

9700985
9700971

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

732/95

Antiszensz oligonukleotidok és eljárások humán ras-gének gátlására, valamint eljárások ráksejt-proliferáció gátlására és aktivált ras-gének kimutatására

~~Bejelentő: Isis Pharmaceuticals Inc., Carlsbad,
Kalifornia, USA~~

KIVONAT

A találmány tárgyát a ras-gén expressziójának gátlására szolgáló stabilizált antiszensz oligonukleotidok képezik, valamint olyan oligonukleotidok, melyeket úgy módosítottak, hogy affinitásuk a ras-RNS-célpont vonatkozásában fokozódjék, valamint olyan oligonukleotidok, melyeket tovább módosítottak a ras-RNS-célpont szekvenciaspecifikus eliminálásának céljára. A találmány tárgyát képezik a találmány szerinti oligonukleotidokat tartalmazó diagnosztikai és gyógyászati készítmények is.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás a ras-gén aktivált formája expressziójának specifikus gátlására a találmány szerinti oligonukleotidok alkalmazásával. A találmány tárgyát képezik a találmány szerinti oligonukleotidok alkalmazásán alapuló eljárások is, a ras-gén normális és aktivált formájának sejtekben és szövetekben történő kimutatására, és szintén a találmány tárgyát képezik az ilyen eljárások végrehajtására alkalmas - mind kutatási mind diagnosztikai célokra szolgáló - reagensek és reagenskészletek. A találmány tárgyát képezik ezen felül eljárások a ras-gén aktiválódásából származó rendellenességek kezelésére.

bej. bej. 1993/10.10
Előzetes 1993.01.21
Nem. bej. 1993/09.376
Nem. bej. 1993/05.003

jell. alá
Gul

99-0077

ÖZZÉTÉTELI
ÉLDÁNY

6400 / 96

Képviselő:

DANUBIA SZABADALMI ÉS VÉDJEGY IRODA Kft.

Bejelentő: 185 Placentalab Inc. (USA), Kalifornia, US.

Antiszensz oligonukleotidok és eljárások humán ras-gének gátlására, valamint eljárások ráksejt-proliferáció gátlására és aktivált ras-gének kimutatására

62. Magyar 1993.10.01
Ez a bejelentés 1993.01.21

US Pat. 5,270,993 / 08346
US Pat. 5,270,993 / 08346

A találmány tárgyát a ras-gén expressziójának gátlására alkalmas gyógyászati készítmények és eljárások képezik. A ras-gén egy természetben előforduló gén, mely esetenként aktivált formájúvá alakul át, és ennek az átalakulásnak szerepe van a tumorképződésben.

A találmány tárgyát képezik közelebbről a ras-gén expressziójának gátlására szolgáló stabilizált antiszensz oligonukleotidok, valamint olyan oligonukleotidok, melyeket úgy módosítottak, hogy affinitásuk a ras-RNS-célpont vonatkozásában fokozódjék, valamint olyan oligonukleotidok, melyeket továbbmódosítottak a ras-RNS-célpont szekvenciaspecifikus eliminálásának céljára. A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás a ras-gén aktivált formája expressziójának specifikus gátlására a találmány szerinti oligonukleotidok alkalmazásával. A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti oligonukleotidok alkalmazásán alapuló eljárások a ras-gén normális és aktivált formájának sejtekben és szövetekben történő kimutatására, és szintén a találmány tárgyát képezik az ilyen eljárások végrehajtására alkalmas - mind kutatási mind diagnosztikai célokra szolgáló - reagensek és reagenskészletek. A találmány tárgyát képezik ezen felül eljárások a ras-gén aktiválódásából származó rendellenességek kezelésére.

A találmány szerinti oligonukleotidokat tartalmazó diagnosztikai és gyógyászati készítmények alkalmasak a ras-gének különböző fontos mutációinak kimutatására és az ilyen mutációk folytán kialakult tumoros elváltozások kezelésére.

A sejtek növekedését és differenciálódását közvetlenül vagy közvetett módon szabályozó cellurális gének módosulásait a rákos megbetegedések okozójának tekintik. Azonosítottak kb. 30 géncsaládot, az onkogéneket, melyek szerepet játszanak az emberi tumorok kialakulásában. Az egyik ilyen géncsalád, a ras-géncsalád tagjait gyakran találják humán tumorokban elmutálva. Amennyiben a ras-gének normálisan működnek, az általuk termelt fehérjékről feltételezik, hogy szerepet játszanak a normális sejtnövekedésben és az érési folyamatokban. A ras-gén olyan mutációi, melyek a fehérjetermék három kritikus pozíciója közül valamelyikben aminosav-eltérést okoznak olyan fehérjeformát eredményeznek, amely szerepet játszik a tumor kialakulásában. Az olyan gént, amely ilyen mutációt szenvedett "aktiválódott" génnek nevezik. Feltételezik, hogy a ras-gének aktiválódását eredményező pontmutációkat karcinogének vagy egyéb környezeti faktorok indukálják. A vizsgált hasnyálmirigy adenokarcinómák több mint 90 %-ában, a vastagbél adenómák és adekarcinómák kb. 50 %-ban, a tüdő adenokarcinómák és pajzsmirigy-karcinómák kb. 50 %-ában, és a vér rákos megbetegedéseinek - mint például akut mineolid leukémia és mielo-diszpláziás szindróma - jelentős hányadában találtak aktiválódott ras-onkogéneket. Elmondható, hogy az összes humán tumorok kb. 10-20 %-ában a három ras-gén közül (H-ras-, K-ras és N-ras) legalább egy mutációt szenvedett.

Jelenleg feltételezik, hogy amennyiben egy adott tumorsejtben gátoljuk az aktiválódott onkogének expresszióját, a sejt normálisabb növekedési sajátságokkal fog rendelkezni. Feramisco és mtsai. [Nature 314, 639 (1985)] például kimutatták, hogy amennyiben olyan sejtekbe, melyeket aktivált ras-gén bejuttatásával malignus állapotúvá transzformáltak, a ras-gén fehérjetermékéhez kötődő ellenanyagot mikroinjektálnak, a sejtek proliferációs rátája lelassul, és normálisabb megjelenésűvé válnak. Ezt az eredményt a szerzők úgy interpretálták, hogy a kísérlet alátámasztja azt az állítást, hogy az aktivált ras-gén fehérjeterméke szerepet játszik a ráksejtekre jellemző szabályozatlan növekedésben.

A H-ras-génről legújabb kimutatták, hogy szerepet játszik egy "hosszúQ-T-szindrómának" nevezett súlyos kardiális aritmiában, amely egy örökletes rendellenesség, ami azonnali kezelés hiányában gyakran hirtelen halált eredményez. Erre a rendellenességre jellemző, hogy gyakran semmilyen szimptóma nem előzi meg az eratikus szívdobogás megindulását. Az még nem világos, hogy pontosan a H-ras-gén felelős-e a hosszúQ-T-szindróma kialakulásáért. Mindazáltal rendkívül nagy az egybeesés ennek a szindrómának az öröklődése, valamint a 11. kromoszóma H-ras-gén körülvevő régiójában egy bizonyos variáns jelenléte között. Éppen ezért a hosszúQ-T-szindróma következtében fellépő hirtelen szívhalál bekövetkezésének fokozott veszélyét jelző indikátorként alkalmazható a H-ras-gén.

