

Oligonukleotidok humán eg5 expressziójának gátlására

K I V O N A T

A találmány tárgyát képezi egy oligonukleotid vagy származéka, amely eg5-öt kódoló szekvencia egy részének felel meg. A találmány szerinti oligonukleotid a természetes DNS-ből felépülő oligonukleotidhoz képest különböző módosításokat tartalmazhat.

A találmány tárgyát képezi továbbá a találmány szerinti oligonukleotidok előállítására szolgáló eljárás és a találmány szerinti oligonukleotidok alkalmazása eg5 expressziójának gátlására. A találmány tárgyát képezi továbbá az oligonukleotidokat tartalmazó gyógyászati készítmény.

A találmány szerinti oligonukleotidok eg5 expressziójának gátlására és eg5 expressziójával kapcsolatos betegségek kezelésére alkalmazhatók.



Roz. D. D.

P0202794

Képviselő:

Danubia

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

B u d a p e s t

Oligonukleotidok humán eg5 expressziójának gátlására

A találmány tárgyát képezi oligonukleotid vagy származéka, amelynek szekvenciája humán eg5-öt vagy ennek egy mutáns formáját kódoló nukleinsavszekvencia egy meghatározott részének felel meg, az oligonukleotidokat tartalmazó gyógyászati készítmény, valamint az oligonukleotid előállítására szolgáló eljárás és az oligonukleotid alkalmazásai.

A találmány szerinti oligonukleotidok előnyösen alkalmazhatók eg5 expressziójának gátlására és eg5 expressziójával kapcsolatos betegségek kezelésére.

A mitózis során egy mikrotubulusokból álló orsószerű képlet segíti a megkettőződött kromoszómákat a leánysejtekbe egyformán szétosztani. A kinezinnel rokon motoros fehérjék képezik az orsó kialakításához és a kromoszómák szétosztásához szükséges erő egyik részét. A bipoláris, mitotikus orsó kialakítása sok, különböző, motoros fehérje aktivitását igényli. Egy humán eredetű, kinezinnel rokon,

motoros fehérje a humán eg5, amely a mitotikus centroszómával lép kölcsönhatásba, és amelyről kimutatták, hogy a bipoláris orsó kialakításához alapvetően fontos [Blangy és mtsai., Cell 83, 1159 (1995)]. Specifikus, humán eg5-ellenanyagok mikroinjekciója meggátolja a centroszóma-vándorlást, és a sejteket a mitózisban megállítja.

A bipoláris orsó kialakulásának meggátlására egy másik lehetőség az eg5 expressziójának gátlása. Az eg5-expresszió specifikus gátlására egy lehetőség olyan antiszensz oligonukleotidok alkalmazása, amelyek adott esetben a tulajdonságaik javítása érdekében módosíthatók [Uhlmann, E. és Peyman, A., Chemical Reviews 90, 543 (1990); Agrawal, S., TIBTECH 376 (1996)]. Az antiszensz oligonukleotidok feltehetőleg az mRNS specifikus szekvenciáihoz kötődnek, amely az mRNS lebomlásához és/vagy a fehérjeszintézis gátlásához vezet.

A találmány tárgyát képezi egy oligonukleotid vagy származéka, amely eg5-öt, előnyösen humán eg5-öt vagy egy kórokozó, pl. *Plasmodium falciparum* (malária) eg5-jét kódoló szekvencia egy részének felel meg. Előnyösen az oligonukleotid az eg5-szekvencia 8-100 nukleotidjának, előnyösebben 8-20 nukleotidjának felel meg. Az oligonukleotid vagy a származék az előzőekben ismertetett szekvenciához kötődik, és megakadályozza az eg5-fehérje kialakulását. A humán eg5-szekvenciát nyilvánosságra hozták [Blangy és mtsai., Cell 83, 1159 (1995)]. A 20. azonosítószámú szekvencia a humán eg5-öt kódoló szekvencia egy példája. A 21.

azonosítószámú szekvencia *Plasmodium falciparum* eg5-szekvenciájára egy példa.

Az oligonukleotid előnyösen tartalmaz olyan szekvenciát, amely humán eg5-öt vagy *Plasmodium falciparum* eg5-jét kódoló nukleinsav egy részének felel meg. A "megfelel" kifejezésen azt értjük, hogy az oligonukleotid bázisszekvenciája komplementer egy olyan nukleinsav egy részével, amely eg5-öt kódol (pl. gén, cDNS, mRNS), amely lehetővé teszi, hogy az oligonukleotid az eg5-öt kódoló nukleinsav "szensz részével" hibridizáljon (ahhoz kötődjön). Ezen az alapon "antiszensz oligonukleotidnak" nevezzük. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint az oligonukleotid tehát antiszensz oligonukleotid. A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint az oligonukleotid ribozim. A ribozim olyan katalitikus nukleinsav, amely mRNS-t hasít. A ribozim előnyösen a kalapácsfej-ribozimok („hammerhead-ribozyme”) csoportjából választható [Vaish és mtsai., *Nucleic Acids Res.* 26, 5237 (1998)].

A találmány szerinti oligonukleotid az eg5-mRNS hibridizációra alkalmas részéhez kötődik és gátolja az eg5-fehérje képződését. Az eg5 mRNS-éhez történő kötődésre és az expresszió gátlására alkalmas oligonukleotidok például az eg5 transzlációs startszakaszára alakíthatók ki.

Az eg5-öt kódoló nukleinsavszekvencia oligonukleotidnak megfelelő részének hosszúsága 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 vagy több nukleotid, és az oligonukleotid előnyösen az eg5-öt kódoló szekvenciának 12 vagy 19 nukleotid hosszúságban felel meg. A találmány

szerinti oligonukleotid 10 (10-mer), 11 (11-mer), 12 (12-mer), 13 (13-mer), 14 (14-mer), 15 (15-mer), 16 (16-mer), 17 (17-mer), 18 (18-mer) vagy 19 (19-mer) nukleotid hosszúságú is lehet.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint az oligonukleotid 12 vagy 19 nukleotid hosszú, ilyen oligonukleotidok például az 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8., 9. azonosítószámú szekvenciák szerinti egyik szekvenciát vagy egy részüket tartalmazhatják, ahol

az 1. azonosítószámú szekvencia: 3'-CTTAAGGCAGTACCGCAGC-5'; 5'-CGACGCCATGACGGAATTC-3'

a 2. azonosítószámú szekvencia: 3'-ACCACTCTACGTCTGGTAA-5'; 5'-AATGGTCTGCATCTCACCA-3'

a 3. azonosítószámú szekvencia: 3'-GGCAGTACCGCAGCGTCGG -5'; 5'-GGCTGCGACGCCATGACGG-3'

a 4. azonosítószámú szekvencia: 3'-CTTAAGGCAGTA-5'; 5'-ATGACGGAATTC-3'

az 5. azonosítószámú szekvencia: 3'-TAAGGCAGTACC-5'; 5'-CCATGACGGAAT-3'

a 6. azonosítószámú szekvencia: 3'-GGCAGTACCGCA-5'; 5'-ACGCCATGACGG-3'

a 7. azonosítószámú szekvencia: 3'-AGTACCGCAGCG-5'; 5'-GCGACGCCATGA-3'

a 8. azonosítószámú szekvencia: 3'-CCGCAGCGTCGG-5'; 5'-GGCTGCGACGCC-3'

a 9. azonosítószámú szekvencia: 3'-GCAGCGTCGGTT-5'; 5'-TTGGCTGCGACG-3'

Különösen előnyös, ha az oligonukleotidot a tulajdonságainak javítása érdekében módosítjuk, például nukleázokkal szembeni ellenálló képességének javítása érdekében, illetőleg hogy nukleázokkal szemben rezisztenssé tegyük, vagy egy komplementer, eg5-öt kódoló nukleinsavhoz, pl. mRNS-hez történő kötődési affinitásának növelése érdekében, vagy a sejtbe történő felvételének javítása érdekében.

A találmány tárgyát képezi tehát egy oligonukleotid, amelynek szekvenciája egyike az előzőekben ismertetett, jellemző szekvenciáknak, és amely ezenkívül egy "természetes" DNS-sel összehasonlítva - amely a nukleozidok között foszfodiészterhidakkal összekötött, "természetes" nukleozid-dezoxiadenozinból (adenin + β -D-2'-dezoxiribóz), dezoxiguanozinból (guanin + β -D-2'-dezoxiribóz) dezoxicitidinből (citozin + β -D-2'-dezoxiribóz) és timidinből (timin + β -D-2'-dezoxiribóz) áll - egy vagy több kémiai módosítást tartalmaz. Az oligonukleotidok egy vagy több, ugyanolyan típusú és/vagy különböző típusú módosítást tartalmazhatnak, minden egyes módosítási típus a másiktól függetlenül választható az oligonukleotidok módosítására ismert típusok közül.

A találmány tárgyát képezik az oligonukleotidok származékai is, például sóik, elsősorban fiziológiailag elfogadható sóik. A sók és a fiziológiailag elfogadható sók ismertetése a következő műben található: Remingtons Pharmaceuticals Science, 1418. oldal, Mack Publishing Company, Easton, PA (1985). A származékok kifejezést a módosított

oligonukleotidokra is alkalmazzuk, amelyek egy vagy több módosítást tartalmaznak (például meghatározott nukleotid-helyzetekben és/vagy meghatározott nukleozidok közötti hidakban, azaz internukleozid-hidakban), az oligonukleotid-analógokra (például poliamid-nukleinsavakra, PNS), a foszfomonoészter-nukleinsavakra (PHONS=PMENS), az oligonukleotid-kimérákra (például egy DNS- és egy PNS-részből álló, vagy egy DNS- és egy PHONS-részből álló oligonukleotidra). A származékok kifejezést az olyan oligonukleotidokra is értjük, amelyek normál vagy természetes eg5 alléljeinek és/vagy mutáns formáinak (mutánsainak) felelnek meg, például humán eg5 alléljei és/vagy mutánsai (pl. 20. azonosítószámú szekvencia) és *Plasmodium falciparum* eg5-jének alléljei és/vagy mutánsai (pl. 21. azonosítószámú szekvencia).

Kémiai módosítások példái a szakember számára jól ismertek, és például Uhlmann, E. és Peyman, A., Chemical Reviews 90, 543 (1990) és "Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques", Protocols for Oligonucleotides and Analogs, szerk.: Agrawal, S., Hrsg., kiad.: Humana Press, Totowa, USA (1993) és Crooke, S.T., Bennet, F., Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36., 107-129 (1996); Hunziker, J. és Leuman, C., Mod. Synt. Methods 7, 331-417 (1995) munkáiban található ismertetés.

A természetes DNS-sel összehasonlítva például a nukleozidok közötti egyik foszfodiészterhíd, egy β -D-2'-deoxiribóz-egység és/vagy egy természetes nukleozidbázis (adenin, guanin, citozin, timin) módosítható, illetve cse-

rélhető ki. A találmány szerinti oligonukleotid egy vagy több ilyen módosítást tartalmazhat, ahol minden egyes módosítás egy azonos szekvenciájú, természetes DNS-ből álló oligonukleotiddal összehasonlítva egy meghatározott foszfodiészter-internukleozidhídban és/vagy egy meghatározott D-2'-dezoxiribóz-egységben és/vagy egy meghatározott természetes nukleozidbázis-helyzetben található.

A találmány tárgyát képezi egy olyan oligonukleotid, amely egy vagy több módosítást tartalmaz, ahol minden egyes módosítás egymástól függetlenül az alábbiak bármelyike:

a) nukleozidok 3'-vége és/vagy 5'-vége közötti foszfodiészterhíd kicserélése módosított internukleozidhídra,

b) nukleozidok 3'-vége és/vagy 5'-vége közötti foszfodiészterhíd kicserélése defoszfohídra,

c) a cukor-foszfát-vázból egy cukor-foszfát-egység kicserélése egy másik egységre,

d) egy β -D-2'-dezoxiribóz-egység kicserélése egy módosított cukoregységre,

e) egy természetes nukleozidbázis kicserélése egy módosított nukleozidbázisra,

f) egy olyan molekulához való kötés, amely az oligonukleotid tulajdonságait befolyásolja,

g) 2'5'-kötést tartalmazó oligoadeniláthoz vagy egy származékához történő kötés, adott esetben alkalmas kapcsolómolekulán (linkeren) keresztül, és

h) egy 3'-3'- és/vagy 5'-5'-inverzió kiépítése az oligonukleotid 3'-végén és/vagy 5'-végén.

