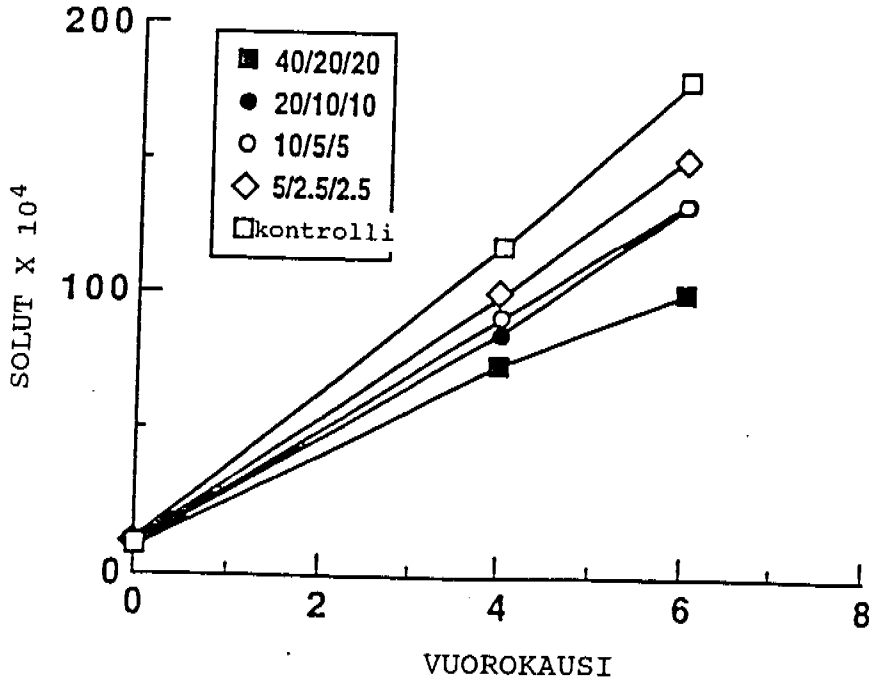

200
100
0
SOLUT X 10^4
40/20/20
20/10/10
10/5/5
5/2.5/2.5
kontrolli
0
2
4
6
8
VUOROKAUSI