Nagy az igény olyan készítmények előállítására, melyek a ras-gén expresszióját képesek befolyásolni, és különösen nagy az igény olyan készítmények előállítására, melyek a ras-gén aktivált formájának expresszióját képesek modulálni. Szintén nagy az igény az állati ras-gén diagnózisára és

detektálására alkalmas eljárások kifejlesztésére. Szintén nagy igény van olyan diagnosztikai és kezelési eljárások kifejlesztésére, melyek a ras-gén aktiválódásából eredő rendellenességek vonatkozásában alkalmazhatók. Szintén szükség van olyan továbbfejlesztett kutatási reagensekre és reagenskészletekre, melyek alkalmasak a ras-gén kimutatására és tanulmányozására.

Az onkogén expressziójának gátlását megvalósították olyan retrovirális vektorok, vagy plazmidvektorok alkalmazásával, melyek a Ki-ras protoonkogén RNS egy 2 kb-os szegmensét expresszálták, antiszensz orientációban [Mukhopadhyay, T. és mtsai.: Cancer Research 51, 1744 (1991); PCT szabadalmi bejelentés PCT/US92/01852 (WO 92/15680)].

A különböző onkogén családok szerepének tanulmányozásában hasznos eszköznek bizonyult az onkogének antiszensz oligonukleotidokkal történő gátlása. Az antiszensz oligonukleotidok olyan rövid oligonukleotidok, melyek egy adott gén "szensz" vagy kódoló szálával komplementerek, és ennek következtében a génről készült mRNS-transzkriptummal is komplementerek, és ezért képesek vele stabilan és specifikusan hibridizálódni. Holt és mtsai. [Mol. Cell. Biol. 8, 963 (1988)] kimutatták, hogy a c-myc-onkogén mRNS transzkriptumaival specifikusan hibridizálódni képes antiszensz oligonukleotidok, amennyiben azokat HL60-jelű tenyésztett leukémiás sejtekhez adták, képesek voltak a proliferációt gátolni és a differenciálódást indukálni. Anfossi és mtsai. [Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 3379 (1989)] kimutatták, hogy a c-myb-onkogén mRNS-transzkriptumaival specifikusan hibridizálódni képes oligonukleotidok gátolják humán mieloid leukémia sejtvonalak proliferációját. Vickstrom és mtsai. [Proc. Nat. Acad. Sci. 85, 1028

(1988)] kimutatták, hogy a c-myc-mRNS-sel specifikusan hibridizálódni képes antiszensz oligonukleotidok gátolják a c-myc onkogén fehérjetermékének expresszióját, valamint a HL60-jelű tenyésztett leukémia sejtek proliferációját. A 4.871.838 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás (Bos és mtsai.) egy olyan oligonukleotidot tár fel, melynek szekvenciája az N-ras-gén 13. kódonjában található mutáció környezetében komplementer, és ennek a mutációnak a kimutatására szolgál. A 4.871.838 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás (Bos és mtsai.) feltár olyan molekulákat, melyek alkalmasak ras-fehérjét kódoló DNS-ben található mutáció kimutatására alkalmas hibridizációs próbaként történő felhasználásra.

Az összes vizsgált esetben a módosítatlan oligonukleotidok instabilitása jelentős problémának bizonyult, mivel ezeket cellurális enzimek képesek degradálni. A PCT/US8/01024 számú szabadalmi bejelentés (Zon és mtsai.) olyan foszforotioát oligonukleotidokat tár fel, melyek képesek hibridizálódni az amplifikálódott c-myc-onkogén transzlációs iniciációs régiójával, és kimutatja, hogy ezek az oligonukleotidok képesek HL60 leukémiás sejtek növekedését, és a sejtekben DNS-szintézist gátolni. Tidd és mtsai. [Anti-Cancer Drug Design 3, 117 (1988)] olyan metil-foszfónát antiszensz oligonukleotidokat vizsgáltak, melyek specifikusan hibridizálódtak az aktivált N-ras onkogénhez, és azt találták, hogy bár az oligonukleotidok biokémiai degradációval szemben rezisztensek voltak és nem voltak toxikusak tenyésztett humán HT29-sejtekre, nem gátolták az n-ras-gén expresszióját és a vizsgált sejtekre semmilyen hatással nem voltak. Chang és mtsai. kimutatták, hogy az egér Balb-ras-gén mRNS-transzkriptumaival specifikusan hib-

ridizálódni képes metil-foszfónát és foszforotioát oligonukleotidok képesek voltak gátolni a gén fehérjetermékének transzlációját *in vitro* [Chang és mtsai.: Anti-Cancer Drug Design 4, 221 (1989); Brown és mtsai.: Oncogene Research 4, 243 (1989)]. A közleményben megjegyezték, hogy a vizsgált oligonukleotidok T_m -értéke nem jól korreált az oligonukleotidok antiszensz aktivitásával, melyet a ras-p21-proteintermék *in vitro* transzlációjának gátlása útján határoztak meg. Mivel a Chang és mtsai. által vizsgált antiszensz oligonukleotidok a ras-gén transzlációs iniciációs régiójával hibridizálódtak specifikusan, nem várható, hogy ezek az oligonukleotidok bármilyen szelektivitást mutassanak az aktivált ras-gén irányában, és az oligonukleotidok kötődőképességét nem hasonlították össze a normális (vad típusú) és a mutált (aktiválódott) ras-gének vonatkozásában.

Helene és mtsai. beszámoltak egy aktivált H-ras-mRNS (12. kódon G→T mutáció) expressziójának szelektív gátlásáról, egy kilenctagú foszfodiészter oligonukleotid alkalmazásával, amelyhez egy akridin-típusú interkalálódó ágens és/vagy egy hidrofób farok volt kapcsolva. Ez a vegyület szelektíven támadta a mutáns ras-mRNS-t, mind RNáz-H, mind sejtpoliferációs vizsgálati eljárásokban, alacsony mikromorális koncentrációkban [Saison-Behmoaras, T. és mtsai.: EMBO J. 10, 1111 (1991)]. Chang és mtsai. beszámoltak egy mutáns H-ras-mRNS szelektív megtámadásáról; ebben az esetben a 61. H-ras kódon szenvedett A→T mutációt, és az alkalmazott oligonukleotid vagy egy 11-tagú metil-foszfónát oligonukleotid, vagy pedig ennek az oligonukleotidnak a pszoralen-származéka volt. Ezekről a vegyületekről, melyek aktivitáshoz szükséges koncentrációja 7,5-150 $\mu\text{mol/l}$ volt, immunprecipitációs eljárással kimutatták, hogy szelektív módon gátolja

a mutáns H-ras-P21-expresszióját, a normális P21 expresszióhoz viszonyítva [Chang és mtsai.: Biochemistry 30, 8283 (1991)].