Az oligonukleotid kémiai módosításaira konkrét példák a következők:

a) nukleozidok 3'-vége és/vagy 5'-vége közötti foszfodiészterhíd kicserélése egy módosított internukleozid-hídra, ahol a módosított internukleozid-híd például foszforotioát-, foszforoditioát-, $\text{NR}^1\text{R}^{1'}$ -foszforoamidát, borofoszfát-, foszfát-($\text{C}_1\text{-C}_{21}$)-O-alkilészter-, foszfát-[($\text{C}_6\text{-C}_{12}$)-aril-($\text{C}_1\text{-C}_{21}$)-O-alkil]észter-, ($\text{C}_1\text{-C}_8$)-alkilfoszfonát- és/vagy ($\text{C}_6\text{-C}_{12}$)-arilfoszfonát-híd és ($\text{C}_7\text{-C}_{12}$)- α -hidroxi-metil-aril (ismertetése például a WO 95/01363 számú nemzetközi közzétételi iratban található, ahol a ($\text{C}_6\text{-C}_{12}$)-aril, a ($\text{C}_6\text{-C}_{20}$)-aril és a ($\text{C}_6\text{-C}_{14}$)-aril adott esetben halogén-, alkil-, alkoxi-, nitro- vagy ciano-csoporttal szubsztituált, és

ahol R^1 és $\text{R}^{1'}$ jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, ($\text{C}_1\text{-C}_{18}$)-alkil-, ($\text{C}_6\text{-C}_{20}$)-aril-, ($\text{C}_6\text{-C}_{14}$)-aril-($\text{C}_1\text{-C}_8$)-alkil-, előnyösen hidrogén, ($\text{C}_1\text{-C}_8$)-alkil-, előnyösen ($\text{C}_1\text{-C}_4$)-alkil- és/vagy metoxietil-csoport, vagy

R^1 és $\text{R}^{1'}$ jelentése a hozzákapcsolódó nitrogénatommal együtt egy 5-6-tagú heterociklusos gyűrűt képez, amely egy további heteroatomot is tartalmazhat, amely O, S vagy N,

b) nukleozid 3'-vége és/vagy 5'-vége között található foszfodiészterhíd kicserélése egy defoszfohídra [defoszfohidak ismertetése például Uhlmann, E. és Peyman, A., "Protocols for Oligonucleotides and Analogs", Methods in Molecular Biology, 20. kötet, 16. fejezet, 355ff szerk.: Agrawal, S., Hrsg., kiad.: Humana Press, Totowa (1993) című műben található], ahol a defoszfohíd például formacetál-,

3'-tioformacetál-, metil-hidroxil-amin-, oxim-, metilén-dimetil-hidrazo-, dimetilén-szulfon- és/vagy szilil-csoport,

c) egy cukor-foszfát-egység (a β -D-2'-dezoxiribóz és a nukleozidok közötti foszfodiészterhíd képez együtt egy cukor-foszfát-egységet) kicserélése a cukor-foszfát-vázból (a cukor-foszfát-váz cukor-foszfát-egységekből áll) egy másik egységre, ahol a másik egység például

- morfolinoszármazék-oligomer felépítésére alkalmas [amelyet például Stirchak és mtsai., Nucleic Acids Res. 17, 6129 (1989) ismertetnek], azaz például egy morfolinoszármazék-egységre történő kicserélés,

- poliamid-nukleinsav (PNS) felépítésére alkalmas [amelynek ismertetése például Nielsen és mtsai., Bioconj. Chem. 5, 3 (1994) és az EP 0672677 A2 számú európai közzétételi iratban található], azaz például egy PNS-vázegységre, például 2-aminoetil-glicinre történő kicserélés,

- foszfonsav-monoészter-nukleinsav (PHONS) felépítésére alkalmas [amelynek ismertetése például Peyman és mtsai., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35, 2632-2638 (1996) és az EP 0739898 A2 számú európai közzétételi iratban található], azaz egy PHONS-egységre történő kicserélés,

d) egy β -D-2'-dezoxiribóz-egység kicserélése egy módosított cukoregységre, ahol a módosított cukoregység például β -D-ribóz, α -D-2'-dezoxiribóz, L-2'-dezoxiribóz, 2'-F-2'-dezoxiribóz, 2'-O-(C₁-C₆)-alkil-ribóz, ahol az előnyös 2'-O-(C₁-C₆)-alkil-ribóz 2'-O-metil-ribóz, 2'-O-(C₂-C₆)-

alkenil-ribóz, 2'-[O-(C₁-C₆)-alkil-O-(C₁-C₆)-alkil]ribóz, 2'-NH₂-2'-dezoxiribóz, β-D-xilofuranóz, α-arabinofuranóz, 2,4-didezoxi-β-D-eritro-hexopiranoz és karbociklusos [pl. Froehler, J. Am. Chem. Soc. 114, 8320 (1992)] és/vagy nyílt láncú cukoranalóg [pl. Vandendriessche és mtsai., Tetrahedron 49, 7223 (1993)] és/vagy biciklusos cukoranalóg [pl. Tarkov, M. és mtsai., Helv. Chim. Acta 76, 481 (1993)] egyike.

e) egy természetes nukleozidbázis kicserélése egy módosított nukleozidbázisra, ahol a módosított nukleozidbázis például uracil, hipoxantin, 5-hidroxi-metil-uracil, N²-dimetil-guanozin, pszeudouracil, 5-hidroxi-metil-uracil, 5-amino-uracil, dihidro-uracil, 5-fluor-uracil, 5-fluor-citozin, 5-klór-uracil, 5-klór-citozin, 5-bróm-uracil, 5-bróm-citozin, 2,4-diaminopurin, 8-azapurin, szubsztituált 7-deazapurin, előnyösen 7-deaza-7-szubsztituált és/vagy 7-deaza-8-szubsztituált purin vagy természetes nukleozidbázisok más módosításainak egyike (módosított nukleozidbázisok ismertetése az EP 0710667 A2 és az EP 0680969 A2 európai közzétételi iratokban található) egy olyan molekulához való kötődés, amely az oligonukleotid tulajdonságait befolyásolja azáltal, hogy az oligonukleotid kötődése egy vagy több molekulához az oligonukleotid tulajdonságait (kedvezően) befolyásolja (például az oligonukleotidnak azt a képességét, hogy a sejtmembránon keresztülhatoljon, illetőleg egy sejtbe jusson, nukleázokkal szembeni stabilitását, eg5-öt kódoló célszekvenciához való affinitását, az oligonukleotid

farmakokinetikáját, egy antiszensz oligonukleotid/ribozim, illetőleg az oligonukleotiddal konjugált molekula azon képességét, hogy a konkrét eg5-öt kódoló célszekvenciát megfogja, például kötésre és/vagy keresztkötésre való képességét, ha az oligonukleotid az eg5-öt kódoló célszekvenciával hibridizál), ahol a molekula például az oligonukleotidhoz kötődni képes molekula, polilizin, interkaláló anyag, például pirén, akridin, fenazin vagy fenantridin, fluoreszkáló anyag például fluoreszcein, keresztkötésre alkalmas anyag, például pszoralén vagy azidoproflavin, lipofil molekula, például (C₁₂-C₂₀)-alkil, lipid, például 1,2-dihexadecil-rac-glicerín, szteroid, például koleszterin vagy tesztoszteron, vitamin, például E-vitamin, poli- vagy oligoetilénglikol előnyösen egy foszfátcsoporton keresztül (pl. trietilénglikol-foszfát, hexaetilén-glikol-foszfát) az oligonukleotidhoz kötve, (C₁₂-C₁₈)-alkilfoszfát-diészter és/vagy O-CH₂-CH(OH)-O-(C₁₂-C₁₈)-alkil jöhet számításba, ezek a molekulák a szekvencia 5'-végén és/vagy 3'-végén és/vagy a szekvencián belül épülhetnek be, például oligonukleotid-konjugátumok kiépítésére alkalmas nukleotidbázisnál, oligonukleotid-konjugátumok előállítására szolgáló eljárások a szakember számára jól ismertek és ismertetés a következő művekben található: Uhlmann, E. és Peyman, A., Chem. Rev. 90, 543 (1990); Manoharan, M., Antisense Research and Applications, 17. fejezet, 303ff oldal, Crooke és Lebleu, Hrsg., CRC Press, Boca Raton (1993) és EP-A 0552766 számú európai közzétételi irat.

g) 2'5'-kötést tartalmazó oligoadeniláthoz történő kötés, előnyösen egy alkalmas kapcsolómolekulán (linkeren) keresztül, ahol a 2'-5'-kötést tartalmazó oligoadenilát például 2'5'-kötést tartalmazó triadenilát, 2'5'-kötést tartalmazó tetraadenilát, 2'5'-kötést tartalmazó pentaadenilát, 2'5'-kötést tartalmazó hexaadenilát vagy 2'5'-kötést tartalmazó heptaadenilát-molekula és származékaik egyike, ahol a 2'5'-kötést tartalmazó oligoadenilát-származék például Cordycepin (2'5'-kötést tartalmazó 3'-deoxi-adenilát, és ahol trietilén-glikol például egy alkalmas kapcsolóanyag, és ahol a 2'5'-kötést tartalmazó oligoadenilát 5'-vége foszfát-, difoszfát- vagy trifoszfát-csoportot kell hordozzon, amelyben egy vagy több oxigénatom például kénatommal helyettesíthető, ahol a foszfát- vagy tiofoszfát-csoporton keresztül történő helyettesítés előnyös.

h) 3'-3'- és/vagy 5'-5'-inverzió bevitele az oligonukleotid 3'-végén és/vagy 5'-végén, ahol ezen fajta kémiai módosítások a szakember számára jól ismertek, és ismertetés például Koga, M. és mtsai., J. Org. Chem. 56, 3757 (1991) és EP 0464638 és EP 0593901 számú európai közzétételi iratokban található.

A cukor-foszfát-vázból egy cukor-foszfát-egység kicserélése egy másik egységre, amely például PNS-vázegység vagy PHONS-vázegység lehet, előnyösen egy nukleotid kicserélése például egy PNS-egységre vagy egy PHONS-egységre, amely már természetes nukleozidbázisokat és/vagy módosított nukleozidbázisokat tartalmaz, például egy módosított

nukleozidbázist a következők közül: uracil, hipoxantin, -5-(hidroxi-metil)-uracil, N²-dimetil-guanozin, pszeudouracil, 5-(hidroxi-metil)-uracil, 5-amino-uracil, pszeudouracil, dihidro-uracil, 5-fluor-uracil, 5-fluor-citozin, 5-klór-uracil, 5-klór-citozin, 5-bróm-uracil, 5-bróm-citozin, 2,4-diamino-purin, 8-azapurin, szubsztituált 7-deazapurin, előnyösen 7-deaza-7-szubsztituált és/vagy 7-deaza-8-szubsztituált purin vagy természetes nukleozidbázis más módosításai (módosított nukleotidbázisok ismertetése az EP 0710667 A2 és az EP 0680969 A2 számú európai közzétételi iratokban található).

Az EP 0710667 A2, az EP 0680969 A2, az EP 0464638, az EP 0593901, az EP 0672677 A2, az EP 0739898 A2 és az EP 0552766 számú európai és a WO 95/01363 számú nemzetközi közzétételi iratokban ismertetett oligonukleotid-módosítások a kitanítás részét képezik.

A találmány egy megvalósítási módja szerint az oligonukleotid-szekvenciában a nukleozidok közötti egy vagy több foszfodiészterhidat módosítjuk, előnyösen nukleozidok közötti egy vagy több foszfodiészterhidat nukleozidok közötti foszforotioáthíddal és/vagy nukleozidok közötti (C₆-C₁₂)-arilfoszfonát-híddal, előnyösen α -hidroxibenzil-foszfonát-híddal helyettesítjük, amelyekben a benzil-csoportot előnyösen szubsztituáljuk, például nitro-, metil-, halogén-csoporttal helyettesítjük. Egy teljesen foszforotioát-oligonukleotidban a nukleozidok közötti valamennyi foszfodiészterhidat foszforotioát-hídra módosítjuk. Előnyösen a találmány tárgyát képezi egy olyan oligonukleotid,

amelyben nem minden, nukleozidok közötti foszfo-
diészterhidat módosítunk egységesen foszforotioátra (a
nukleozidok között foszforotioáthidakra). Előnyösen leg-
alább egy internukleozid-hídon másfajta módosítást hajtunk
végre, vagy nem módosítjuk. Előnyösebben a találmány tár-
gyát képezi egy olyan nukleotid, amely ezen kívül még leg-
alább egy másfajta módosítást tartalmaz. A találmány egy
további előnyös megvalósítási módja szerint az
oligonukleotid-szekvencián belül egy vagy több nukleozidot
(β -D-2'-dezoxiribóz és/vagy nukleozidbázis) módosítunk,
előnyösen a β -D-2'-dezoxiribózt 2'-O-(C₁-C₆)-alkil-ribózra,
előnyösen 2'-O-metil-ribózra cseréljük és/vagy a
nukleozidbázist 8-azapurinra, 7-deaza-7-szubsztituált pu-
rinra és/vagy 7-deaza-8-szubsztituált purinra cseréljük
(purin, adenin, guanin). Előnyösen a találmány tárgyát ké-
pezi egy olyan oligonukleotid, amelyben nem minden
nukleozidot módosítunk egységesen. Előnyösen a találmány
tárgyát képezi egy olyan oligonukleotid, amely ezen kívül
legalább egy másfajta módosítást is tartalmaz.

A találmány egy további megvalósítási módja szerint a
cukor-foszfát-vázból egy vagy több cukor-foszfát-egységet
PNS-vázegységre, előnyösen 2-aminoetil-glicin-egységre cse-
rélünk. Előnyösen a kicserélt cukor-foszfát-egységek leg-
alább egy bizonyos mértékig egymáshoz kapcsoltak. Előnyösen
a találmány tárgyát képezi egy olyan oligonukleotid, amely-
ben nem minden cukor-foszfát-egységet cseréltünk ki egysé-
gesen. A találmány tárgyát képezik előnyösen a kiméra
oligonukleotidok, például az olyanok, amelyek egy vagy több

PNS- és egy vagy több DNS-részből állnak. Az ilyen kiméra oligonukleotidokra például szolgálnak a következő módosítási minták, amelyek nem korlátozzák a találmány tárgykörét: DNS-PNS, PNS-DNS, DNS-PNS-DNS, PNS-DNS-PNS, DNS-PNS-DNS-PNS, PNS-DNS-PNS-DNS. Hasonló minták DNS-részekből és PHONS-részekből összeállított kiméra molekulákra is lehetségesek, például DNS-PHONS, PHONS-DNS, DNS-PHONS-DNS, PHONS-DNS-PHONS, DNS-PHONS-DNS-PHONS, PHONS-DNS-PHONS-DNS. Ezenkívül természetesen három különböző részből, mint DNS-rész(ek)ből, PHONS-rész(ek)ből vagy PNS-rész(ek)ből álló kiméra molekulák is lehetségesek. Előnyösen a találmány tárgyát képezi egy olyan oligonukleotid, amely ezenkívül még legalább egy, másfajta módosítást is tartalmaz.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint az oligonukleotid 3'-végéhez és/vagy 5'-végéhez egy (C_{12} - C_{18})-alkil-csoportot, előnyösen egy C_{16} -alkil-csoportot, egy trietilén-glikol-csoportot vagy egy hexaetilén-glikol-csoportot kötünk - ezek a csoportok előnyösen foszfát-csoporton keresztül kötődnek az oligonukleotidhoz. Előnyösen a találmány tárgyát képezi egy olyan oligonukleotid, amely nincs mind a két végén (3'-végén és 5'-végén) (egyformán) módosítva. Előnyösen a találmány tárgyát képezi egy olyan oligonukleotid, amely ezen kívül még legalább egy, másfajta módosítást is tartalmaz.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint az oligonukleotid-szekvencián belül csak meghatározott helyzetekben történt módosítás (pl. részlegesen módosított oligonukleotid). Részlegesen módosított oligonukleotidokat

egyes leírásokban minimálisan módosított oligonukleotidoknak is nevezik. A szekvencián belül egy módosítás egy meghatározott helyre korlátozódhat (meghatározott nukleotidokra, meghatározott nukleozidokra, meghatározott nukleozidbázisokra, meghatározott internukleozid-hidakra).