Fig. 11

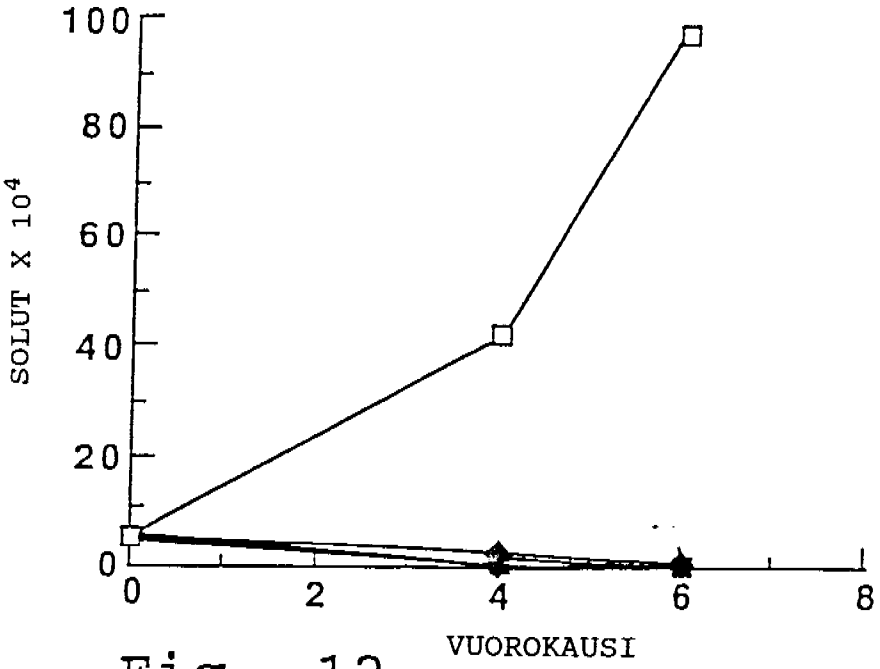

100
80
60
40
20
0
SOLUT X 10^4
0
2
4
6
8
VUOROKAUSI

Fig. 12

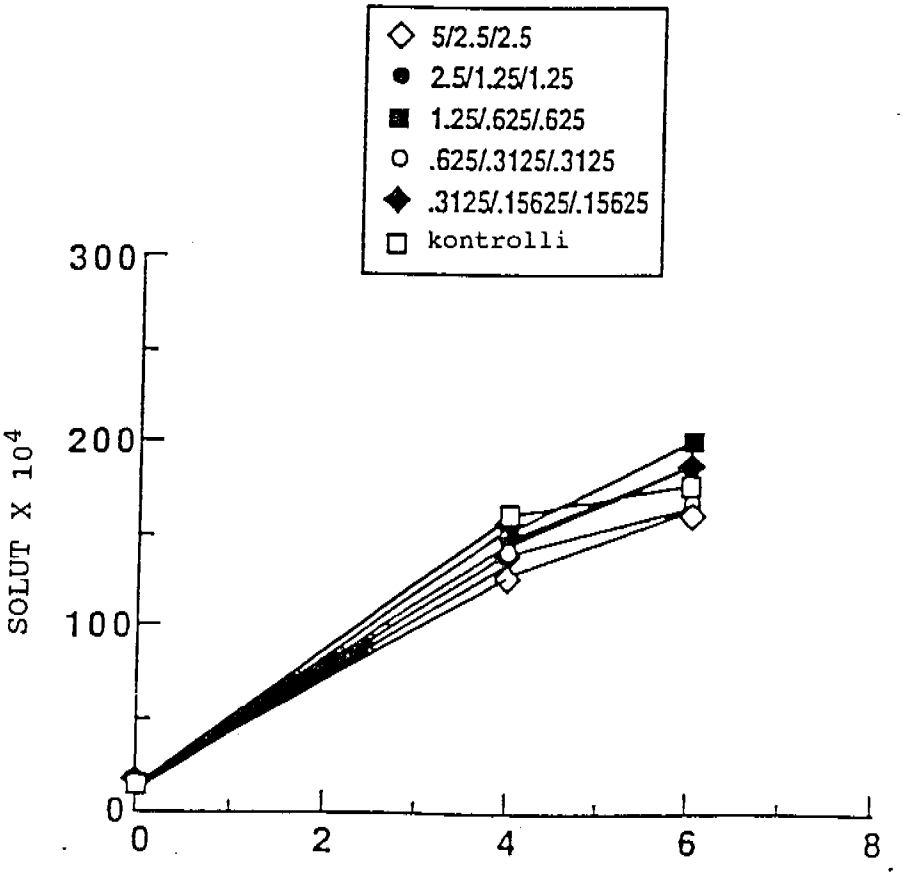

5/2.5/2.5
2.5/1.25/1.25
1.25/.625/.625