Az olyan módosított oligonukleotidok, melyek nem párosodó bázisok esetén növelik a $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ -értéket, alkalmasak a szelektivitás növelésére. Azt találták, hogy a $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ -értékek 1-2 kcal/mól-tól (a legstabilabb nem párosodó bázist tartalmazó oligonukleotidok esetén) 5-6 kcal/mól-ig változnak (a legkevésbé stabil nem párosodó bázisokat tartalmazó oligonukleotidok esetén). Éppen ezért amennyiben lehetséges oly módon maximalizálhatjuk a szelektivitást a mutáns célpont vonatkozásában, azok a mutációk, melyek stabil nem-párosodó bázisokat eredményeznek (például G→A) kevésbé előnyösek, mint azok a mutációk, melyek kevésbé stabil nem-párosodó bázisokat eredményeznek (például C→G, U→G, A→C). Ezt a jelenséget egy öröklődő Alzheimer-kórral asszociált domináns autoszomális mutáció példáján szemléltethetjük. A β -amiloid prekursor-gén három különböző pontmutációjáról kimutatták, hogy együtt szegregálódik ezzel a betegséggel. Ezek a pontmutációk a következők: G→A ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = +1,2$ kcal/mól) G→T ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = 3,9$ kcal/mól), és T→G ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = +3,6$ kcal/mól)² [Goate és mtsai.: Nature 349, 704 (1991); Murrel és mtsai.: Science 254, 97 (1991); Chartier-Harlin és mtsai.: Nature 844, 353 (1991)]. Ebben az esetben a T→G mutáció megcélzása eredményezi feltételezhetően a legnagyobb szelektivitást a mutáns β -amiloid-gén vonatkozásában, antiszensz oligonukleotid alkalmazásával.

Azok a DNS-oligonukleotidok, melyek módosítatlan foszfodiészter internukleozid kötéseket vagy módosított foszforotioát internukleozid kötéseket tartalmaznak, a celluláris RNáz-H szubsztrátjai, ami azt jelenti, hogy

aktiválják a megcélzott RNS RNáz-H-enzim által történő hasítását [Dagle, J.M. Walder, J.A. és Weeks, D.L.: Nucleic Acids Research 18, 4751 (1990); Dagle, J.M., Weeks D.L. és Walder, J.A.: Antisense Research And Development 1, 11 (1991); és Dagle, J.M., Andracki, M.E., DeVine, R.J. és Walder, J.A.: Nucleic Acids Research 19, 1805 (1991)]. Az RNáz-H egy olyan endonukleáz, amely elhasítja az RNS:DNS-duplexek RNS-szálát. Ennek az enzimnek az aktiválása éppen ezért az RNS célpont elhasítását eredményezi, és ez a jelenség nagy mértékben fokozza az antiszensz oligonukleotidoknak a célpont RNS expresszióját gátló képességét. Walder és mtsai. megjegyzik, hogy *Xenopus* embriókban mind a foszfodiészter kötések, mind pedig a foszforotioát kötések egzozonukleázos degradáció tárgyai. Az ilyen nukleázos degradáció a gátlás szempontjából káros, mivel gyorsan elfogyasztja az RNáz-H aktiváláshoz szükséges oligonukleotid-mennyiséget. A WO89/05358 számú PCT közzétételi iratban Walder és mtsai. olyan DNS-oligonukleotidokat tárnak fel, melyeknek 3'-végi internukleozid kötését módosították, hogy rezisztenssé tegyék enzozonukleáz emésztéssel szemben, ugyanakkor a módosított oligonukleotidok az RNáz-H enzimnek szubsztrátjai maradtak.

Azok a kísérletek, melyek azt a célt szolgálták, hogy egy adott oligonukleotidon belül kihasználják a módosítások adta előnyös lehetőségeket, ugyanakkor az oligonukleotid az RNáz-H enzim szubsztrátja is maradjon, kiméra-oligonukleotidok kialakításához vezettek [Giles, R.V. és mtsai.: Anti-Cancer Drug Design 7, 37 (1992); Hayase Y. és mtsai.: Biochemistry 29, 8793 (1990); Dagle, J.M. és mtsai.: Nucleic Acids Research 18, 4751 (1990); Dagle J.M. és mtsai.: Nucleic Acids Research 19, 1805 (1991)]. A

kiméra-oligonukleotidok kettő vagy több kémiaiilag különböző régiót tartalmaznak, melyek mindegyike legalább egy nukleotidot tartalmaz. Ezek az oligonukleotidok általában tartalmaznak egy módosított nukleotidokból álló régiót, amely az oligonukleotidnak egy vagy több előnyös sajátságát kölcsönöz (mint például megnövekedett nukleázrezisztencia, fokozott bejutás a sejtekbe, fokozott kötési affinitás az RNS-célpont vonatkozásában), valamint egy módosítatlan régiót, amely megőrzi az oligonukleotid RNáz-H-hasítást aktiváló képességét. Ezt a megközelítést különféle oligonukleotid-gerincmódosítások esetén alkalmazták, leggyakrabban metilfoszfonát kötéseket is tartalmazó oligonukleotidok esetén, mivel a kizárólag metilfoszfonát kötéseket tartalmazó oligonukleotidok nem szubsztrátjai az RNáz-H-nak. Azokról a metil-foszfonát oligonukleotidokról, melyek RNáz-H szenzitív foszfodiészter kötéseket is tartalmaznak, kimutatták, hogy *in vitro* képesek a célpont RNS RNáz-H általi hasítását indukálni. *E. coli* eredetű RNáz-H enzim alkalmazásával azt találták, hogy a célpont RNS-szálak hatékony RNáz-H hasításához az antiszensz oligonukleotidban legalább három vagy négy egymást követő foszfodiészter kötésnek jelen kell lenni [Quartin, R.S. és mtsai.: Nucleic Acids Research 17, 7253 (1989); Furdon, P.J. és mtsai.: Nucleic Acids Research 17, 9193 (1989)]. Hasonló kísérleteket végeztek emlőseredetű RNáz-H-val végzett *in vitro* hasítási vizsgálatokkal [Agrawal, S. és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1401 (1990)]. Ebben az esetben olyan oligonukleotidok hasításaktiváló hatékonyságát vizsgálták, melyek különböző gerincmódosításokat (a metil-foszfonátokat is beleértve), valamint különböző hosszúságú foszfodiészter kötéseket tartalmazó szakaszokat foglaltak magukban. A vizsgált oligonukleotidok esetén azt találták, hogy

minimum öt egymás melletti foszfodiészter kötés volt szükséges az RNáz-H-hasítás hatékony indukálásához. Legújabban kimutatták, hogy metilfoszfonát/foszfodiészter kimérák fokozott specifitással és hatékonysággal rendelkeznek a célpont RNS hasítás aktiválásának tekintetében, *E. coli* eredetű RNáz-H alkalmazásán alapuló *in vitro* vizsgálati eljárásokban [Giles, R.V. és mtsai.: Anti-Cancer Drug Design. 7, 37 (1992)]. A vizsgált vegyületekről azt is kimutatták, hogy *Xenopus* oocitákban és tenyésztett emlőssejtekben is hatékony antiszensz inhibitorok [Dagle J.M. és mtsai.: Nucleic Acids Res. 18, 4751 (1990); Potts J.D. és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 1516 (1991)].