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint olyan részlegesen módosított oligonukleotidot állítunk elő, amelyben csak egyes foszfodiészterhidakat cserélünk ki módosított internukleozid-hidakra, például foszforotioát-hidakra és/vagy α -hidroxibenzil-foszfónát-hidakra. Előnyösen a találmány tárgyát képezik a csak bizonyos mértékben módosított oligonukleotidok.

A találmány tárgyát képezi előnyösen egy olyan oligonukleotid, amelynél az 5'-végen és/vagy a 3'-végen 1-5 terminális nukleotidegység a megfelelő nukleozidok 5'-végén és/vagy 3'-végén található internukleozid-hidak módosításával védve van, előnyösen a nukleozidok közötti foszfodiészterhidak foszforotioáthidakra és/vagy α -hidroxibenzil-foszfónát-hidakra történő kicserélésével. Előnyösebbek az oligonukleotid 3'-végén lévő, olyan 1-5 terminális nukleotidegységek, amelyek a megfelelő nukleozid 5'-végén és/vagy 3'-végén található, módosított internukleozid-hidakkal vannak védve. Adott esetben ezenkívül az oligonukleotid 5'-végén lévő 1-5 terminális nukleotidegység is védve van a megfelelő nukleozidok 5'-végén és/vagy 3'-végén található, módosított internukleozid-hidakkal. Adott esetben az oligonukleotid más helyzetekben további módosításokat is tartalmazhat.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy olyan oligonukleotid, amelynél legalább egy, belső pirimidin-nukleozid és/vagy ennek a pirimidinnukleozidnak (nukleozid egy pirimidinbázissal, például citozinnal, uracillal, timinnel) az 5'-végén és/vagy a 3'-végén található internukleozid-híd módosítva van, előnyösen nukleozidok közötti foszfodiészterhíd/hidak kicserélése egy vagy több foszforotioáthídra/hidakra és/vagy egy vagy több α -hidroxi-benzil-foszfonáthídra/hidakra.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint az oligonukleotid 5'-végén és/vagy 3'-végén lévő 1-5 terminális nukleotidegységek a megfelelő nukleozidok 5'-és/vagy 3'-végén található, módosított internukleozid-hidakkal védve vannak, és ezenkívül legalább egy belső pirimidinnukleozid és/vagy a pirimidinnukleozid 5'-végén és/vagy 3'-végén található internukleozid-híd módosítva van.

A részlegesen módosított oligonukleotid elvét például Peyman, A. és Uhlmann, E. ismertetik [Peyman, A. és Uhlmann, E., Biol. Chem. Hoppe-Seyler 377, 67-70 (1996) és EP 0653439 számú európai közzétételi irat, amelyek a kitartás részét képezik]. Ebben az esetben az 5'-végén és/vagy a 3'-végén lévő 1-5 terminális nukleotidegység védve van, például a megfelelő nukleozid 3'-végén és/vagy 5'-végén található, nukleozidok közötti foszfodiészterhidak például nukleozidok közötti foszforotioáthidakra cserélhetők. Ezenkívül előnyösen legalább egy belső pirimidin-nukleozid-helyzet (illetőleg nukleotid-helyzet) módosítva van, elő-

nyösen pirimidin-nukleozid 3'- és/vagy 5'-inter-nukleozidhíd/hidak van(nak) módosítva vagy kicserélve, például nukleozidok közötti egy vagy több foszforotioát-híd/hidakra. Részlegesen módosított oligonukleotidoknak különösen előnyös tulajdonságaik lehetnek, például nukleázokkal szemben igen nagy mértékben ellenállóak, és mindemellett csak minimálisan vannak módosítva. Ezenkívül jelentősen csökkent mértékben mutatnak nem antiszensz hatásokat, amelyek a csak foszforotioátból álló oligonukleotidok alkalmazásával gyakran kapcsolatosak [Stein és Krieg, Antisense Res. Dev. 4, 67 (1994)]. Részlegesen módosított oligonukleotidok magasabb kötési affinitást is mutatnak a csak foszforotioátokból álló oligonukleotidoknál.

A találmány tárgyát képezik előnyösen a részlegesen/minimálisan módosított oligonukleotidok.

10. azonosítószámú szekvencia:

3'-C*T*T*A A G G C*A G T*A C*C G*C A G*C-5' (K3)

5'-C G A C*G*C*C*A*T G A*C G G A A*T*T*C-3'

11. azonosítószámú szekvencia:

3'-A*C*C*A C*T C*T A C*G T*C*T G G*T A*A-5' (K4)

5'-A*A T*G G T*C*T G*C A T*C T*C A*C*C*A-5'

12. azonosítószámú szekvencia:

3'-G*G*C*A G*T A C*C G C*A G*C G T*C G*G-5' (K6)

5'-G*G C*T G C*G A*C G C*C A T*G A*C*G*G-3'

13. azonosítószámú szekvencia:

3'-C*T*T*A A G G*C A G*T*A-5'

5'-A*T*G A C*G G A A*T*T*C-3'

14. azonosítószámú szekvencia:

3'-T*A*A G G C*A G*T A*C*C-5'

5'-C*C*A T*G A*C G G A*A*T-3'

15. azonosítószámú szekvencia:

3'-G*G*C A G*T A C*C*G C*A-5'

5'-A*C G*C*C A T*G A C*G*G-3'

16. azonosítószámú szekvencia:

3'-A*G*T A C*C G*C A G*C*G-5'

5'-G*C*G A C*G C*C A T*G*A-3'

17. azonosítószámú szekvencia:

3'-C*C*G*C A G*C G T*C G*G-5'

5'-G*G C*T G C*G A C*G*C*C-3'

18. azonosítószámú szekvencia:

3'-G*C*A G C*G T*C G G*T*T-5'

5'-T*T*G G C*T G C*G A*C*G-3'

ahol "*" az internukleozid-híd módosítását jelenti,

"*" előnyösen foszforotioát-internukleozidhíd

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint a találmány tárgyát képezi egy részlegesen módosított oligonukleotid, amelynél egy nukleozidot módosítottunk, például egy nukleozidbázist és/vagy egy β -D-2'-dezoxiribóz-egységet módosítottunk. Előnyösen egy β -D-dezoxiribóz-egységet cseréltünk ki egy 2'-O-(C₁-C₆)-alkil-ribózra, előnyösebben 2'-O-metil-ribózra (egy β -D-2'-dezoxiribonukleozidot cserélünk ki 2'-O-metil-ribonukleozidra).

A találmány szerinti oligonukleotid egy fajta módosítási típuson kívül egy másik fajta módosítási típust is tartalmazhat.

A találmány egy további megvalósítási módja szerint az oligonukleotid meghatározott helyzetekben módosított internukleozid-hidakat és ezenkívül meghatározott helyzetekben nukleozid módosításait tartalmazza, előnyösen egy β -D-2'-dezoxiribózt cserélünk ki. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint az internukleozid-módosítás egy foszfodiészterhíd kicserélése egy foszforotioáthídra, és a β -D-2'-dezoxiribóz módosítása 2'-O-metilribózra történő kicserélés, ebben az esetben az oligonukleotid kiméra oligonukleotid, amely módosított és nem módosított DNS- és RNS-részekből áll, amelyek 2'-O-metilribonukleozidokat és β -D-2'-dezoxiribonukleozidokat, valamint a nukleozidok között foszfodiészter- és foszforotioáthidakat tartalmaznak.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint a találmány tárgyát képezi egy olyan oligonukleotid, amely egy vagy több (C_{12} - C_{18})-alkil-csoportot tartalmaz, előnyösen egy C_{16} -alkil-csoportot a 3'- és/vagy 5'-végén. A (C_{12} - C_{18})-alkil-csoport például foszfodiészterként kötődhet, mint ezt az EP 0552766 A2 számú európai közzétételi iratban ismertetik (az EP 0552766 A2 számú európai közzétételi irat a kitanítás részét képezi), vagy $O-CH_2-CH(OH)-O-(C_{12}-C_{18})$ -alkil 3'-foszfodiésztereként. Előnyös az olyan oligonukleotid, amelynél egy C_{16} -alkil-csoport kötődik a 3'- és/vagy az 5'-végén.

A találmány tárgyát képezi az olyan oligonukleotid is, amelyben a 3'- és/vagy az 5'-végén oligoetilén-glikol-csoport kötődik, előnyösen trietilén-glikol vagy hexaetilénglikol, előnyösebben foszfodiészteren keresztül

(tri- vagy hexaetilén-glikol-foszfátészter). Egy ilyen oligonukleotid természetesen további módosításokat is tartalmazhat.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint az oligonukleotid egy kapcsolómolekulán (linkeren) keresztül 2'5'-kötést tartalmazó oligoadenilát-5'-(tio)foszfáthoz kötődik. Kapcsolómolekula lehet például egy oligoetilénglikol-foszfát-csoport, előnyösen trietilén-glikol-foszfát-, tetraetilén-glikol-foszfát- vagy hexaetilén-glikol-foszfát-csoport. A 2'5'-kötést tartalmazó oligoadenilát előnyösen a 2'-végén keresztül tetra- vagy pentaadenilátként kötődhet, amelynek 5'-hidroxi-csoportja egy foszfát- vagy tiofoszfát-csoporttal van szubsztituálva. Ismert, hogy 2'5'-kötést tartalmazó oligoadenilát RN-áz L-t indukál a cél-mRNS hasítására [Torrence és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1300 (1993)]. A 2'5'-oligoadenilát aktiválja a ribonukleáz L-et (RN-áz L), amely azután az eg5-mRNS-t lebontja. Egy 2'5'-kötést tartalmazó adenilát helyett például egy, a Cordycepin nukleozidanalógból levezetett 2'5'-kötést tartalmazó 3'-dezoxiadenilát is beépíthető. Ebben az esetben az az oligonukleotid-rész, amely a megcélzott nukleinsavval komplementer, előnyösen meghatározott helyzetekben 2'-O-(C₁-C₆)-alkil-ribonukleoziddal (előnyösen 2'-O-metil-ribonukleoziddal) vagy PNS-sel van módosítva.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint egy vagy több természetes nukleozidbázist kicserélünk nem természetes, illetőleg módosított nukleozid-

bázisokra, előnyösen 8-azapurinra és/vagy 7-deaza-7-szubsztituált purinra és/vagy 7-deaza-8-szubsztituált purinra, amelyeket például az EP 0171066 és EP 0680969 számú európai közzétételi iratokban ismertetnek.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint a nukleozidban 3'3'- és/vagy 5'5'-inverziók találhatóak a 3'- és/vagy 5'-végen, amelyeket például az EP 0464638 és az EP 0593901 számú európai közzétételi iratokban ismertetnek.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint egy vagy több foszfodiészterhidat kicserélünk α -hidroxibenzil-foszfónáthídra, amelyet a WO 95/01363 számú nemzetközi közzétételi iratban ismertetnek.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint az oligonukleotidban módosítás történt a cukor-foszfát-vázban, előnyösen egy PNS-egységre történő módosítás.

Más módosítási minták is lehetségesek, például DNS-PNS-DNS, PNS-DNS. Hasonló módosítási minták lehetségesek PHONS/DNS-kimérákra is. Ezek a módosítási minták minden egyes másfajta módosítási fajtaival kombinálhatók, és hasonló módosítási minták természetesen más, találmány szerinti oligonukleotidokra is lehetségesek.

Az előzőekben ismertetett, bizonyos oligonukleotidok - meghatározott szekvenciával, meghatározott helyzetekben meghatározott módosítási típussal/típusokkal (speciális módosítási minta) csak a találmány különböző megvalósítási módjainak példájául szolgálnak. A találmány tárgyköre nem

korlátozódik ezekre a bizonyos oligonukleotidokra. Más szekvenciakombinációk és módosítási minták ugyanúgy lehetségesek.

A találmány szerinti oligonukleotid specifikusan gátolja a célfehérje (azaz az eg5), illetőleg a célszekvencia (egy eg5-öt kódoló nukleinsav, előnyösen eg5-mRNS) expresszióját. A találmány szerinti oligonukleotid előnyösen specifikusan gátolja az eg5 expresszióját. Ennek hatására az eg5-fehérje koncentrációja csökken a nem kezelt egyedek expressziójával összehasonlítva. A specifitás például a találmány szerinti oligonukleotid eg5-expressziójára való hatásának ugyanezen oligonukleotid béta-aktin-expressziójára való hatásának összehasonlításával mutatható ki az mRNS és/vagy a fehérje szintjén. A találmány szerinti oligonukleotiddal történő kezelés csak az eg5-mRNS és/vagy az eg5-fehérje koncentrációját csökkenti, míg például a béta-aktin (egy létfontosságú fehérje) mRNS-ének és/vagy fehérjéjének koncentrációja változatlan marad.

A találmány szerinti oligonukleotid humán eredetű sejtekben előnyösen az eg5 expresszióját hatékonyan gátolja és/vagy gerinces állatokban a tumornövekedést képes gátolni. A találmány szerinti oligonukleotid előnyösen csökkenti az eg5 mRNS-ének és/vagy fehérjéjének koncentrációját a kezelt egyedek tumorában a kezeletlenekhez képest. A találmány szerinti oligonukleotid előnyösen csökkenti a tumor nagyságát gerinces állatokban, például egerekben, a kezeletlen egerekkel összehasonlítva, illetőleg ugyanebben az

állatban a tumor kezelés előtti nagyságával összehasonlítva.