.625/.3125/.3125
.3125/.15625/.15625
kontrolli
300
200
100
0
SOLUT X 10^4
0
2
4
6
8
VUOROKAUSI

Fig. 13

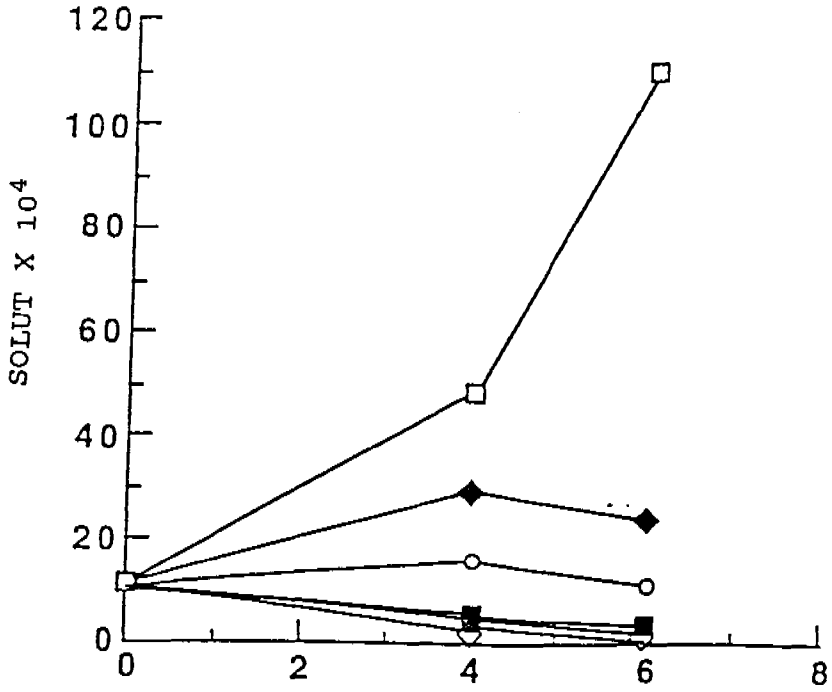
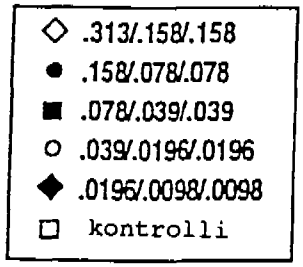