Foehler és mtsai. a WO90/15065 számú PCT közzétételi iratban olyan kiméra-oligonukleotidokat tárnak fel, melyek a 3'- és/vagy 5'-végükön meg vannak "sapkázva" foszforamidit, foszforotioát vagy foszforoditioát kötésekkel tartalmazó régiókkal, abból a célból, hogy az oligonukleotidok RNáz-H-aktiváló képessége megmaradjon, ugyanakkor az exonukleáz emésztéssel szemben stabilak legyenek. A WO91/12323 számú PCT közzétételi iratban Pederson és mtsai. olyan kiméra-oligonukleotidokat tárnak föl, melyekben egy központi, RNáz-H-t aktiváló dezoxinukleotid-régiót két olyan régió szegélyez, melyekben az oligonukleotid-gerincet módosított internukleozid kötések alkotják (metilfoszfonát, foszforomorfolidát, foszforopiperazidát vagy foszforamidát kötések), mely régiók nem aktiválják az RNáz-H-t. 2'-dezoxi oligonukleotidokat oly módon stabilizáltak nukleázos degradációval szemben, az RNáz-H-aktiváló képesség megtartása mellett, hogy egy rövid foszfodiészter kötésekkel tartalmazó régiót olyan oligonukleotid régiók közé helyeztek, melyekben az oligonukleotid-gerincet

módosították oly módon, hogy ezek a régiók foszforamidát, alkilfoszfonát vagy foszfotriészter kötéseket tartalmaztak [Dagle, J.M., Walder, J.A. és Weeks, D.L.: *Nucleic Acids Research* 18, 4751 (1990); Dagle, J.M., Weeks, D.L. és Walder, J.A.: *Antisense Research And Development* 1, 11 (1991); és Dagle, J.M., Andracki, M.E., DeVine, R.J. és Walder, J.A.: *Nucleic Acids Research* 19, 1805 (1991)]. Igaz ugyan, hogy a foszforamidát kötéseket tartalmazó oligonukleotidok exonukleáz emésztéssel szemben stabilnak bizonyultak, ugyanakkor azonban minden egyes foszforamidát kötés a mért T_m -értékben 1,6 °C-os csökkenést eredményezett [Dagle, J.M., Andracki, M.E., DeVine, R.J. és Walder, J.A.: *Nucleic Acids Research* 19, 1805 (1991)]. A T_m -érték említett csökkenése azt jelzi, hogy az oligonukleotid és célpontja közötti hibridizációs kölcsönhatás gyengül.

Saison-Behmoaras és mtsai. [Saison-Behmoaras, T., Tocque, B. Rey, I., Chassignol, M., Thuong, N.T. és Helene, C.: *EMBO Journal* 10, 1111 (1990)] azt találták, hogy egy bizonyos oligonukleotid esetében, amely szubsztrátja volt az RNáz-H-nak, az RNáz-H hasítási hatékonysága alacsonynak bizonyult, az mRNS-sel történő gyenge hibridizáció miatt.

A kiméra-oligonukleotid kifejezés nem korlátozódik a gerincükben módosított oligonukleotidokra, bár az olyan kiméra-oligonukleotidokat, melyek 2'-ribóz-módosításokat és RNáz-H-érzékeny dezoxi-részleteket tartalmaznak, nem jellemezték olyan részletességgel, mint a gerincükben módosított kiméra-oligonukleotidokat. A 260,032 számú európai közzétételi iratban Inoue és mtsai., valamint Ohtsuka és mtsai. [FEBS Lett. 215, 327 (1987)] olyan 2'-O-metil oligonukleotidok (az ilyen oligonukleotidok magukban nem szubsztrátjai az RNáz-H-nak) alkalmazásáról számoltak be, melyek módosí-

tatlan dezoxi szakaszokat ("dezoxi-rések") is tartalmaztak, és ezek az oligonukleotidok *in vitro* az *E. coli* eredetű RNáz-H hasítását a komplementer szál bizonyos specifikus részeire irányították. Ezekben a vegyületekben a dezoxi-rés legalább négy bázishosszúságú kellett hogy legyen ahhoz, hogy a célpont RNS hasítása hatékonyan megtörténjék. Mindazáltal az ilyen szerkezetű oligonukleotidokat nem vizsgálták emlős eredetű RNáz-H hasítási hatékonyság vonatkozásában, és sejten belüli antiszensz aktivitásukat sem vizsgálták. Ezeket az oligonukleotidokat nukleázos degradációval szemben nem stabilizálták.

Az O-metil-módosításokon kívül rendkívül kevés 2'-riboz-módosítás esetén vizsgálták az oligonukleotidok RNáz-H-aktiváló képességét és antiszensz aktivitását [Schmidt, S. és mtsai.: Biochim. Biophys. Acta 1130, 41 (1992)].

Bár azt fölismerték, hogy egy célpont RNS-szál hasítása antiszensz oligonukleotid és RNáz-H alkalmazásával hasznos lennek, meg kell jegyeznünk, hogy az oligonukleotidok nukleáz rezisztenciája és a hibridizáció pontossága is döntő jelentőségű. Hosszú ideje nagy igény van olyan hatóanyagokra, melyek képesek aktiválni az RNáz-H-t, de ugyanakkor hibridizációs sajátságaik változatlanok maradnak vagy javulnak, nukleázos degradációval szemben pedig rezisztensek. Régóta kielégítetlen igény van tehát olyan eljárásokra és hatóanyagokra, melyek az antiszensz aktivitást fokozzák.

A találmány tárgyát képezik a ras-mRNS-sel komplementer szekvenciájú oligonukleotidok, melyek képesek a ras-gén expresszióját gátolni.

A találmány tárgyát képezik továbbá olyan ras-mRNS-sel komplementer oligonukleotidok, melyek specifikusan gátolják a ras-gén aktivált (mutáns) formájának expresszióját.

A találmány tárgyát képezik továbbá a ras-gén expresszióját gátolni képes stabilizált oligonukleotidok.

Szintén a találmány tárgyát képezik olyan stabilizált oligonukleotidok, melyek szekvenciája komplementer a ras-mRNSN szekvenciájával, és oly módon vannak módosítva, hogy affinitásuk fokozódik a ras-mRNS célpont irányában, és amely oligonukleotidok a ras-gén expresszióját gátolják.

A találmány tárgyát képezik továbbá olyan oligonukleotidok, melyek a ras-mRNS-sel komplementerek, mely oligonukleotidok az RNáz-H szubsztrátjai.

A találmány tárgyát képezik továbbá olyan oligonukleotidok, melyek ráksejtek proliferációját gátolják.

Szintén a találmány tárgyát képezik eljárások ráksejtek proliferációjának gátlására.

A találmány tárgyát képezik továbbá eljárások olyan mutációk kimutatására, melyek a ras-gén normális (vad típusú) formájának aktivált formává történő átalakulását idézik elő.