A találmány tárgyát képezi eljárás a találmány szerinti nukleotid előállítására. Az előállítási eljárás az oligonukleotid kémiai szintézisét jelenti. A kémiai szintézis előnyösen oligonukleotidok szintézisére alkalmazott, hagyományos eljárások egyikével történik, például foszforamidit-eljárással Caruthers szerint [Caruthers, Tetrahedron Letters 24, 245 (1983)], H-foszfónát-eljárással [Todd és mtsai., J. Chem. Soc. 3291 (1957)] vagy foszfortriészter-eljárással [Sonveaux, Bioorg. Chem. 14, 274 (1986); Gait, M. J., Oligonukleotide Synthesis, A practical Approach, IRL Press, Oxford (1984)] vagy javított vagy megváltoztatott eljárásokkal, amelyek ezekből a hagyományos eljárásokból származnak. A találmány szerinti oligonukleotid például az 1. példában ismertetettek szerint állítható elő. A találmány szerinti oligonukleotid előnyösen szilárd fázison szintetizálható, amelyre megfelelő módon védett monomereket (pl. nukleozidok) kondenzálunk, hogy a monomerek között internukleozid-hidakat építsünk ki. A találmány tárgyát képezi például eljárás oligonukleotid vagy származékának előállítására, amely eljárás során 3'- vagy 2'-terminális foszfor (V)-csoporttal és szabad 5'-hidroxil- vagy merkaptó-csoporttal bíró nukleotidegységet egy másik, a 3'-helyzetben foszfor(III)- vagy foszfor(V)-csoporttal bíró nukleotidegységre vagy aktivált származékára cseréljük, és ahol adott esetben védőcsoportokat alkalmazunk, amelyeket átmenetileg beviszünk az oligonukleotidba, hogy

más funkciós csoportokat védjük, és amelyeket a szintézis után eltávolítunk, és a szilárd fázisról lehasított oligonukleotid adott esetben fiziológiailag elfogadható só formájába alakítható. Módosított oligonukleotid szintéziséhez a hagyományos eljárások bizonyos mértékben változtathatók. Ezek a változtatások a szakember számára ismertek, és például Agrawal, S. ismerteti [Agrawal, S., Protocols for oligonucleotides and analogs, Human Press Inc., Totowa, New Jersey (1993)]. Módosított oligonukleotidok előállítását az EP 0710667, az EP 0680969, az EP 0464638, az EP 0593901, az EP 0672677, az EP 0739898 és az EP 0552766 számú európai közzétételi iratokban és a WO 95/01363 számú nemzetközi közzétételi iratban is leírják. Az előzőekben ismertetett hivatkozásokban közölt eljárások módosított oligonukleotidok előállítására a kitanítás részét képezik.

A találmány tárgyát képezi továbbá eljárás eg5 expressziójának gátlására és/vagy egy eg5-öt kódoló nukleinsav expressziójának megváltoztatására, amely során a találmány szerinti oligonukleotid egy eg5-öt kódoló nukleinsavval (pl. mRNS, cDNS) kapcsolatba kerül, és az oligonukleotid az eg5-öt kódoló nukleinsavval hibridizál.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás, amely során az oligonukleotid egy eg5-öt kódoló nukleinsavval (pl. mRNS, cDNS) kapcsolatba kerül, például oly módon, hogy az oligonukleotidot ismert eljárások segítségével bevisszük egy sejtbe, például sejteknek az előzőekben ismertetett oligonukleotiddal vagy kisserelésével történő inkubálásával - ilyen kisserelés a felvételt elősegítő anyagokat tartal-

mazhat, például lipofectint, Lipofectamint, Cellfectint vagy polikationokat (pl. polilizin).

Az oligonukleotidot például előbb Cellfectinnel inkubáljuk pl. 30 percen keresztül szobahőmérsékleten, majd körülbelül maximum 5 órán keresztül sejttel inkubáljuk, és ilyen módon az oligonukleotid bekerül a sejtbe.

A találmány tárgyát képezi továbbá az oligonukleotid alkalmazása, előnyösen antiszensz oligonukleotidként (az oligonukleotid kötődik egy eg5-öt kódoló mRNS-hez) vagy ribozimként (egy eg5-öt kódoló mRNS-hez kötődik, és hasítja az mRNS-t). A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint az oligonukleotid eg5-öt kódoló mRNS RN-áz H által történő hasításának indukálására alkalmazható, amely csökkenti eg5-expressziót eredményez.

A találmány tárgyát képezi az oligonukleotid alkalmazása bipoláris mitotikus orsó kialakulásának gátlására, és ezáltal a sejtproliferáció, elsősorban tumornövekedés gátlására.

A találmány tárgyát képezi továbbá az oligonukleotid gyógyszerként történő alkalmazása, és az oligonukleotid alkalmazása gyógyászati készítmény előállítására. Az oligonukleotid előnyösen eg5 expressziójával kapcsolatos vagy eg5 expressziójának gátlásával gyógyítható betegség megelőzésére és/vagy kezelésére szolgáló gyógyászati készítményekben alkalmazható.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy gyógyászati készítmény, amely egy oligonukleotidot és/vagy fiziológiailag elfogadható sóját tartalmazza gyógyászatilag elfogadható hordozóanyagokkal és segédanyagokkal együtt.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy gyógyászati készítmény, amely legalább egy, találmány szerinti nukleotidot tartalmaz, amely eg5 expressziójának gátlásával gyógyítható betegség, például restenosis és rák, kezelésére alkalmazható.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy gyógyászati készítmény előállítására szolgáló eljárás, amely során egy vagy több, találmány szerinti oligonukleotidot fiziológiailag elfogadható hordozóanyagokkal és adott esetben további anyagokkal, például adott esetben alkalmas adalékanyagokkal és/vagy segédanyagokkal keverünk.

A találmány tárgyát képezi előnyösen az oligonukleotid vagy az oligonukleotidból előállított gyógyászati készítmény alkalmazása rák kezelésére, például tumornövekedés és tumormetasztázis gátlására. Az oligonukleotid vagy az oligonukleotidból előállított gyógyászati készítmény például szilárd tumorok, mint mellrák, tüdőrák, fej- vagy nyakrák, agydaganat, has-, vastagbélrák, colorectalis carcinoma, nyelőcsőrák, gyomor-bél-rák, gliatumor, májrák, nyelvrák, neuroblastoma, osteosarcoma, petefészekrák, hasnyálmirigyrák, prosztatatarák, retinoblastoma, Wilms-tumor, multiplex myeloma kezelésére alkalmazható, és bőrrák, például melanóma kezelésére, nyirokcsomótumorok és vérrák kezelésére alkalmazható. A találmány tárgyát képezi előnyösen

a találmány szerinti oligonukleotid vagy az oligonukleotidból előállított gyógyászati készítmény alkalmazása eg5 expressziójának gátlására és/vagy különböző rákoknál, például vérrák, tüdőrák, fejrák nyakrák, agydaganat, has-, vastagbélrák, colorectalis carcinoma, nyelőcsőrák, gyomor-bél-rák, gliatumor, májrák, nyelvrák, neuroblastoma, osteosarcoma, petefészekrák, hasnyálmirigyrák, prosztatarák, retinoblastoma, Wilms-tumor, multiplex myeloma, bőrrák, melanóma, nyirokcsomótumorok, vérrák, ascites és pleuraömleny felhalmozódásának gátlására. Az eg5 expressziójára gyakorolt gátló hatása miatt a találmány szerinti oligonukleotid, illetőleg az abból előállított gyógyászati készítmény javítja az életminőséget.

A találmány tárgyát képezi továbbá az oligonukleotid vagy az oligonukleotidból előállított gyógyászati készítmény alkalmazása például rák kezelésére vagy tumor-metasztázis gátlására más gyógyszerekkel és/vagy más terápiás gyógymódokkal együtt, például ismert gyógyszerekkel és/vagy ismert terápiás módszerekkel együtt, mint például amelyeket jelenleg rák kezelésére és/vagy tumormetasztázis megakadályozására alkalmaznak. Előnyös a sugárkezeléssel és kemoterápiás szerekkel, például cisplatinnal, ciklofoszfamiddal, 5-fluoruracillal, adriamycinnel, daunorubicinnel vagy damoxifennel alkotott konstrukció.

Az oligonukleotid és/vagy fiziológiailag elfogadható sója egy állatnak, előnyösen egy emlősnek és előnyösebben embernek egymagában, más oligonukleotiddal (vagy fiziológiailag elfogadható sójával) keverékben vagy egy gyógyásza-

ti készítmény formájában adagolható, amely topikálisan, perkután, parenterálisan vagy enterálisan alkalmazható, és amely aktív alkotórészként legalább egy oligonukleotid hatásos dózist tartalmazza a szokásos, gyógyászatilag elfogadható hordozóanyagokon és segédanyagokon kívül. Ilyen gyógyászati készítmény normál esetben körülbelül 0,1-90 súly%-ban tartalmazza a terápiásan aktív oligonukleotidot/oligonukleotidokat. Az adag széles sávban változhat, és minden esetben az egyedi körülményekhez kell igazítani. Pikkelysömör kezelésére topikális alkalmazás előnyös. Rák esetében infúzió, orális vagy rectalis adagolás előnyös, vagy aeroszol formájában történő nazális adagolás, előnyösen tüdőrák esetében, míg diabétikus retinopathia esetében topikális, intravitreális és orális adagolás előnyös.

A gyógyászati készítmény az ismert módokon állítható elő [pl. Remingtons Pharmaceutical Sciences, Mack Publ. Co., Easton, PA (1985)] gyógyászatilag inert, szervesetlen és/vagy szerves hordozóanyagok alkalmazásával. Laktóz, kukoricakeményítő és/vagy származékaik, talkum, sztearinsav és/vagy sóik, stb. alkalmazhatók például pirulák, tabletták, filmtabletták és kemény zselatinkapszulák előállítására. Lágy zselatinkapszulák és/vagy végbélkúpok hordozóanyagai például zsírok, viaszok, félkemény és folyékony poliolok, természetes és/vagy keményített olajok, stb. lehetnek, oldatok és/vagy szirupok előállításánál alkalmas hordozóanyagok például a víz, a szacharóz, az invertcukor, a glükóz, a poliol stb. Injekciós oldatok előállításához

alkalmas hordozóanyagok a víz, az alkohol, a glicerín, a poliolok, a növényi olajok, stb. Mikro kapszuláknál, implantátumoknál és/vagy pálcikáknál alkalmas hordozóanyagok a glikolsav és a tejsav kevert polimerei. Ezenkívül ismertek a liposzómakiszterelések, amelyekről a következőkben található leírás: Weiner, N., Drug Develop Ind. Pharm. 15, 1523 (1989); Liposome Dermatics, Springer Verlag (1992) és Hayashi, Gene Therapy 3, 878 (1996). A gyógyászati összeállítás olyan kiszterelést is magában foglalhat, amely az oligonukleotid orális felhasználhatóságát növeli, mint amelyek például a bélben történő felvétel javítására szolgáló anyagok, például mannit, urea, epesavak sói, mint CDCA ("chenodesoxycholate") (2%).

Bőrön történő kezelésnél lehetséges például iontoforetikus eljárások és/vagy elektroporáció alkalmazása. Ezen kívül lipofektin és más hordozórendszerek is alkalmazhatók, például amelyeket a génterápiában használnak. Előnyösek azok a rendszerek, amelyek nagy hatékonysággal alkalmazhatók oligonukleotidoknak eukarióta sejtekbe vagy eukarióta sejtek magjába történő bevitelére. A gyógyászati készítmény tartalmazhat két vagy több különböző oligonukleotidot és/vagy azok fiziológiailag elfogadható sóit, és a legalább egy oligonukleotidon kívül, egy vagy több különböző terápiás hatóanyagot is.

A hatóanyagokon és hordozóanyagokon kívül a gyógyászati készítmény adalékanyagokat is tartalmazhat, például töltőanyagokat, robbanóanyagot, kötőanyagot, síkosítóanyagot, hálósítóanyagot, stabilizátorokat, emulgeáló anya-

gokat, konzerváló anyagokat, édesítő anyagokat, szín-
anyagokat, ízanyagokat vagy aromákat, sűrűsítő anyagokat,
hígító anyagokat vagy pufferanyagokat tartalmazhat, vala-
mint oldószereket és/vagy oldódást elősegítő anyagokat
és/vagy késleltetett hatást elősegítő anyagokat és sókat az
ozmózisnyomás megváltoztatására, rétegező anyagokat és/vagy
antioxidánsokat.

1. példa

Oligonukleotid-szintézis

Az oligonukleotidokat (ON) *Applied Biosystems 394*
DNS-szintetizátorral (Perkin Elmer *Applied Biosystems*,
Inc., Foster City, USA) és hagyományos foszforamidit-
kémiaiával szintetizáltuk. Az összekapcsolás után Beaucage-
reagens alkalmazásával történő kénezéssel, majd azt követő-
en ecetsavanhidriddel és N-metil-imidazol történő lefedés-
sel foszforotioát-kötéseket vittünk be. A szilárd fázisról
történő lehasítás, majd a védőcsoportok koncentrált ammóni-
ás kezeléssel történő eltávolítása után az oligo-
nukleotidokat poliakrilamid-gélelektroforézissel tisztítot-
tuk. A módosított 2'-O-metil-oligonukleotidokat oly módon
állítottuk elő, hogy a hagyományos foszforamiditet a megfe-
lelő ciklusban 2'-O-metil-ribonukleozid-foszforamiditre
cseréltük. Minden oligonukleotidot elektropermet-tömeg-
spektrográfiával negatív ionokkal vizsgáltunk (*Fisons Bio-*
Q), amelyek minden esetben igazolták a számított tömeget. A
C16-módosított oligonukleotidokat a hagyományos amiditek
helyett foszfitiláló reagensként hexadeciloxi-(cianoetoxi)-
N,N-diizopropil-aminofoszfán alkalmazásával szintetizáltuk

az oligonukleotid-szintézis utolsó lépésében, vagy egy megfelelő származékot képezett szilárd fázisról leválasztva szintetizáltuk. A trietilén-glikol-kapcsoló Glen Research Corporation forgalmazásában kapható. Az adenzin és Cordycepin 2'-foszforamiditjét Chem. Genes Corporation-tól, illetőleg Chemogen Corporation-tól szereztük be. Az 5'-foszfát vagy tiofoszfát-csoportokat az előzőekben ismertetettek szerint állítottuk elő [Uhlmann és Engels, Tetrahedron Lett. 27, 1023 (1986)]. A PNS-DNS-kimérákat az EP 0672677 számú európai közzétételi iratban leírtak szerint állítottuk elő.