120
100
80
60
40
20
0
SOLUT X 10^4
0
2
4
6
8
VUOROKAUSI

Fig. 14


.313/.158/.158
.158/.078/.078
.078/.039/.039
.039/.0196/.0196
.0196/.0098/.0098
kontrolli

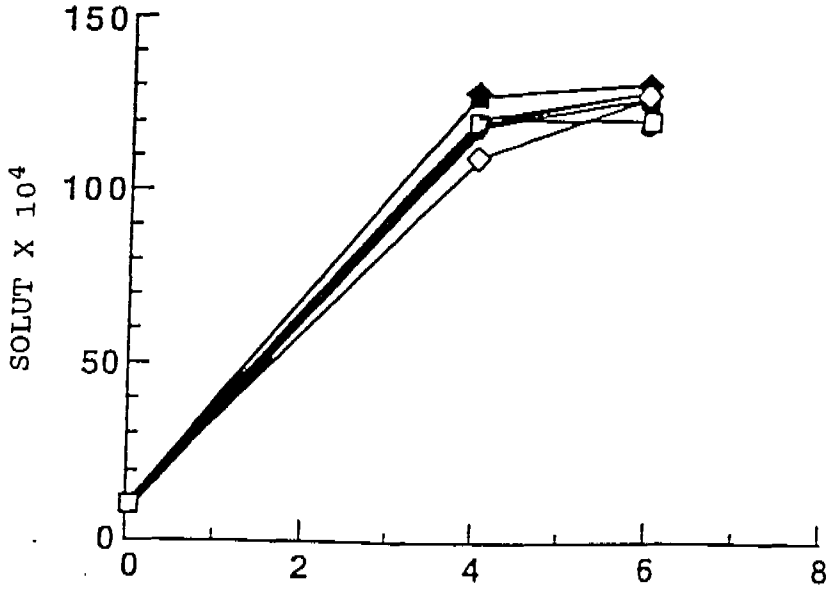

150
100
50
0
SOLUT X 10^4
0
2
4
6
8
VUOROKAUSI

Fig. 15

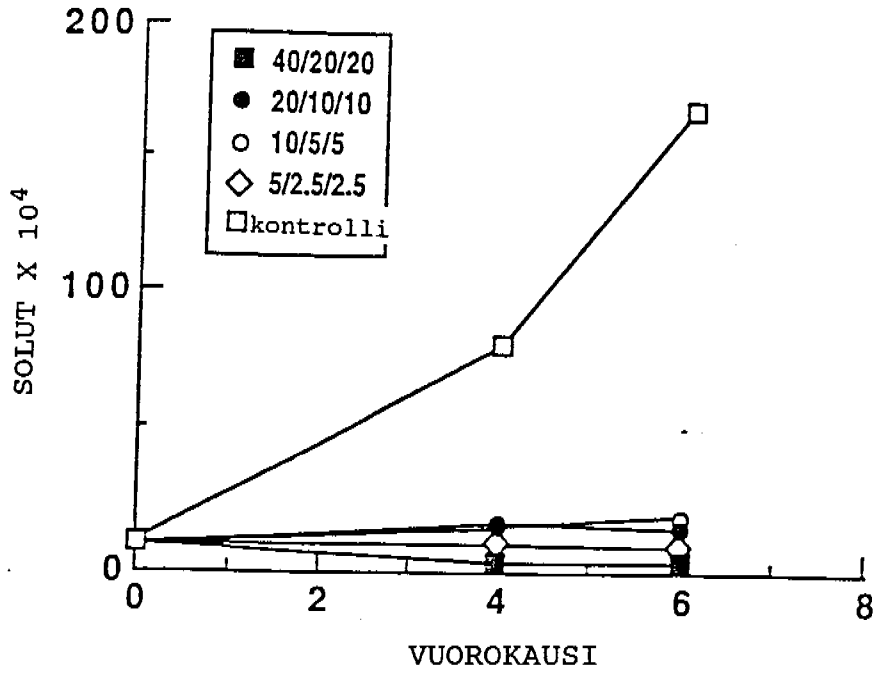

200
100
0
SOLUT X 10^4
40/20/20
20/10/10
10/5/5
5/2.5/2.5
kontrolli
0
2
4
6
8
VUOROKAUSI

Fig. 16

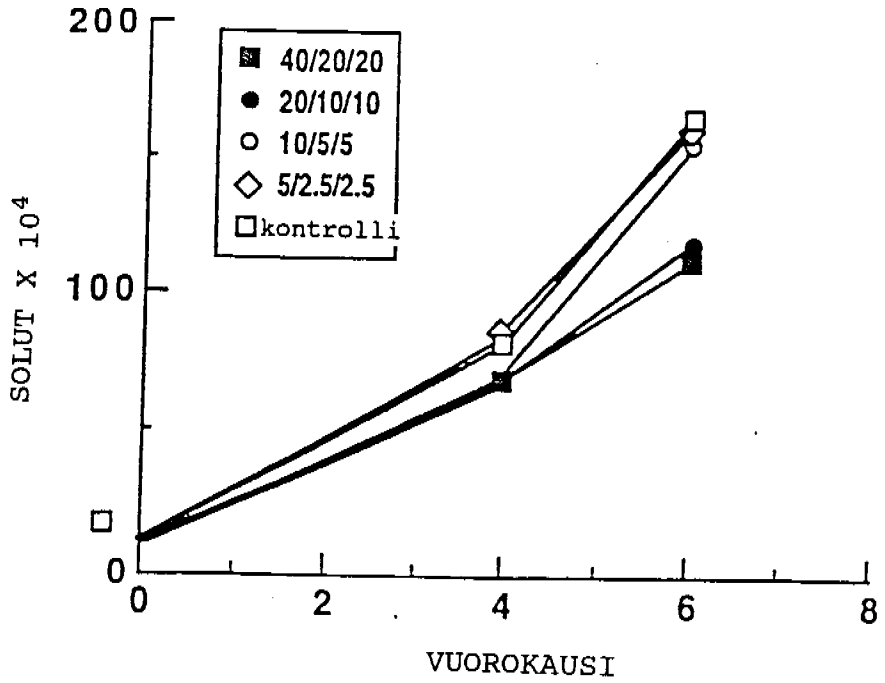

200
100
0
SOLUT X 10^4
40/20/20
20/10/10
10/5/5
5/2.5/2.5
kontrolli
0
2
4
6
8
VUOROKAUSI