A találmány tárgyát képezik továbbá hasonló típusú tumorok vizsgálatára alkalmas differenciált diagnosztikai eljárások, valamint olyan eljárások, melyek az aktivált ras-gén jelenlétének kimutatása révén alkalmasak nagy veszélyességű állapotok azonosítására.

A találmány tárgyát képezik továbbá a vad típusú ras-gén mutáns, aktivált formájú ras-génné történő mutációjának következtében fellépő rendellenességek diagnosztizálására és kezelésére szolgáló eljárások.

A találmány tárgyát képezik olyan oligonukleotidok, melyek komplementerek a humán ras-génből származó DNS-sel vagy RNS-sel. A találmány egy előnyös megvalósítási módját jelentik olyan oligonukleotidok, melyek a humán H-ras-génből származó DNS-sel vagy RNS-sel komplementerek. Előnyösen ezek az oligonukleotidok a gén transzlációs iniciációs kódontjával komplementerek, és előnyösen ezek az oligonukleotidok tartalmazzak egy CAT-szekvenciariészletet. A találmány egy másik előnyös megvalósítási módját jelentik olyan oligonukleotidok, melyek az aktivált H-ras-gén 12. kódontjával komplementerek, mely oligonukleotidok előnyösen tartalmazzak egy GAC-szekvenciariészletet. A találmány egy másik előnyös megvalósítási módja szerinti oligonukleotidok komplementerek az aktivált H-ras-gén elmutált 12. kódontjával, és azzal képesek preferáltan hibridizálódni. Az ilyen oligonukleotidok előnyösen tartalmazzak egy GAC-szekvenciariészletet. Az ilyen oligonukleotidokat kényelmi szempontokból előnyösen gyógyászatilag elfogadható hordozóban szereljük ki. A találmány egy másik előnyös megvalósítási módja szerinti oligonukleotidok a humán Ki-ras-génből származó DNS-sel vagy RNS-sel komplementerek. Ezek az oligonukleotidok előnyösen komplementerek a Ki-ras-gén 5'-végi nem transzlálódó régiójával, 3'-végi nem transzlálódó régiójával, 12. kódontjával vagy 61. kódontjával. A találmány egy másik előnyös megvalósítási módja szerinti oligonukleotidok az aktivált Ki-ras-gén 12. kódontjával komplementerek, és előnyösen tartalmazzak egy ACC-szekvenciariészletet. A találmány egy másik előnyös meg-

valósítási módja szerinti oligonukleotidok az aktivált Ki-ras-gén elmutált 12. kódonjával komplementerek, és ahhoz képesek preferáltan hibridizálódni. Az ilyen oligonukleotidok előnyösen tartalmaznak egy ACC-szekvenciárészletet. Az ilyen találmány szerinti oligonukleotidokat kényelmi szempontokból előnyösen gyógyászatilag alkalmas hordozóban szereljük ki.

A találmány szerinti oligonukleotidok előnyösen a nukleázos degradációval szembeni rezisztencia fokozása céljából módosítva vannak. A nukleázokkal szembeni fokozott rezisztenciát előnyösen úgy érjük el, hogy az oligonukleotid tartalmaz legalább egy kéntartalmú nukleotidot, legelőnyösebben egy foszforotioát vagy foszforoditioát nukleotidot.

A találmány egy másik előnyös megvalósítási módja szerinti oligonukleotidok komplementerek a ras-mRNS-sel, képesek gátolni a ras-expressziót, és ugyanakkor fokozott mértékben rezisztensek nukleázokkal szemben, a ras-mRNS célponthoz fokozott kötési affinitással bírnak, és szubsztrátjai az RNáz-H-nak.

A fokozott kötési affinitást előnyösen úgy érjük el, hogy legalább egy nukleotidot módosítunk a cukorrész 2'-pozíciójában, az oligonukleotidok legelőnyösebben 2'-O-alkil-, 2'-O-alkilamino- vagy 2'-fluor-módosítást tartalmaznak.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerinti oligonukleotidok kiméra-oligonukleotidok, melyek legalább egy olyan régiót tartalmaznak, melyet a komplementer ras-mRNS iránti kötési affinitás fokozása céljából módosítottak, valamint egy olyan régiót, amelyik az RNáz-H hasítás szubsztrátja. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerinti

oligonukleotidok tartalmaznak egy RNáz-H-szubsztrát-régiót, melyet két fokozott ras-mRNS-kötő affinitású régió szegélyez.

A találmány egy más szempontja szerint a találmány tárgyát képezik eljárások a humán ras-gén különböző sejtekben vagy szövetekben történő expressziójának modulálására, valamint eljárások az aktivált ras-gén expressziójának specifikus modulálására olyan sejtekben vagy szövetekben, melyek feltehetően hordoznak olyan mutációt, amely a ras-gén aktiválódásához vezet.

A találmány szerinti megoldás előnyös megvalósításai eljárások a ras-gén expressziójának gátlására, valamint az aktivált ras-gén expressziójának specifikus gátlására. A találmány egy következő szempontja szerint a találmány tárgyát képezik eljárások a ras-gén kimutatására sejtekben vagy szövetekben, valamint eljárások az aktivált ras-gén specifikus kimutatására olyan sejtekben, vagy szövetekben, melyekről feltételezhető, hogy hordozzák a mutált gént. Az ilyen találmány szerinti eljárások magukban foglalnak egy olyan lépést, amelyben a humán ras-gént feltehetően tartalmazó sejteket vagy szöveteket találmány szerinti oligonukleotidokkal érintkeztetünk, a gén kimutatásának céljából.

A találmány egy további szempontja szerint a találmány tárgyát képezik eljárások olyan állatok diagnosztizálására és kezelésére, melyek feltehetően hordoznak olyan mutációt, mely a ras-gén aktiválódásához vezet. Az ilyen találmány szerinti eljárások tartalmaznak egy olyan lépést, mely szerint az állatot vagy az állat sejtjeit vagy szöveteit vagy valamely testnedvét találmány szerinti oligonukleotidokkal érintkeztetjük, a gén expressziójának

gátlása céljából, és ily módon a gén aktiválódásából fakadó rendellenességeket kezeljük, vagy az ilyen rendellenességeket diagnosztizáljuk.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a leíráshoz csatolt ábrákat. Az 1. ábrán egy oszlopdiagrammot láthatunk, amely egy ras-luciferáz fúziós fehérje expressziója gátlásának dózis-hatás-összefüggéseit ábrázolja, a gátlást a H-ras transzlációs iniciációs kódonját (AUG) célzó oligonukleotidok alkalmazásával értük el. Az expressziót a luciferáz-aktivitás mérésével jellemeztük, mely aktivitást luciferin hozzáadása után fénykibocsátás formájában detektáltunk.

A 2. ábrán egy oszlopdiagrammot láthatunk, amely egy ras-luciferáz fúziós fehérje expressziója gátlásának dózis-hatás-összefüggését ábrázolja, a gátláshoz olyan oligonukleotidokat alkalmaztunk, melyek célpontja az aktivált H-ras-gén elmutált 12. kódonja körüli régió volt. Az expressziót a luciferáz-aktivitás mérésével jellemeztük, mely aktivitást luciferin hozzáadása után fénykibocsátás formájában detektáltunk.