Az oligonukleotidokat a következők segítségével vizsgáltuk:

- a) analitikai gélelektroforézis 20%-os akrilamidban, 8 M karbamidban, 45 μ M Tris-borát-pufferben, pH 7,0 és/vagy
- b) HPLC-vizsgálat: *Waters GenPak Fax* oszlop, Gradients CH_3CN (400 ml), víz (1,6 l), NaH_2PO_4 (3,1 g), NaCl (11,7 g), pH 6,8 (0,1 M NaCl-nál) a következő után: CH_3CN (400 ml), víz (1,6 l), NaH_2PO_4 (3,1 g), NaCl (17,53 g), pH 6,8 (1,5 M NaCl-nál) és/vagy
- c) kapilláris elektroforézis *Beckmann eCAPTM*, U100P géلكapilláris-oszloppal, 65 cm hosszú, 100 μ m belső átmérőjű, ahol az ablak az egyik végétől 15 cm-re található, puffer 140 μ M Tris, 360 mM borát, 7 M karbamid és/vagy
- d) elektropermet-tömegspektrográfia negatív ionokkal, amelyek minden esetben igazolták a várt tömeget.

Az oligonukleotidok vizsgálatára szolgáló, a), b), c) és d) pontok szerinti eljárások szakember számára ismertek. Ezek az eljárásokat például Schweitzer és Engels ismertetik [Schweitzer és Engels, "Analysis of oligonucleotides", Antisense - from technology to therapy, laboratóriumi kézikönyv és tankönyv, szerk.: Schlingensiepen és mtsai., Hrsg., Biol. Science, 6. kötet, 78-103 (1997)].

A következő oligonukleotidokat állítottuk elő (lásd leírás) és vizsgáltuk:

ON1: 3'-C*T*T*A A G G C*A G T*A C*C G*C A G*C (K3)

10. azonosítószámú szekvencia

ON2: 3'-A*C*C*A C*T C*T A C*G T*C*T G G*T A*A (K4)

11. azonosítószámú szekvencia

ON3: 3'-A*A*G*A G*T C*A C*T C*T C*C*T A G G*C (K5)

12. azonosítószámú szekvencia

ON4: 3'-C*T*T*A A G G C*A G T*A C*C G*C A G*C-FITC-5'

(K6) 10. azonosítószámú szekvencia

ON5: 3'-G*G*C A G*T A C*C G*C A G C*G 22. azonosító-

számú szekvencia

ON6: 3'-C*T*T*A A G G*C A G*T*A 13. azonosítószámú

szekvencia

ON7: 3'-T*A*A G G C*A G*T A*C*C 14. azonosítószámú

szekvencia

ON8: 3'-G*G*C A G*T A C*C*G C*A 15. azonosítószámú

szekvencia

ON9: 3'-C*A*G*T A C*C G*C A G*C 23. azonosítószámú

szekvencia

ON10: 3'-A*G*T A C*C G*C A G*C*G 16. azonosítószámú
szekvencia

ON11: 3'-C*C*G*C A G*C G T*C G*G 17. azonosítószámú
szekvencia

ON12: 3'-G*C*A G C*G T* C G G*T*T 18. azonosítószámú
szekvencia

ON13: 3'-A*A*G*A G*T C*A C*T C*T C*C*T A G G*C-Flu-5'
(v.ö.: 1) → 19. azonosítószámú szekvencia

ON14: 3'-G*G*C*A G*T A C*C G C*A G*C G T*C G*G 12.
azonosítószámú szekvencia

ON15: 3'-C*T*T*A A G G*C A G*T*A-FITC 13. azonosító-
számú szekvencia

ahol

"*" foszforotioát-internukleozid-hidat

és FITC fluoreszcens markert jelent.

Az ON1-ON12 oligonukleotidok REH-leukémiasejtek szaporodását gátló hatását egy sejtes vizsgálati eljárással teszteltük. Az ON1-, ON2-, ON64-ON71-oligonukleotidok antiszensz-oligonukleotidok, amelyek az eg5-mRNS transzlációs startszakaszával ellentétes irányúak. Az ON4 az ON1 5'-fluoreszcens markerrel jelölt analógja. Az ON3 egy referencia oligonukleotid.

A szaporodási gátlás vizsgálatának eredményét az 1. ábrán mutatjuk be.

2. példa

Az antiszensz eg5-oligonukleotidok szaporodást gátló hatásának meghatározása

REH-sejteket (humán pre-B-leukémiasejtek, DSM ACC 22), illetőleg A549-tumorsejteket tenyésztettünk *OptiMEM*-ben (Gibco BRL) 10% magzati borjúsérummal (FCS, GIBCO-BRL) 37°C-on, 5% CO₂-légkörben. A vizsgálatnál a sejtsűrűség körülbelül 1×10^6 /ml. Az oligonukleotidokat (0,17 mM) a komplexképzéshez Cellfectinnel kevertük (0,83 mg/ml, Gibco-BRL), hogy a sejtekbe történő felvételt elősegítsük. A sejteket és az oligonukleotid/Cellfectin-komplexet szérum nélkül inkubáltuk 4 órán keresztül, 24-lyukas lemezekben. Az oligonukleotid/Cellfectin-komplexet azután eltávolítottuk, és szérumot adtunk hozzá 10% végkoncentrációban. A 96 órás, 37°C-on, 5% CO₂-légkörben történő inkubációt követően a sejtsűrűséget Casy 1-gyel mértük („Fa.Schärfe”). A sejteket előtte minden egyes lyukban alaposan összekevertük, és azonnal 1:100 arányban Casitonnal hígítottuk. A sejtsűrűség középértékét egyazon oligonukleotid-koncentrációjú, három egyedi lyukból határoztuk meg. A szaporodásgátló hatás eredményét az 1. ábrán mutatjuk be.

1. táblázat: Humán eg5 nukleotidszekvenciája (20. azonosítószámú szekvencia

1	GAATTCGTC ATGGCGTCG AGCCAAATTC GTCTGCGAAG AAGAAAGAGG
51	AGAAGGGGAA GAACATCCAG GTGGTGGTGA GATGCAGACC ATTTAATTTG
101	GCAGAGCGGA AAGCTAGCGC CCATTCAATA GTAGAATGTG ATCCTGTACG
151	AAAAGAAGTT AGTGTCGAA CTGGAGGATT GGCTGACAAG AGCTCAAGGA
201	AAACATACAC TTTTGATATG GTGTTTGGAG CATCTACTAA ACAGATTGAT
251	GTTTACCGAA GTGTTGTTTG TCCAATTCTG GATGAAGTTA TTATGGGCTA
301	TAATTGCACT ATCTTTGCGT ATGGCCAAAC TGGCACTGGA AAAACTTTTA
351	CAATGGAAGG TGAAAGGTCA CCTAATGAAG AGTATACCTG GGAAGAGGAT

401 CCCTTGGCTG GTATAATTCC ACGTACCCTT CATCAAATTT TTGAGAAACT
 451 TACTGATAAT GGTACTGAAT TTTCAGTCAA AGTGTCTCTG TTGGAGATCT
 501 ATAATGAAGA GCTTTTGTGAT CTTCTTAATC CATCATCTGA TGTTTCTGAG
 551 AGACTACAGA TGTTTGATGA TCCCCGTAAC AAGAGAGGAG TGATAATTAA
 601 AGGTTTAGAA GAAATTACAG TACACAACAA GGATGAAGTC TATCAAATTT
 651 TAGAAAAGGG GGCAGCAAAA AGGACAACCTG CAGCTACTCT GATGAATGCA
 701 TACTCTAGTC GTTCCCACTC AGTTTTCTCT GTTACAATAC ATATGAAAGA
 751 AACTACGATT GATGGAGAAG AGCTTGTTAA AATCGGAAAG TTGAACTTGG
 801 TTGATCTTGC AGGAAGTGAA AACATTGGCC GTTCTGGAGC TGTTGATAAG
 851 AGAGCTCGGG AAGCTGGAAA TATAAATCAA TCCCTGTTGA CTTTGGGAAG
 901 GGTCATTACT GCCCTTGTAG AAAGAACACC TCATGTTTCT TATCGAGAAT
 951 CTAAACTAAC TAGAATCCTC CAGGATTCTC TTGGAGGGCG TACAAGAACA
 1001 TCTATAATTG CAACAATTC TCTGCATCT CTCAATCTTG AGGAAACTCT
 1051 GAGTACATTG GAATATGCTC ATAGAGCAAA GAACATATTG AATAAGCCTG
 1101 AAGTGAATCA GAAACTCACC AAAAAAGCTC TTATTAAGGA GTATACGGAG
 1151 GAGATAGAAC GTTTAAAACG AGATCTTGCT GCAGCCCGTG AGAAAAATGG
 1201 AGTGTATATT TCTGAAGAAA ATTTTAGAGT CATGAGTGGA AAATTAAGTG
 1251 TTCAAGAAGA GCAGATTGTA GAATTGATTG AAAAAATTGG TGCTGTTGAG
 1301 GAGGAGCTGA ATAGGGTTAC AGAGTTGTTT ATGGATAATA AAAATGAACT
 1351 TGACCAGTGT AAATCTGACC TGCAAAATAA AACACAAGAA CTTGAAACCA
 1401 CTCAAAAACA TTTGCAAGAA ACTAAATTAC AACTTGTTAA AGAAGAATAT
 1451 ATCACATCAG CTTTGGAAG TACTGAGGAG AAACCTCATG ATGCTGCCAG
 1501 CAAGCTGCTT AACACAGTTG AAGAACTAC AAAAGATGTA TCTGGTCTCC
 1551 ATTCCAACT GGATCGTAAG AAGGCAGTTG ACCAACACAA TGCAGAAGCT
 1601 CAGGATATTT TTGGCAAAAA CCTGAATAGT CTGTTTAATA ATATGGAAGA
 1651 ATTAATTAAG GATGGCAGCT CAAAGCAAAA GGCCATGCTA GAAGTACATA
 1701 AGACCTTATT TGGTAATCTG CTGTCTTCCA GTGTCTCTGC ATTAGATACC
 1751 ATTACTACAG TAGCACTTGG ATCTCTCACA TCTATTCCAG AAAATGTGTC
 1801 TACTCATGTT TCTCAGATTT TTAATATGAT ACTAAAAGAA CAATCATTAG
 1851 CAGCAGAAAG TAAACTGTA CTACAGGAAT TGATTAATGT ACTCAAGACT
 1901 GATCTTCTAA GTTCACTGGA AATGATTTTA TCCCCAAGTG TGGTGTCTAT
 1951 ACTGAAAATC AATAGTCAAC TAAAGCATAT TTTCAAGACT TCATTGACAG
 2001 TGGCCGATAA GATAGAAGAT CAAAAAAGAA GGAAGTCAGA TGGCTTTCTC
 2051 AGTATACTGT GTAACAATCT ACATGAACTA CAAGAAAATA CCATTTGTTC

2101 CTTGGTTGAG TCACAAAAGC AATGTGGAAA CCTAACTGAA GACCTGAAGA
 2151 CAATAAAGCA GACCCATTCC CAGGAACTTT GCAAGTTAAT GAATCTTTGG
 2201 ACAGAGAGAT TCTGTGCTTT GGAGGAAAAG TGTGAAAATA TACAGAAACC
 2251 ACTTAGTAGT GTCCAGGAAA ATATACAGCA GAAATCTAAG GATATAGTCA
 2301 ACAAATGAC TTTTCACAGT CAAAAATTTT GTGCTGATTC TGATGGCTTC
 2351 TCACAGGAAC TCAGAAATTT TAACCAAGAA GGTACAAAAT TGGTTGAAGA
 2401 ATCTGTGAAA CACTCTGATA AACTCAATGG CAACCTGGAA AAAATATCTC
 2451 AAGAGACTGA ACAGAGATGT GAATCTCTGA ACACAAGAAC AGTTTATTTT
 2501 TCTGAACAGT GGGTATCTTC CTTAAATGAA AGGGAACAGG AACTTCACAA
 2551 CTTATTGGAG GTTGTAAAGCC AATGTTGTGA GGCTTCAAGT TCAGACATCA
 2601 CTGAGAAATC AGATGGACGT AAGGCAGCTC ATGAGAAACA GCATAACATT
 2651 TTTCTTGATC AGATGACTAT TGATGAAGAT AAATTGATAG CACAAAATCT
 2701 AGAACTTAAT GAAACCATAA AAATTGGTTT GACTAAGCTT AATTGCTTTC
 2751 TGGAACAGGA TCTGAACTG GATATCCCAA CAGGTACGAC ACCACAGAGG
 2801 AAAAGTTATT TATACCCATC AACACTGGTA AGAACTGAAC CACGTGAACA
 2851 TCTCCTTGAT CAGCTGAAAA GGAAACAGCC TGAGCTGTTA ATGATGCTAA
 2901 ACTGTTTCTGAA AAACAACAAA GAAGAGACAA TTCCGGATGT GGATGTAGAA
 2951 GAGGCAGTTC TGGGGCAGTA TACTGAAGAA CCTCTAAGTC AAGAGCCATC
 3001 TGATAGTGCT GGTGTGGATT GTTCATCAAT TGGCGGGGTT CCATTTTTC
 3051 AGCATAAAAA ATCACATGGA AAAGACAAAG AAAACAGAGG CATTAAACACA
 3101 CTGGAGAGGT CTAAAGTGA AGAACTACA GAGCACTTGG TTACAAAGAG
 3151 CAGATTACCT CTGCGAGCCC AGATCAACCT TTAATTCATC TGGGGGTTGG
 3201 CAATTTTATT TTTAAAGAAA AACTTAAAAA TAAACCTGA AACCCAGAA
 3251 CTTGAGCCTT GTGTATAGAT TTTAAAGAAA TATATATATC AGCCGGGCGC
 3301 GTGGCTCTAG CTGTAATCCC AGCTAACTTT GGAGGCTGAG GCGGGTGGAT
 3351 TGCTTGAGCC CAGGAGTTTG AGACCAGCCT GGCCAACGTG CGCTAAAACC
 3401 TTCGTCTCTG TTAATAATTA GCCGGGCGTG GTGGGCACAC TCCTGTAATC
 3451 CCAGCTACTG GGGAGGCTGA GGCACGAGAA TCACTTGAAC CCAGAAGCGG
 3501 GGTGTCAGTG AGCCAAAGGT ACACCACTAC ACTCCAGCCT GGGCAACAGA
 3551 GCAAGACTCG GTCTCAAAAA TAAATTTAA AAAAGATATA AGGCAGTACT
 3601 GTAAATTCAG TTGAATTTTG ATATCTACCC ATTTTCTGT CATCCCTATA
 3651 GTTCACTTTG TATTAAATTG GGTTCATTT GGGATTGCA ATGTAAATAC
 3701 GTATTTCTAG TTTTCATATA AAGTAGTTCT TTAGGAATT C