Fig. 17

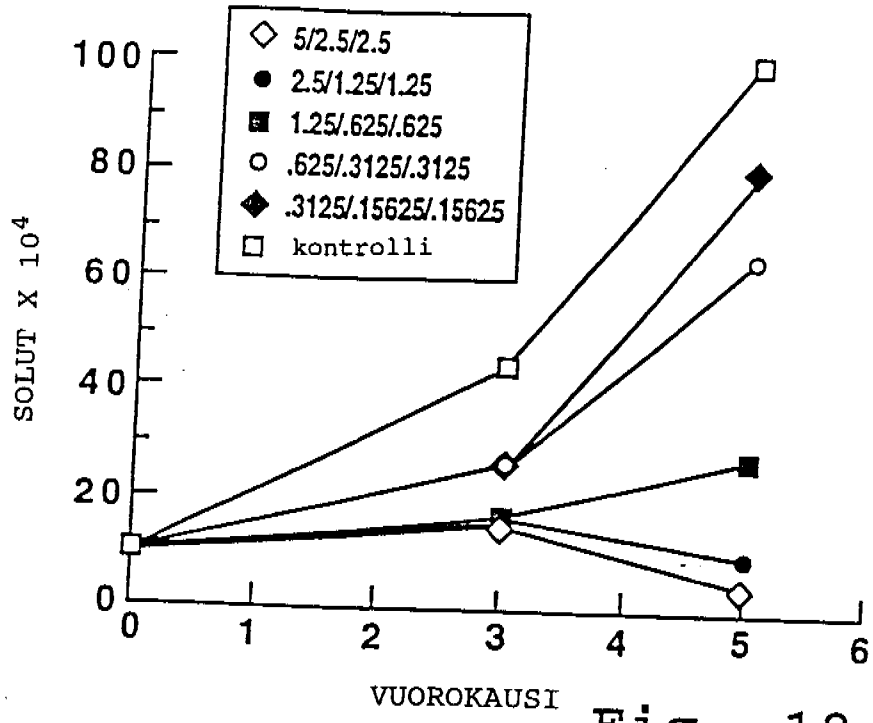

5/2.5/2.5
2.5/1.25/1.25
1.25/.625/.625
.625/.3125/.3125
.3125/.15625/.15625
kontrolli
SOLUT X 10^4
VUOROKAUSI
0
20
40
60
80
100
0
1
2
3
4
5
6

Fig. 18

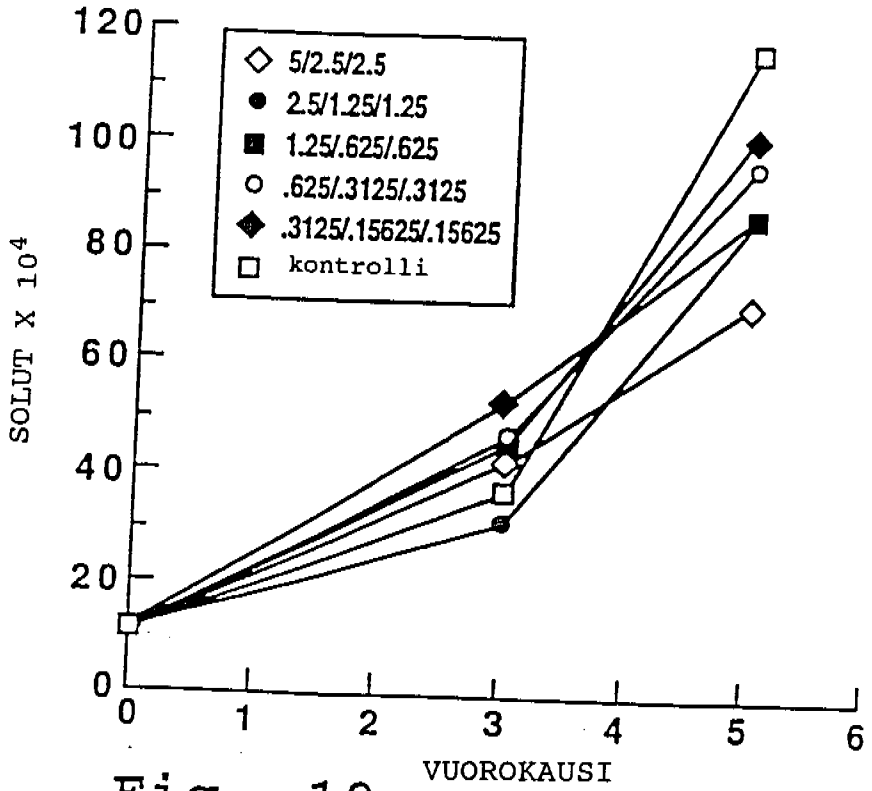

5/2.5/2.5
2.5/1.25/1.25
1.25/.625/.625
.625/.3125/.3125
.3125/.15625/.15625
kontrolli
SOLUT X 10^4
VUOROKAUSI
0
20
40
60
80
100
120
0
1
2
3
4
5
6