A 3. ábrán egy oszlopdiagrammot láthatunk, amely egy ras-luciferáz fúziós fehérje expressziójának gátlását ábrázolja egyetlen dózis függvényében, a gátlást antiszensz foszforotioát oligonukleotidok alkalmazásával értük el. Az expressziót a luciferáz-aktivitás mérésével jellemeztük, mely aktivitást luciferin hozzáadása után fénykibocsátás formájában detektáltunk.

A 4. ábrán egy táblázatot és egy oszlopdiagrammot láthatunk, melyek 13, az aktivált H-ras-génnel specifikusan hibridizálódni képes antiszensz oligonukleotiddal végzett kísérletek eredményeit foglalják össze. A táblázatban megadjuk valamennyi oligonukleotid hosszát, az aktivált ras-génnek azt a régióját, amellyel az oligonukleotid képes specifikusan hibridizálódni, va-

lamint megadjuk az oligonukleotid aktivitását a ras-luciferáz fúziós fehérje expressziójának gátlásában.

Az 5. ábrán egy táblázatot láthatunk, amely megadja a ras-mRNS szekvenciájának azt a részletét, amely az antiszensz oligonukleotidok célpontja (a szekvenciát 5'-3'-irányban adtuk meg), valamint a H-ras-gén transzlációs iniciációs kódonját (AUG) és a 12. kódon körüli régiót célzó antiszensz oligonukleotidok hibridizációs lokalizációját és szekvenciáját. Az antiszensz oligonukleotidok szekvenciáját 3'-5'-irányban adtuk meg. Az 5A ábrán láthatunk két 20-tagú oligonukleotidot (2502 és 2503), melyek célpontja az AUG-kódon, valamint láthatunk egy egész sor oligonukleotidot, melyek 5-25 tagúak és célpontjuk a 12. kódon. Az 5B ábrán a 2502, 2503, 6186 és 2570 jelzésű oligonukleotidokat láthatjuk, megjelölve a ras-mRNS-en található célpontszekvenciáikat is.

A 6. ábrán egy oszlopdiagrammot láthatunk, amely a ras-luciferáz fúziós fehérje expressziójának gátlását mutatja a 2502, 2503, 6186, valamint ugyanezen foszforotioát oligonukleotidok egységesen 2'-O-metilált változatainak hatására. Az oligonukleotidokból különböző dózisokat alkalmaztunk.

A 7. ábrán egy oszlopdiagrammot láthatunk, amely a mutáns (vonalkázott oszlopok) és a normál (sötét oszlopok) ras-luciferáz fúziós fehérje expressziójának különböző hosszúságú antiszensz oligonukleotidok által kiváltott antiszensz gátlását ábrázolja.

A 8. ábrán nyolc grafikont láthatunk, melyek a ras-gátlás dózis-hatás-összefüggését ábrázolják. A folytonos vonalak a vad típusú ras-génnel szembeni aktivitást, a pontozott vonalak pedig az aktivált ras-génnel szembeni aktivitást mutatják.

A 9. ábra két részletből áll, és az antiszensz oligonukleotidok kötődését mutatja a 47-tagú hajtűalakú H-ras-mRNS célponthoz. A 9A ábrán egy "gel shift" analízist láthatunk, az ábrákon a hajtűalakú RNS-célpont elektroforetikus mobilitásának változásait láthatjuk az alkalmazott oligonukleotid-koncentrációk függvényében. A baloldali ábrán egységesen 2'-O-metil-módosításokat tartalmazó oligonukleotidot alkalmaztunk (dezoxiszám = 0), a jobboldali ábrán pedig egy olyan kísérlet eredményét láthatjuk, amelyben egy 2'-O-metil kiméra-oligonukleotidot alkalmaztunk, amelyben egy 9 bázishosszúságú dezoxi-rés volt található (dezoxiszám = 9). Az 1-8. számozott sávok különböző koncentrációjú oligonukleotidok alkalmazásával végrehajtott elektroforetikus futtatás eredményezi. Az oligonukleotid-koncentrációk a következők voltak: 1. sáv: semmi; 2. sáv: 10^{-11} mól/l; 3. sáv: 10^{-10} mól/l; 4. sáv: 10^{-9} mól/l; 5. sáv: 10^{-8} mól/l; 6. sáv: 10^{-7} mól/l; 7. sáv: 10^{-6} mól/l; 8. sáv: 10^{-5} mól/l.

A 9B ábrán egy grafikont láthatunk, amely a hajtűcélpont egy részletének elektroforetikus mobilitásában beállt változásokat mutatja különböző antiszensz oligonukleotidok alkalmazása esetén. Álló rombusz: dezoxiszám = 17; •: dezoxiszám = 9; fekete alapján álló háromszög dezoxiszám = 7; 0 dezoxiszám = 5; üres alapján álló háromszög dezoxiszám = 3; ■ dezoxiszám = 1, □ dezoxiszám = 0 (a grafikonban látható inszert a 47-tagú hajtűalakú H-ras-célpont szekvenciáját mutatja a 2570. számú oligonukleotid szekvenciájával együtt).

A 10. ábrán egy elektroforézis-gélről készült felvételt láthatunk, amely a komplementer H-ras-mRNS RNáz-H-függő hasadását ábrázolja, amely 2'-O-metil kiméra-foszforotioát oligonukleotidok hatására következett

be. A sávok jelölése az alkalmazott oligonukleotid központjában található dezoxi-rés hosszára utal.

A 11. ábra két részletből áll, és a ras-RNS 12. kódonja körüli szekvenciárészletet célzó 2'-O-metil foszforotioát kiméra-oligonukleotidok antiszensz aktivitását ábrázolja. A 11A ábrán egy oszlopdiagrammot láthatunk, amely különböző oligonukleotidok aktivitását mutatja egyetlen dózis (100 nmól/l) alkalmazása esetén. A következő oligonukleotidokat alkalmaztuk: egységesen 2'-O-metil oligonukleotidok, egységesen dezoxi oligonukleotidok, valamint 2'-O-metil kiméra-oligonukleotidok, melyek központjukban 1-, 3-, 5-, 7- vagy 9-bázishosszúságú dezoxi-rést tartalmaztak. A 11B ábrán egy grafikont láthatunk, amely különböző oligonukleotidok aktivitásának dózis-hatás-összefüggését mutatja. Alkalmazott oligonukleotidok: egységesen dezoxi (csúcsán álló fekete háromszög), valamint 2'-O-metil oligonukleotidok, amelyek középen elhelyezkedő dezoxi-réseket tartalmaztak, melyek hosszúsága 4-(■♦), 5-(•), 7-(+) vagy 9-bázis (alapján álló fekete háromszög) hosszúságú volt.

A 12. ábrán egy oszlopdiagrammot láthatunk, amelyek egységesen dezoxi foszforotioát oligonukleotidok, valamint rövidített kiméra-oligonukleotidok antiszensz aktivitását mutatja ras-luciferáz fúziós fehérjével szemben.