2. táblázat: 21. azonosítószámú szekvencia, *P. falciparum* szekvenciája (részszekvencia, Genbank Z98551 nyilvántartási szám)

5'
TTTTTTTTTTTTTATTCCTTGGATGTTCTTGGTAGTTTAAATTTTTTATTTTTGTAGTTTTCT
TTCTTTTATACGTTTTAAAGCAGGGGATGCCTTTTTAGGAAATGCCCTATTTTCAATAGCTT
TAATTTTTGTAGATTGAAATTTATTATTATTATTATTATTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG
TTGTTGTTGTTATTATTGAATAATTATTGTTATATGAACATTTTGAACATTTATATTTCT
CTTTCTTTCATATTCTTTTAACTTGTTACACTCATATTTTCTGTATTTACATCAAATCTTT
TATTATGTTGATTGTTATTTAAATAATTTAATCTTGATATGTTTCATCTATTGGTTGTATA
GGATTATCCGTTGTATTCTTATTATATAGCATATATTCATTTAAGGGTAGATTATTGTGATT
AGTTTTTACATTTAATTTATTTTTATCACCTTTATTATTATATTATGAGGTATACTACTAT
TCGTTGTATGATCATTTAACTATTGTAACGAGAGTAATTATTTTCATGCGCTACAATTTTA
TCATCTTGAATAAGAAATGGAAGTTTTTCATCGATTTGTTCAAATACTTTACTTAAATCTAT
ATCATGTGTTGTTGTAATTTGTTCTATCTTTTCATCAAGGTATTTTTAACTTCCAAGTATA
AATTTTGTCTTATGATATCATCATTATAAAGATAATAATTATGATGATCACCTTGATCTATT
TTATTATCATCATTATAAAGATAATAATTATGATGATCACCTTGATCCATTTTATTATCATC
ATTATAAAGATAATTATTATGATCATGACCTTGATCCATTTTATTATCATCATTATAAAGAT
AATTATTATGATCATGACCTTGATCCATTTTATTATCATCATTATAAAGATAATTATTATGA
TCATGACCTTGATCCATTTTATTATCATCATAATTATTATTGTCACCATTTTTATTATTGTC
ATGATCATTTTTTATTATTGTCACCATTTTTATTATTATCATGATTATTTTTATTATTATCAT
GATTATTTTTTATTATTATCATGATTATTTTTATTATTATCATCATTTTTTATTATTATCATAA
TTCGTGTCGTAAGTCGAATCCCTATTTAGTGATGTGATTTTCATCGGAGTAAACATATCTAT
GACATTCACAAACGTTTCCCTTATCCTTTGTACATCATCCTTTTATATTTAGATAAAATTCAT
CATCCATATTTTCCATGAGATCATAACTTGATGTACTTGGAATGTCTTGTAAGTAATCTTTT
TTTTTTAATATATCTATTAATTCTGCTATATACATATTACATTTGTTTAAATTTTGTTCAAA
TATATTATTAAAAAGTTTTATATTTTCATTAGACTTTAACATATGTATACGACGTCCTTCTT
TTTGTTCTTGTTGATTCTTTATTTTTATTTTGTAATAATCTTTTCAGATATAACGTTATATAAC
TTTCGTTTCTCTATTTTGTTTATATTAGTTTGACTTGTAAGTTATTTATGATTTTATCAAT
ATTTAGATTATTTGTATATAATAAATTATTATAAATATTTAAAGTATCATTTAAACATTTGC
TGTGTTCTTTTCTTCAATATAACTTTTTCTTTTTAAATAAGATAATATGTTATATAAAACA
GTATGATAATTTGTTATCTTCCTTTTAAATATCATTATTAATATTATTATATTCCTTTTCATC
ATTAATATTGCATTCAGAAAAATGTTGTATAGTATCATCTATCTTTTTTACAGAATTCATAA
AAACAGATTTATAATTTTTTTTTTGACTTATCATATAATTCTTTATTTAATAAATCGAACTTG
TTATTCATTTTTTTCATAAATATCTTCACATTTTTATTATAAGTAATTCAATATCTTTCAA
AATATTTTCTTTAAATCTTGTTATATCTTCATTTATCATTTTTTTTATAAATTATTAATTATAA
TATTATCCTCCTTTTCAAAAACATCATATTTTTTATAAATATATTCAATGTTGTCATTCATA
ATCTTCTTGTCCTTATCCCAATGTATATATTTTTTCATGACATTTTTTTTTCTAGTAACATAAA

TGATTCGTTTAAAAAATATGAAATATATTACATATACTTTTAATATATTGTATTAATGATT
TTGCATTATATAACTTTTTTTCAGATTCGTGATTATCTAAA'TTTGTATAATATCTTCACCT
TGTCTATTTAATAATAAATCTTTTATAAATCTTTATTCTCAGGATAATTAAATGATTCCTC
TATATGGTCAAATGGCATCTCATTATTTTCTTCTTTACCATATTGTTTTTGACATGTTTTTC
CTTCACCATTTTGTTTTTTCACATATTATTCCTTCACCGTTTTGTTTTTTCACATATTATCTCG
TCACCGTTTTGTTTTTTCACATATTATCTTTTCACCACTTTGTTTTTTCACATATTATCTCTTC
ACCGTTTTGTTTTTTCACATATTATCTTTTCACCACTTTGTTTTTTCACATATTATCTTTTCAC
CACTTTGTTTTTTCACATATTATCTTTTCACCACTTTGTTTTTCTTTTTTTAATCCGTTTGTA
TTATATACACCAATAATTGCTGGCATTCTCTGCTTGGCTTCATCACTTATATGTGGTATGTT
TATTTTACATTGTGATATTTCTTTTTAATATTTTCGGAGAGAGAAAAGTAATCATGATCAT
ATTTTTGTAAATATCCATATGGTCCAGTATAAAATTCAGAGTATCATTATATTTAAATTA
ATGTTACTATTGAGTTCTTCAAATGGTTAATATAATCATGTATGATTTTTTATTTTGTAC
TAGATAATTTTTGGTATCATCTAAAATGAATAAGATGGTTTTACATATATCGTTTAAAAGAT
GATTTTCTTGATGAATATTTTTTTTTTATATTTAATAGATTATCATGCATTATATTAGACATA
TTTGTTTTAATTTGTTGAAAAGATTTTTTTTGATTATATAAAATTTTCTTCTAAAGAATGATA
TTTATTTAATAAGAATTGTGTAATATATTTTTCTTCTATTATTTTTTTAATTAATATTTGAT
GAAATGCTTGTATATTTTTTATATTTTTGAATAGTATCTTTTAAAAGAAAAATATTTTATTT
TGTAGATCATCTGTATTATCCATTTTATTTAATAAAATTTTTTATTTTTTTACTTTTTTCAA
TAAATTTTTTCTTTTTCTAATAATATTTCTTTATTTTTCTTTAGACTATTTTGTATATTAT
TATATTCTTCTGTATCAAGATAAACACCTCTCTTTTCTCTGCTTAAATTCAGTGCATTTCTT
AACTTTTCGATTTCAATTATTTAAATCCTTTATTTTTAATTGTTTCGTTGTTTTTATATTTAT
CTCGGGTCTATTCTTAATATTCTTAGCTCGAAAGACATAATCTAAAGTGCTTAAAGTCTCAT
CAATACATAAAGAGGAGGGTGATATAGTGGCGACAATAAAAGTCTTCGTTTTCCACCTAAC
GAATCTTGTAATAATCTGGTTAATTTAGAATCTCTGTAAGGAATATAAGATGAATTCTCAAT
CAACGAATTAATAACTCTACCTAAGGTTAATAAAGATTGATTTATATTACAACCTTTCTTGTT
GTCTAATTTTTTAAAGAACCATAAGAGCTTTTCAAAGCATTTTCACTACCCGCTAAATCAACT
AAATTTAATTTTCCTATTTTTGTTATACTTTCTCCTACATTATTTATATCTTTTATAATTAA
TGTTATAGTAAAAATCGAATGACTTCTACTCGATTTTTTATTATAAGCCGTTTCAGCTGTCC
TTCTTTTTTTAATAGCTGAACATATAATATAATATATTTCTTCAAAGAATTAATACTTTTT
TCTTCTAACTTATCAACATTTAATCCTTTACTTTTATTATTACTATCTTCATATATTCTGAAG
TTTCATATTTTTCATTTGTTGAACTTAATAAATCACATAATTCTTCATTATATATTTCTAGAT
AGCTAATTTTTTATATTAAAATCGTACATATTCTTATCATCAAATGTTTGATACATATCATTA
TTCCTATTTTTATCTACACTACATTTTTGTACAACATCACAAGTAATATCTCTACTCTTTTC
GTTAACTAACAAATGTTAGGTTCTTTATTAATTTTTTAAATTATTATAAATATCATTTTTAT
CAATATTTATTTTGTTACATAATAAATTATTATAATTATTATTAATAATATTATTATTGTTA
CCATTAGTTTCCTTATTTATTACATTTATATGTTTCGTTATCCTTTTCATCAAATATATTCTT
TTTTCTTTTAAATGTGCAATCTTTTCTTCTTCTTTTATTTAATATATCGAATATTCTTT
TCGTAACCTCGAAATATAAGTCCAGTATCCTCATCTCACAAAGTTCATAGCAATAGCTGATG

TCGCTATTAATACTTTTCATTCAAATCCACCTTTTTATTATTATCATATTGTTTCAGGTGTTTC
 TAGTATTTTCCC'TTCCATAGTATAGGTCTTACCCGTCCCGGTCTGTCCATAGCAGAACAGCG
 TACAATTGAATCCTTGCAAAACCTGAAGCGGCGAACAAAAAATATAT
 ATATATATGTACATGTATATTTATATGTATATGTATATATATATGTATAGTTATATGTATTT
 TTATTTTTATTTTTATTTTTATATTTATTTTTATTTTTATTTTTATTTTTATTTTTATATTT
 ATTTTTATTTTTATATTTATATTTATATATGTGTAAAATTAACATGGGGAGCAAAGAATTTTC
 CCATATATTTTTTTTTTTTAATCTATTTAATAAAACATTATTATGATATACGCAGAGGTGAT
 ATATACATGGTATTTATTTATTTTTTTTTTATATATTTTTTCAT
 TTGTTTCGTAGGAATATTCTTTTTTTTTCTGCACATATATTTCACTATCCATATAATATCAT
 AATACATCATGGAATAATTTATATATATATATATATATATATGTATATTTTATTTTTACCTCAT
 CTACTATTTGGTAAATATAATTATTGAACAAAGTTTTCTGATCCACATCTTTATCACATGCA
 TAATCAAACTATATTTTTTTTCGTATATTTTCATTGTTTCTATTAATTGTTAATATAACCTC
 ATTATTATTAATTGAACTACCTCTTCATTATTTATATCGTTTTTTCTTTTTTCATTTAATG
 GTCTACACCTTACGATAACTTTTATATTTACGCAACTTGATTTATCATTATTATAAGAATTT
 CTGAGCATTTTACTTTTATTCAAATAAT

3. táblázat: Szekvenciahomológia: Humán eg5-szekven-
cia összehasonlítása Plasmodium falciparum eg5-szekven-
ciájával

	1	60
human. SEQ	GAATTCGTCAT.....GGCGTC....GCAGCC.AAATTC...GTCTGCGAAGAAG	
PLASMO. SEQ	TTTTTTTTTTTTTATTCCTTGGATGTTCTTGGTAGTTTAAATTTTTTATTTTTGTAGTTT	
	61	120
human. SEQ	AAAGA....GGAGAAGGGGAAGAACATCCAGGTGGTGGTGAGATGCAGACC	
PLASMO. SEQ	TCTTCTTTTATACGTTTTAAAGCAGGGGATGCCTTTTAGGAAATGCCCTATTTTCAATA	
	121	180
human. SEQ	A. TTTAATTTGGCAGAGCGGAAAGCTAGCGCCCAT. TCAATAGTAGAATGTGATCCTGTA	
PLASMO. SEQ	GCTTTAATTTTTGTAGATTGAAATTTATTATTATTATTATTATTGT. TGTTGTTGTT	
	181	240
human. SEQ	CGAAAAGAAGTTAGTGT. ACGAACTGGAGGATTGGCTG. .ACAAGAGCTCAAGGAAACA	
PLASMO. SEQ	GTTGTTGTTGTTGTTGTTATTATTGAATAATTATTGTTATATGAACATTTTGAACATT	
	241	300
human. SEQ	TACACTTTTGAT.....ATGGTGTITGGAGC.....ATCTACTAAAC..AG	
PLASMO. SEQ	TATATTTCTCTTTCTTTCAATCTTTTAAACTTGTTTACACTCATATTTTCTGTATTTAC	
	301	360
human. SEQ	ATTGA..TGTTTACCG....AAGTGTGTTTG....TCCAATCTGGATGAAGTT. AT.	
PLASMO. SEQ	ATCAAATCTTTTATTATGTTGATTGTTATTTAATAATTAAATCTTGATATGTTTCATC	

```

          361
human.SEQ  TATGGGCTATA....ATTGCAC....TATCTTTC.GTATGGC.CAACT.....GG
PLASMO.SEQ TATTGGTTGTATAGGATTATCCGTGTATTCTTATTATATAGCATATATTCATTTAAGGG
          421
human.SEQ  CA.....CTG.GAAAACTTTTACAATGGA...AGGTGAAAGGTC.....ACCTA....
PLASMO.SEQ TAGATTATTGTGATTAGTTTTTACATTTAATTTATTTTATCACCTTTATTATTTATATT
          480

```

1. ábra: Az 1. és 2. példák eredményeit foglaljuk össze. Az ON1-ON12-oligonukleotidok (antiszensz eg5-oligonukleotidok) REH-sejtek szaporodására gyakorolt gátló hatását mutatja be (százalékban)