Fig. 19

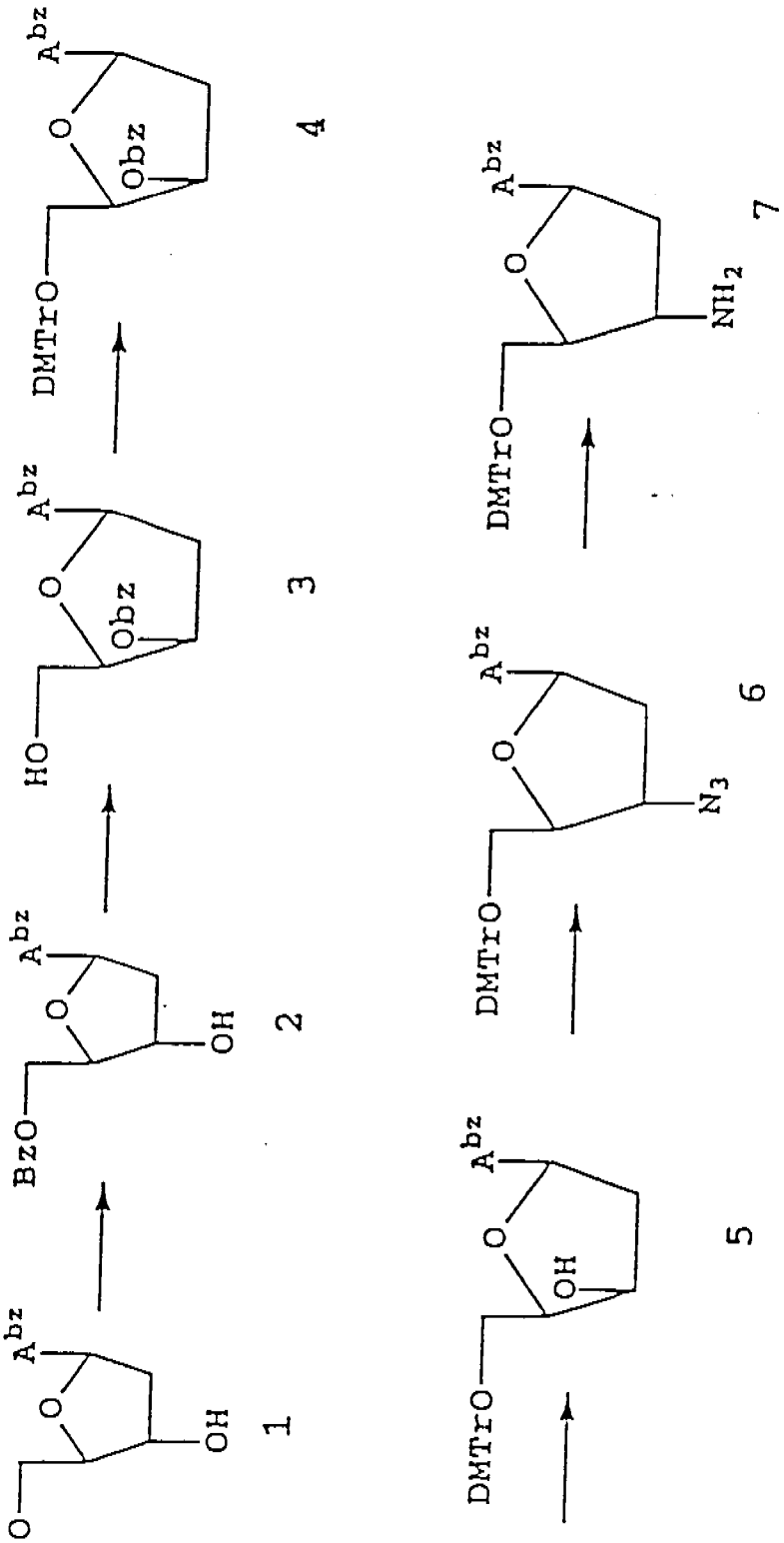

HO
OH
1
BzO
OH
2
HO
Obz
3
DMTrO
Obz
4
DMTrO
OH
5
DMTrO
N_3
6
DMTrO
NH_2
7

Fig. 20