A 13. ábrán egy grafikont láthatunk, amely az oligonukleotidok antiszensz aktivitása és RNáz-H-aktiváló képessége közötti összefüggéseket mutatja. A kísérletben ras-gént célzó dezoxi-réseket tartalmazó 2'-O-metil foszforotioát oligonukleotidokat alkalmaztunk, és az eredményeket a dezoxi-rés hosszának függvényében adtuk meg.

A 14. ábrán egy grafikont láthatunk, amely 7-bázishosszúságú dezoxiréseket tartalmazó 2'-módosított foszforotioát kiméra-oligonukleotidok antiszensz aktivitásának dózis-hatás-összefüggéseit mutatja. Alkalmazott oligonukleotidok: alapján álló fekete háromszög: egységesen dezoxi foszforotioát oligonukleotid; ■ : 2'-O-pentil kiméra; • : 2'-O-propil kiméra; ♦ : 2'-O-metil kiméra; csúcsán álló fekete háromszög : 2'-fluor kiméra.

A 15. ábrán egy grafikont láthatunk, amely különböző kiméra-oligonukleotidok ras-luciferáz expresszióra kifejtett gátló hatásának dózis-hatás-összefüggéseit mutatja. A kísérletben olyan kiméra-oligonukleotidokat alkalmaztunk, amelyekben különböző kombinációban szerepeltek foszforotioát és foszfotieszter-gerincrészek, valamint 2'-O-metil és 2'-dezoxi-részek.

A 16. ábrán egy grafikont láthatunk, amely az ISIS-2503 jelzésű oligonukleotid tumorellenes aktivitását mutatja, a csupasz egerekben fenn tartott A549-jelű humán tumorról szemben.

A 17. ábrán egy grafikont láthatunk, amely az ISIS-2503-jelzésű oligonukleotid tumorellenes aktivitását mutatja, csupasz egerekben fenn tartott A549-jelű humán tumorról szemben. Az oligonukleotidot kationos lipidek jelenlétében adtuk be.

A 18. ábrán egy oszlopdiagrammot láthatunk, amely különböző oligonukleotidok H-ras ellenes aktivitását ábrázolja. A kísérletben különböző 2'-cukormódosításokat tartalmazó foszfodiészter (P=O) gerinccel rendelkező oligonukleotidok aktivitását hasonlítottuk össze foszforotioát (P=S) gerinccel rendelkező 2'-dezoxinukleotidok aktivitásával.

A 19. ábrán egy oszlopdigrammot láthatunk, amely a Ki-ras-mRNS expressziójának antiszensz gátlását ábrázolja három különböző humán vastagbél-rák sejtvonala esetén, az alkalmazott sejtvonalak jelzése: Calul, SW480 és SW620.

A 20. ábrán egy oszlopdigrammot láthatunk, amely az SV480-jelű humán ráksejt vonal proliferációjának gátlódását mutatja az ISIS-6957 és ISIS-6958 jelzésű Ki-ras-specifikus oligonukleotidok hatására.

A 21. ábrán egy oszlopdigrammot láthatunk, amely a Ki-ras-mRNS expresszió szelektív gátlódását mutatja egyrészt az SV480-jelű humán ráksejt vonalban, amely mutáns Ki-ras-gént expresszál, másrészt HeLa-sejtekben, melyek vad típusú Ki-ras-t expresszálnak, a Ki-ras-gén elmutált 12. kódonját célzó oligonukleotid hatására.

A rákos daganatok egy egész sor lépésen keresztül alakulnak ki, ezek a lépések olyan változást eredményeznek, melyek végül a sejtosztódás szabályozó képességének elvesztését eredményezik, és ez az állapot a ráksejtekre jellemző, azaz a ráksejtek képesek lesznek folyamatos szabályozatlan proliferációra, a környező szövetek megtámadására, valamint különböző szerveknek metasztázisok kialakítására. Rendkívül gondosan ellenőrzött *in vitro* vizsgálatok segítettek azonosítani azokat a faktorokat, amelyek jellemzik a normális és a neopláziás sejtek növekedését, és ezek a vizsgálatok olyan specifikus fehérjék azonosítását eredményezték, melyek szerepet játszanak a sejtszaporodás és a differenciálódás szabályozásában. Ezen felül az a lehetőség, hogy a sejtek transzformálódását képesek vagyunk pontosan ellenőrzött kvantitatív *in vitro* eljárások alkalmazásával vizsgálni, olyan specifikus gének felfedezéséhez vezetett, melyek képesek a transzformált

sejtfenotípust indukálni. Az ilyen rákot okozó génekről, az onkogénekről feltételezik, hogy transzformációt okozó sajátságaikat olyan mutációk során nyerik el, melyek fehérjetermékük expressziójának szabályozásában eredményeznek változásokat. Bizonyos esetekben ezek a változások a nem-kódoló DNS-szakaszokban található regulációs doménekben történnek, például promóterekben és enhanszerekben, és ezek a változások az onkogének transzkripciós aktivitásában változásokat idéznek elő, amely változások a géntermékek túltermelődését vagy csökkent termelődését idézik elő. Más esetekben a mutációk az onkogének kódoló régióiban történnek, és ezek a változások eltérő géntermékek megjelenését idézik elő, amely géntermékek vagy inaktívak vagy túlzottan aktívak, vagy olyan aktivitással bírnak, amely a normális (vad típusú) géntermék aktivitásától eltérő.

A mai napig több, mint 30 cellurális onkogén-családot azonosítottak. Ezek a géneket osztályozhatjuk mind szubcellurális lokalizációjuk alapján, mind pedig proteintermékeik feltételezett hatásmechanizmusa alapján. A ras-onkogének egy géncsalád olyan tagjai, melyek hasonló szerkezetű fehérjéket kódolnak, mely fehérjék a sejtmembrán belső felületén helyezkednek el. A ras-fehérjékről kimutatták, hogy aminosav-szinten rendkívül konzerváltak, nagy affinitással és specifitással kötnek GTP-t, és GTPáz-aktivitással bírnak. Bár a ras-géntermékek cellurális funkciója nem ismert, biokémiai saját-ságaik, valamint a GTP-kötő fehérjéknek vagy G-fehérjéknek nevezett szig-nált transzdukcióban szerepet játszó fehérjecsaláddal való jelentős szekvenciahomológiájuk alapján arra következtetünk, hogy a ras-géntermékek alapvető szerepet játszanak az extracellurális jelzések sejt-membránon keresztüli transzdukciójával összefüggő alapvető cellurális sza-