1. kísérlet

2. kísérlet

CF: Cellfectin-összehasonlítás

SZEKVENCIALISTA

(210)	1	
(211)	19	
(212)	DNS	
(213)	<i>mesterséges szekvencia</i>	
(220)		
(223)	A mesterséges szekvencia leírása: antiszensz oligonukleotid	
(220)		
(221)	kevert sajáttság	
(222)	(1)...(19)	
(400)	1	
cgacgccatg acggaattc		19
(210)	2	
(211)	19	
(212)	DNS	
(213)	<i>mesterséges szekvencia</i>	
(220)		
(223)	A mesterséges szekvencia leírása: antiszensz oligonukleotid	
(220)		
(221)	kevert sajáttság	
(222)	(1)...(19)	

(400) 2

aatggctctgc atctcacca

19

(210) 3

(211) 19

(212) DNS

(213) *mesterséges szekvencia*

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: antiszensz
oligonukleotid

(220)

(221) kevert sajátság

(222) (1)...(19)

(400) 3

ggctgcgacg ccatgacgg

19

(210) 4

(211) 12

(212) DNS

(213) *mesterséges szekvencia*

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: antiszensz
oligonukleotid

(220)

(221) kevert sajátság

(222) (1)...(12)

(400) 4

atgacggaat tc 12

(210) 5

(211) 12

(212) DNS

(213) *mesterséges szekvencia*

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: antiszensz
oligonukleotid

(220)

(221) kevert sajáttság

(222) (1)...(12)

(400) 5

ccatgacgga at 12

(210) 6

(211) 12

(212) DNS

(213) *mesterséges szekvencia*

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: antiszensz
oligonukleotid

(220)

(221) kevert sajáttság

(222) (1)...(12)

(400) 6

acgccatgac gg

12

(210) 7

(211) 12

(212) DNS

(213) *mesterséges szekvencia*

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: antiszensz
oligonukleotid

(220)

(221) kevert sajáttság

(222) (1)...(12)

(400) 7

gcgacgccat ga

12

(210) 8

(211) 12

(212) DNS

(213) *mesterséges szekvencia*

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: antiszensz
oligonukleotid

(220)

(221) kevert sajáttság

(222) (1)...(12)

(400) 8

ggctgcgacg cc

12

(210) 9

(211) 12

(212) DNS

(213) *mesterséges szekvencia*

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: antiszensz
oligonukleotid

(220)

(221) kevert sajáttság

(222) (1)...(12)

(400) 9

ttggctgcga cg

12

- (210) 10
(211) 19
(212) DNS
(213) *mesterséges szekvencia*
- (220)
(223) A mesterséges szekvencia leírása: antiszensz
oligonukleotid
(220)
(221) kevert sajáttság
(222) (1)...(19)
- (400) 10

cgacgccatg acggaattc

19

- (210) 11
(211) 19
(212) DNS
(213) *mesterséges szekvencia*
- (220)
(223) A mesterséges szekvencia leírása: antiszensz
oligonukleotid
(220)
(221) kevert sajáttság
(222) (1)...(19)

(400) 11

aatggtctgc atctcacca

19

(210) 12

(211) 19

(212) DNS

(213) *mesterséges szekvencia*

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: antiszensz
oligonukleotid

(220)

(221) kevert sajáttság

(222) (1)...(19)

(400) 12

ggctgcgacg ccatgacgg

19

(210) 13

(211) 12

(212) DNS

(213) *mesterséges szekvencia*

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: antiszensz
oligonukleotid

(220)

(221) kevert sajáttság

(222) (1)...(12)

(400) 13

atgacggaat tc

12

(210) 14

(211) 12

(212) DNS

(213) mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: antiszensz
oligonukleotid

(220)

(221) kevert sajáttság

(222) (1)...(12)

(400) 14

ccatgacgga at

12

(210) 15

(211) 12

(212) DNS

(213) mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: antiszensz
oligonukleotid

(220)

(221) kevert sajáttság

(222) (1)...(12)

(400) 15

acgccatgac gg 12

(210) 16

(211) 12

(212) DNS

(213) *mesterséges szekvencia*

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: antiszensz
oligonukleotid

(220)

(221) kevert sajáttság

(222) (1)...(12)

(400) 16

gcgacgccat ga 12

(210) 17

(211) 12

(212) DNS

(213) *mesterséges szekvencia*

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: antiszensz
oligonukleotid

(220)

(221) kevert sajáttság

(222) (1)...(12)

(400) 17

ggctgcgacg cc

12

(210) 18

(211) 12

(212) DNS

(213) *mesterséges szekvencia*

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: antiszensz
oligonukleotid

(220)

(221) kevert sajáttság

(222) (1)...(12)

(400) 18

ttggctgcga cg

12

(210) 19

(211) 3784

(212) DNS

(213) *homo sapiens*

(400) 19

gaattccgtc atggcgctgc agccaaattc gtctgcgaag aagaaagagg agaaggggaa 60
 gaacatccag gtggtggtga gatgcagacc atttaatttg 0gcagagcgg aaagctagcg 120
 cccattcaat agtagaatgt gatcctgtac gaaaagaagt tagtgtagca actggaggat 180
 tggctgacaa gagctcaagg a0aaacatac acttttgata tgggtgttg agcatctact 240
 aaacagattg atgtttaccg aagtgttgtt tgtccaattc tggatgaagt tattatgggc 300

 ta0taattgc actatctttg cgtatggcca aactggcact ggaaaaactt ttacaatgga 360
 aggtgaaagg tcacctaattg aagagtatac ctgggaagag gat0cccttg gctggtataa 420
 ttccacgtac ccttcatcaa atttttgaga aacttactga taatggtact gaattttcag 480
 tcaaagtgtc tctgttgagg atct0ataat gaagagcttt ttgatcttct taatccatca 540
 tctgatgttt ctgagagact acagatgttt gatgatcccc gtaacaagag aggagtata 600
 attaa0aggt ttagaagaaa ttacagtaca caacaaggat gaagtctatc aaattttaga 660
 aaagggggca gcaaaaagga caactgcagc tactctgatg aatgca0tac tctagtcggt 720
 cccactcagt tttctctgtt acaatacata tgaaagaaac tacgattgat ggagaagagc 780
 ttgttaaaat cggaaagttg aacttgg0tt gatcttgagc gaagtgaaaa cattggccgt 840
 tctggagctg ttgataagag agctcgggaa gctggaaata taaatcaatc cctgttgact 900
 ttgggaag0g gtcattactg cccttgtaga aagaacacct catgttcctt atcgagaatc 960
 taaactaact agaatcctcc aggattctct tggagggcgt acaagaaca0 0tctataatt 1020
 gcaacaattt ctctgcac tctcaatctt gaggaaactc t0aggtacat tggaatatgc 1080
 tcatagagca aagaacatat tgaataagcc tg0aagtga tcagaaactc accaaaaaag 1140
 ctcttattaa ggagtatacg gaggagatag aacgttttaa acgagatctt gctgcagccc 1200
 gtgagaaaaa tgg0agtgta tatttctgaa gaaaatttta ggtcatgag tggaaaatta 1260
 actgttcaag aagagcagat tgtagaattg attgaaaaaa ttggtgctgt tgag0gagga 1320
 gctgaatagg gttacagagt tgtttatgga taataaaaaat gaacttgacc agtgtaaatc 1380
 tgacctgcaa aataaaacac aagaacttga aacca0ctca aaaacatttg caagaaacta 1440
 aattacaact tgttaaagaa gaatatatca catcagcttt ggaaagtact gaggagaaac 1500
 ttcatgatgc tgccag0caa gctgcttaac acagttgaag aaactacaaa agatgtatct 1560
 ggtctccatt ccaaactgga tcgtaagaag gcagttgacc aacacaatgc agaagct0ca 1620
 ggatattttt ggcaaaaacc tgaatagtct gtttaataat atggaagaat taattaagga 1680
 tggcagctca aagcaaaagg ccatgctaga agtacata0a gaccttattt ggtaatctgc 1740
 tgtcttccag tgtctctgca ttagatacca ttactacagt agcacttgga tctctcacat 1800
 ctattccaga aaatgtgtc0 tactcatgtt tctcagattt ttaatatgat actaaaagaa 1860
 caatcattag cagcagaaaag taaaactgta ctacaggaat tgattaatgt actcaagact 1920
 0gatcttcta agttcactgg aaatgatttt atccccaact gtggtgtcta tactgaaaat 1980
 caatagtcaa ctaaagcata ttttcaagac ttcatgaca g00tggccga taagatagaa 2040
 gatcaaaaaa aaaggaactc agatggcttt ct0agtata ctgtgtaaca atctacatga 2100
 actacaagaa aataccattt gtct0cttgg ttgagtcaca aaagcaatgt ggaaacctaa 2160
 ctgaagacct gaagacaata aagcagaccc attcccagga actttgcaag ttaatgaatc 2220
 tttgg0acag agagattctg tgctttggag gaaaagtgtg aaaatataca gaaaccactt 2280
 agtagtgtcc aggaaaatat acagcagaaa tctaaggata tagtca0aca aaatgacttt 2340
 tcacagtcaa aaattttgtg ctgattctga tggcttctca caggaactca gaaattttaa 2400
 ccaagaaggt acaaaattgg ttgaaga0at ctgtgaaaca ctctgataaa ctcaatggca 2460
 acctggaaaa aatatctcaa gagactgaac agagatgtga atctctgaac acaagaacag 2520
 tttatttt0t ctgaacagtg ggtatcttcc ttaaataaaa gggaacagga acttcacaac 2580
 ttattggagg ttgtaagcca atgttgtgag gcttcaagtt cagacatca0 ctgagaaatc 2640
 agatggacgt aaggcagctc atga0aaaca gcataacatt tttcttgatc agatgactat 2700
 tgatgaagat aaattgatag caaaaaatct 0agaacttaa tgaaaccata aaaattgggt 2760
 tgactaagct taattgcttt ctggaacagg atctgaaact ggatatccca acaggtacga 2820

caccacagag g0aaaagtta tttataccca tcaacactgg taagaactga accacgtgaa 2880
 catctccttg atcagctgaa aaggaaacag cctgagctgt taatgatgct aa0actgttc 2940
 agaaaacaac aaagaagaga caattccgga tgtggatgta gaagaggcag ttctggggca 3000
 gtatactgaa gaacctctaa gtcaagagcc atc00tgtag atgctggtgt ggattgttca 3060
 tcaattggcg ggggtccatt tttcc0agca taaaaaatca catggaaaag acaaagaaaa 3120
 cagaggcatt aacaca0ctg gagaggctta aagtggaaga aactacagag cacttggtta 3180
 caaagagcag attacctctg cgagcccaga tcaaccttta attcacttgg gggttgg0ca 3240
 attttatttt taaagaaaaa cttaaaaata aaacctgaaa cccagaact tgagccttgt 3300
 gtatagattt taaaagaata tatatatcag cggggcg0g tggctctagc tgtaatccca 3360
 gctaactttg gaggttgagg cgggtggatt gcttgagccc aggagtgtga gaccagcctg 3420
 gccaacgtgc gctaaaacc0 ttcgtctctg ttaaaaatta gccgggctg gtgggcacac 3480
 tctgtaatc ccagctactg gggaggctga ggcacgagaa tcacttgaac ccagaagcgg 3540
 0ggttgagc gagccaaagg tacaccacta cactccagcc tgggcaacag agcaagactc 3600
 ggtctcaaaa ataaaattta aaaaagatat aaggcagtac t0gtaaattc agttgaattt 3660
 tgatatctac ccatttttct gtcattcccta tagttcactt tgtattaaat tgggtttcat 3720
 ttgggatttg caatgtaaat ac0gtatttc tagttttcat ataaagtagt tcttttagga 3780
 attc 3784

(210) 20

(211) 5340

(212) DNS

(213) *Plasmodium falciparum*

(400) 20

tttttttttt tttattcctt ggatgttctt ggtagtttaa attttttatt tttgtagttt 60
 tcttctttta tacgttttaa agcaggggat gccttttttag gaaatgccct attttcaata 120
 gctttaattt ttgtagattg aaatttatta ttattattat tattattggt gttgttgttg 180
 ttgttgttgt tgttgttatt atttgaataa ttatttggtta tatgaacatt ttgaacattt 240
 atatttctct ttctttcata ttcttttaaa cttgtttacac tcatattttc tgtatttaca 300
 tcaaactctt tattatgttg attgttattt aaataattta attccttgata tgtttcatct 360
 attggttgta taggattatc cgttgtattc ttattatata gcatatattc atttaagggt 420
 agattattgt gattagtttt tacatttaat ttatttttat cacctttatt atttatatta 480
 tgaggatata tactattcgt tgtatgatca tttaaactat tgtaacgaga gtaattattt 540
 tcatgcgcta caattttatc atcttgaata agaaattgga agttttcatc gatttgttca 600
 aatactttac ttaaatctat atcatgtgtt gttgtaattt gttctatctc tttcatcaag 660
 gtatttttaa cttccaagta taaattttgt cttatgatat catcattata aagataataa 720
 ttatgatgat caccttgatc tattttatta tcatcattat aaagataata attatgatga 780
 tcaccttgat ccattttatt atcatcatta taaagataat tattatgatc atgaccttga 840
 tccattttat tatcatcatt ataaagataa ttattatgat catgacctg atccatttta 900
 ttatcatcat tataaagata attattatga tcatgacctt gatccatttt attatcatca 960
 taattattat tgtcaccatt tttattattg tcatgatcat ttttattatt gtcaccattt 1020
 ttattattat catgattatt tttattatta tcatgattat ttttattatt atcatgatta 1080
 tttttattat tatcatcatt tttattatta tcataattcg tgtcgtaagt cgaatcccta 1140
 ttttagtgat tgattttcat cggagtaaac atatctatga cattcacaaa cgtttccctt 1200
 atcctttgta catcatcctt tatatttaga taaaattcat catccattat ttccatgaga 1260

tcataacttg atgtacttgg aatgtcttgt aagtaatctt ttttttttaa tatatctatt 1320
 aattctgcta tatacatatt acatttgttt aaattttgtt caaatatatt attaaaaagt 1380
 tttatatatt cattagactt taacatatgt atacgacgtc cccctttttg ttcttgtgat 1440
 tctttatttt tattttgtaa aatcttttca gatataacgt tatataaact tcgtttctct 1500
 attttgttta tattagtttg acttgtaaag ttatttatga ttttatcaat atttagatta 1560
 tttgtatata ataaattatt ataaatat tt aaagtatcat ttaaacattt gctgtgttcc 1620
 ttttcttcaa tataactttt tctttttaaa taagataata tgttatataa aacagtatga 1680
 taatttgta tcttcctttt aatatcatta ttaatatatt tatattcctt ttcatacatta 1740
 atattgcatt cagaaaaatg ttgtatagta tcatctatct tttttacaga attcataaaa 1800
 acagatttat aatttttttt tgacttatca tataattctt tatttaataa atcgaaacttg 1860
 ttattcattt tttcataaat atcttccaca tttttattta taagtaattc aatatctttc 1920
 aaaatatttt ctttaaattc ttgtatatct tcatttatca tttttttata attattaatt 1980
 ataattattt cctccttttc aaaaacatca ttttttttat aaatatattc aatgttgtca 2040
 ttcataatct tcttgtcctt atcccaatgt atatatattt catgacattt tttttctagt 2100
 aacataaatg attcgtttta aaaaatatga aatatattac atatactttt aatatattgt 2160
 attaatgatt ttgcattata taactttttt tcagattcgt gattatctaa attttgtata 2220
 atatcttcac cttgtctatt taataataaa tctttttata attctttatt ctcaggataa 2280
 ttaaatgatt cctctatatg gtcaaatggc atctcattat tttcttctt accatattgt 2340
 ttttgacatg tttttcctt accattttgt ttttcacata ttattcctt accgttttgt 2400
 ttttcacata ttatctcgtc accgttttgt ttttcacata ttatctttt accactttgt 2460
 ttttcacata ttatctctt accgttttgt ttttcacata ttatctttt accactttgt 2520
 ttttcacata ttatctttt accactttgt ttttcacata ttatctttt accactttgt 2580
 ttttcttttt ttaatccgtt tgtattatat acaccaataa ttgctggcat tttctgcttg 2640
 gcttcacac ttatatgtgg tatgtttatt ttacattgtg atatttcctt tttaatattt 2700
 tcggagagag aaaagtaatc atgatcatat ttttgtaaaa tatccatag gtccagtata 2760
 aaattcagag tatcattata tttaaaatta atgttactat tgagttctt aaaaaggta 2820
 atataatcat tgtatgattt tttattttgt actagataat ttttggatc atctaaaatg 2880
 aataagatgg ttttcatat atcgttttaa agatgatttt cttgatgaat attttttttt 2940
 atatttaata gattatcatg cattatatta gacatatttg ttttaatttg ttgaaaagat 3000
 tttttttgat ttataaaatt ttcttctaaa gaatgatatt tatttaataa gaattgtgta 3060
 atatatattt cttctattat ttttttaatt aatatttgat gaaatgcttg tatattttta 3120
 tatttttgaa tagtatctt taaaaagaaa aatattttat tttgtagatc atctgtatta 3180
 tccattttat ttaataaatt ttttattttt ttactttttt caaataaaat ttttctttt 3240
 tctaataata tttctttatt tttctttaga ctattttgta tattattata ttcttctgta 3300
 tcaagataaa cacctctctt ttctctgctt aaattcagtg catttcttaa cttttcgatt 3360
 tcattattta aatcctttat ttttaattgt ttctgttgtt ttatatatt ctcgggtcta 3420
 ttcttaatat tcttagctcg aaagacataa tctaaagtgc ttaaagtctc atcaatacat 3480
 aaagaggagg gtgatatagt ggcgacaata aaagtcttcg tttcccacc taacgaatct 3540
 tgtaataatc tgggttaattt agaattctct taaggaatat aagatgaatt ctcaatcaac 3600
 gaattaataa ctctacctaa ggttaataaa gattgattta tattacaact ttcttgttgt 3660
 ctaattttta aagaaccata agagcttttc aaagcatttt cactaccgc taaatcaact 3720
 aaatttaatt ttctattttt tgttatactt tctcctacat tatttatatc ttttataatt 3780
 aatgttatag taaaaatcga atgacttcta ctcgattttt tattataagc cgtttcagct 3840
 gtccttctt ttttaatagc tgaacatata atataatata tttcttcaa agaattaata 3900
 ctttttctt ctaacttata aacatttaat cttttactt tattattact atcttcatat 3960
 attcgaagtt tcatattttc atttgttgaa ctttaataat cacataattc ttcattatat 4020
 atttctagat agctaatttt tatattaaaa tcgtacatat tcttatcatc aaatgtttga 4080
 tacatatcat tttcctatt tttatctaca ctacattttt gtacaacatc acaagtaata 4140
 tctctactct tttcgtaaac taacaaattg ttaggttctt tattaatttt taaattatta 4200

taaatatcat ttttatcaat atttattttg ttacataata aattattata attattatta 4260
ataatattat tattgttacc attagtttcc ttatttatta catttatatg ttcgttatcc 4320
ttttcatcaa atatattctt ttttccttta aaatgtcgaa tcttttcttc tttcctttta 4380
tttaatatat cgaatattct tttcgtaact cgaaatataa gtccagtatc ctcatcttca 4440
caaagttcat agcaatagct gatgtcgcta ttaatacttt cattcaaatac caccttttta 4500
ttattatcat attgttttcag gtgttctagt attttccctt ccatagtata ggtcttacct 4560
gtcccgggtct gtccatagca gaacagcgta caattgaatc cttgcaaaac ctgaagcggc 4620
gaacaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaatatat atatatatgt acatgtatat ttatatgtat 4680
atgtatatat atatgtatag ttatatgtat ttttattttt atttttattt ttatatattat 4740
ttttattttt atattttattt ttatttttat atttattttt atttttatat ttatatattat 4800
atatgtgtaa aattaacatg gggagcaaag aatttcccat atattttttt tttttaatct 4860
atttaataaa acattattat gatatacgca gaggtgatat atacatggta tttattttatt 4920
tttttttata tattttttcat ttgtttcgta ggaatattct ttttttttct gcacatatat 4980
ttcactatcc atataatatc ataatacatc atggaataat ttatatatat atatatatat 5040
atgtatattt tattttttacc tcatctacta tttggtaaat ataattattg aacaaagttt 5100
tctgatccac atctttatca catgcataat caaaactata ttttttttcg tatatttcat 5160
tgtttctatt aattgttaat ataacctcat tattattaat tcgaactacc tcttcattat 5220
ttatatcggt tttttctttt tcatttaatg gtctacacct tacgataact tttatattta 5280
cgcaacttga tttatcatta ttataagaat ttctgagcat tttactttta ttcaaataat 5340

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Antiszensz oligonukleotid vagy származéka, amely egy eg5-öt kódoló szekvencia egy részének felel meg.

2. Az 1. igénypont szerinti antiszensz oligonukleotid vagy származéka, amely eg5-öt kódoló szekvencia 8-100 nukleotidjának felel meg.

3. Az 1. vagy 2. igénypontok szerinti antiszensz oligonukleotid vagy származéka, amely 8-20 nukleotid hosszúságú.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti antiszensz oligonukleotid vagy származéka, amely humán eg5-öt és/vagy *Plasmodium falciparum* eg5-öt kódoló szekvencia egy részének felel meg.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti antiszensz oligonukleotid vagy származéka, amelynek szekvenciája az 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8. vagy 9. azonosítószámú szekvenciák szerinti szekvencia,

ahol

1. azonosítószámú szekvencia: 5'-CGACGCCATGACGGAATTC-3'

2. azonosítószámú szekvencia: 5'-AATGGTCTGCATCTCACCA-3'

3. azonosítószámú szekvencia: 5'-GGCTGCGACGCCATGACGG-3'

4. azonosítószámú szekvencia: 5'-ATGACGGAATTC-3'

5. azonosítószámú szekvencia: 5'-CCATGACGGAAT-3'

6. azonosítószámú szekvencia: 5'-ACGCCATGACGG-3'

7. azonosítószámú szekvencia: 5'-GCGACGCCATGA-3'

8. azonosítószámú szekvencia: 5'-GGCTGCGACGCC-3'

9. azonosítószámú szekvencia: 5'-TTGGCTGCGACG-3'

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti antiszensz oligonukleotid vagy származéka, amelyben egy vagy több módosítás van, ahol minden módosítás egy ugyanolyan szekvenciájú, természetes DNS-ből felépülő oligonukleotiddal összehasonlítva egy meghatározott foszfodiészter-internukleozid-hídban és/vagy egy meghatározott, β -D-2'-dezoxiribóz-egységben és/vagy egy meghatározott természetes nukleozidbázis-pozícióban található.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti antiszensz oligonukleotid vagy származéka, amelyben az oligonukleotid 5'-végén és/vagy 3'-végén található 1-5 terminális nukleotidegység a megfelelő nukleozid(ok) 5'-végén és/vagy 3'-végén lévő, módosított internukleozid-hidakkal van védve.

8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti antiszensz oligonukleotid vagy származéka, amelyben legalább egy, belső pirimidinnukleozid és/vagy a pirimidinnukleozid 5'-végén és/vagy 3'-végén lévő internukleozid-híd módosítva van.

9. Az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti antiszensz oligonukleotid vagy származéka, amelyben minden egyes módosítás a többitől függetlenül az alábbiak bármelyike:

a) egy nukleozid 3'- és/vagy 5'-végén lévő foszfodiészterhíd kicserélése egy módosított internukleozid-hídra,

b) egy nukleozid 3'- és/vagy 5'-végén lévő foszfodiészterhíd kicserélése egy defoszfohídra,

c) a cukor-foszfát-vázból egy cukor-foszfát-csoport kicserélése egy másik csoportra,

d) egy β -D-2'-dezoxiribóz-egység kicserélése egy módosított cukoregységre,

e) egy természetes nukleozidbázis kicserélése egy módosított nukleozidbázisra,

f) egy olyan molekulához történő kötés, amely befolyásolja az oligonukleotid tulajdonságait,

g) egy 2'5'-kötést tartalmazó oligoadenilát-molekulához vagy származékához történő kötés, adott esetben egy alkalmas kapcsolómolekulán keresztül, és

h) egy 3'-3'- és/vagy 5'5'-inverzió bevitele az oligonukleotid 3'- és/vagy 5'-végébe.

10. Eljárás az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti antiszensz oligonukleotid vagy származéka előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az alkalmas módon védett monomereket szilárd fázisra kondenzáljuk.

11. Az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti antiszensz oligonukleotid vagy származékának alkalmazása eg5 expressziójának gátlására.

12. Eljárás eg5 expressziójának gátlására, *azzal jellemezve*, hogy az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti antiszensz oligonukleotidot vagy származékát egy eg5-öt kódoló nukleinsavval kapcsolatba hozunk, és ahhoz kötjük.

13. Eljárás gyógyászati készítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti antiszensz oligonukleotidot vagy származékát fiziológiailag elfogadható hordozóanyaggal és adott esetben kiegészítő anyagokkal keverjük.

14. Gyógyászati készítmény, amely legalább egy, az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti antiszensz oligonukleotidot tartalmaz vagy azok bármelyikének származékát tartalmazza.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.



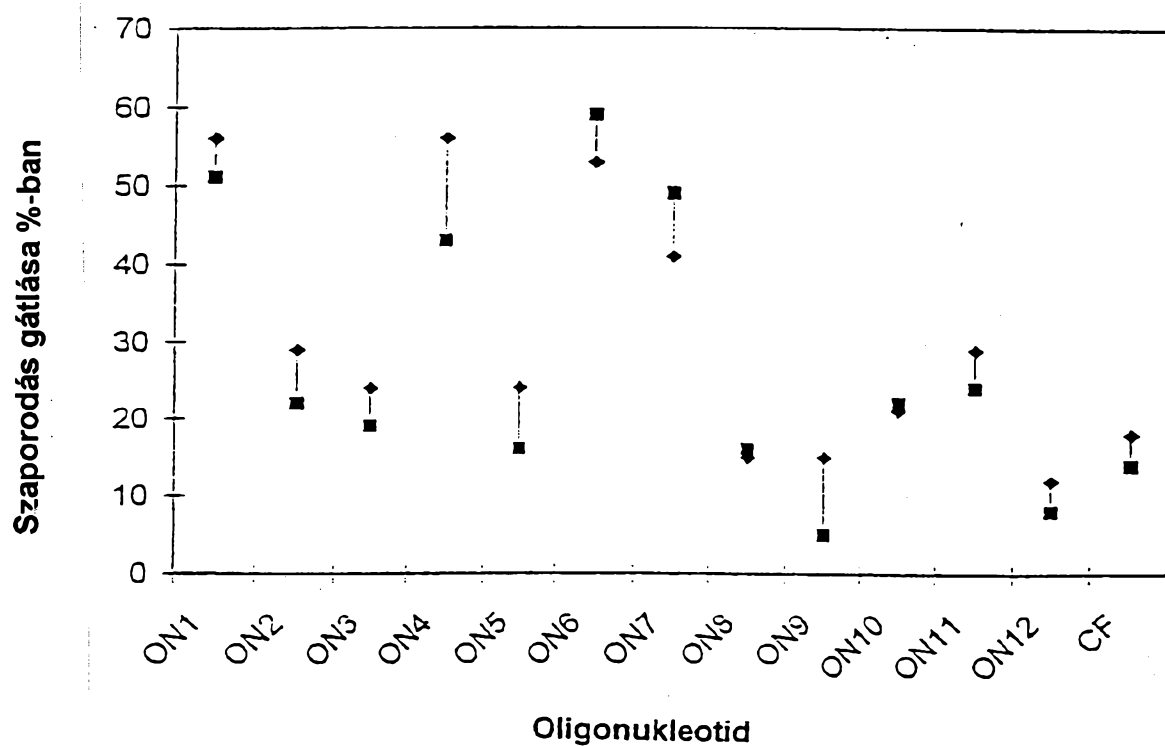
Dr. Svingor Ádám

szabadalmi ügyvivő

59 oldal + 1 = 60 oldal

 2002. 12. 02.

**REH-sejtek szaporodásának gátlása
antiszensz e5-oligonukleotidokkal**



1. ábra