bályozó funkciókban. A ras-géneket, melyek H-ras, K-ras és N-ras elnevezéssel láttak el, emlősök genomjában azonosították. Az emlős ras-génekre jellemző, hogy transzformáció indukáló sajátságaikat kódoló szekvenciáikban létrejövő pontmutációk idézik elő. A természetben előforduló ras-onkogénekben azonosított mutációk a 12., 13. és 61. kódot érintik. A H-ras, K-ras és N-ras-gének szekvenciája ismert [Capon és mtsai.: *Nature* 302, 33 (1983); Kahn és mtsai.: *Anticancer Res.* 7, 639 (1987); Hall és Brown: *Nucleic Acids Res.* 13, 5255 (1985)]. A humán tumorokban leggyakrabban azonosított aktiválódást eredményező ras-mutációt a H-ras-gén 12. kódonjában találták, mely mutáció a GGC-kódon GTC-kódonná történő változását eredményezi, ami egy glicin-valin cserét eredményez, a ras-proteintermék GTPáz szabályozó doménjében [Tabin, C.J. és mtsai.: *Nature* 300, 143 (1982); Reddy, P.E. és mtsai.: *Nature* 300, 149 (1982); Taparowsky, E. és mtsai.: *Nature* 300, 762 (1982)]. Feltételezik, hogy ez az egyetlen aminosavcsere elrontja a ras-fehérjeműködés természetes szabályozását, és ezáltal a természet szerint szabályozott fehérje folytonosan aktívvá válik. Feltételezik, hogy a természetes ras-fehérjeműködés szabályozásának megszűnése felelős azért, hogy a sejt normális szaporodási sajátságai malignussá változnak.

A találmány tárgyát képező oligonukleotidok alkalmasak a humán ras-gén expressziójának gátlására. A találmány szerinti oligonukleotidok specifikusan hibridizálódnak a humán ras-génből származó kiválasztott DNS- vagy mRNS-szakaszokkal. A találmány tárgyát képezik olyan oligonukleotidok is, melyek a ras-gén mutáns formájában expresszióját selektíven gátolják. Jelen leírás vonatkozásában az "oligonukleotid" kifejezés

ribonukleinsav vagy dezoxiribonukleinsav oligomerre vagy polimerre vonatkozik. Ez a kifejezés magában foglal mint természetesen előforduló bázisokat, cukrokat és cukor közötti (gerinc) kötéseket tartalmazó oligomereket, mind pedig olyan oligomereket, melyekben található olyan természetben nem előforduló részletek, melyek a természetben előforduló megfelelőikkel hasonló módon funkcionálnak. Az ilyen módosított vagy helyettesített oligonukleotidok gyakran előnyösebbek a természetben előforduló formáknál, mivel olyan sajátágaik vannak, mint például fokozott bejutás a sejtekben, valamint megnövekedett stabilitás nukleázok jelenlétében.

A találmány szerinti megoldásban alkalmazható előnyös oligonukleotidok tartalmazhatnak például foszforotioát, foszfortriészter, metilfoszfonát, rövidláncú alkil vagy cikloalkil cukor közötti kötéseket, vagy rövidláncú heteroatomos vagy heterociklusos cukor közötti kötéseket. A legelőnyösebbek azok az oligonukleotidok, melyek gerince az alábbi kötések valamelyikét tartalmazza: $\text{CH}_2\text{-NH-O-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-O-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{-O-N(CH}_3\text{)-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-N(CH}_3\text{)-CH}_2$ és $\text{O-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-CH}_2$ (a foszfodiészter kötések hasonló elven így jelölhetők: O-P-O-CH_2). Szintén előnyösek azok az oligonukleotidok, melyek morfolino gerincszerkezettel rendelkeznek (Summerton, J.E. és Weller, D.D.: amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés száma: 5,034,506). A találmány más előnyös megvalósítási módjai szerint, például a protein-nukleinsav-gerinc (PNA) esetén az oligonukleotid foszfodiészter-gerincét poliamid-gerinccel helyettesíthetjük, ebben az esetben a bázisok közvetlenül vagy közvetetten a poliamid-gerinc nitrogénatomjához kapcsolódnak [P.E. Nielsen, M. Egholm, R.H. Berg, O. Buchardt: Science 254, 1497 (1991)]. A találmány szerinti

más előnyös oligonukleotidok tartalmazhatnak alkil és halogén szubsztituált cukorrészeket, melyek a 2'-pozícióban az alább felsorolt szubsztituensek valamelyikét tartalmazzák: OH, SH, SCH₃, F, OCN, O(CH₂)_nNH₂ és O(CH₂)_nCH₃, ahol N értéke 1 és 10 közötti; C₁-C₁₀ kis szénatomszámú alkil, szubsztituált kis szénatomszámú alkil, alkaril vagy aralkil; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; O-, S-, vagy N-alkil; O-, S-, vagy N-alkenil; SOCH₃; SO₂CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂; heterociklo-alkil; heterociklo-alkaril; amino-alkil-amino; polialkil-amino; szubsztituált szilil; RNS-hasítócsoporthoz; konjugátum; jelzőcsoporthoz; interkalátor; az oligonukleotid farmakokitenikai sajátságait javító csoport; az oligonukleotid farmakodinamikai sajátságait javító csoport; valamint egyéb hasonló sajátságú szubsztituensek. Az oligonukleotidok tartalmazhatnak cukor-mimetikumokat is, mint például a penta-furanozil-csoportokat helyettesítő ciklobutil-csoportok.

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint az oligonukleotidok tartalmazhatnak legalább egy módosított bázist. Módosított bázisok példaként a következőket említjük meg: 2-(amino)-adenin, 2-(metil-amino)-adenin, 2-(imidazoil-alkil)-adenin, 2-(amino-alkil-amino)-adenin és egyéb heteroszubsztituált alkil-adeninek.

A találmány szerinti előnyös oligonukleotidok tartalmazhatnak egyrészt módosított nukleotidokat, melyek fokozzák az oligonukleotid nukleázokkal szembeni rezisztenciáját, tartalmazhatnak olyan módosított nukleotidokat, melyek növelik a ras-mRNS iránti affinitásukat, másrészt tartalmazhatnak olyan nukleotidokat, melyek az RNáz-H szubsztrátjai. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerinti kiméra-oligonukleotid tartalmaz legalább egy olyan régiót, melyet a ras-mRNS kötési affinitás fo-

kozása céljából módosítottak, valamint egy olyan régiót, amelyik az RNáz-H szubsztrátja. Az oligonukleotid nukleázrezisztencia fokozása céljából is módosítva van. A találmány egy előnyösebb megvalósítási módja szerint a találmány szerinti oligonukleotidban egy olyan régiót, amely szubsztrátja az RNáz-H-nak két olyan régió szegélyez, melyet módosítottak, a ras-mRNS-kötési affinitás fokozása céljából. Az ilyen módosítások nagy mértékben fokozzák az antiszensz oligonukleotid ras-gén expressziógátló hatását.

A találmány szerinti oligonukleotidok előnyösen kb. 8 és kb. 50 közötti számú nukleinsav alapegységet tartalmaznak. A találmány szerinti oligonukleotidok előnyösebben kb. 8-30 nukleinsav-alapegységet, és előnyösebben kb. 13-25 nukleinsav-alapegységet tartalmaznak. Szakember számára kézenfekvő, hogy a nukleinsav-alapegység egy bázis-cukor kombinációt jelent, amely megfelelő módon hozzá van kötve a szomszédos nukleinsav-alapegységhez, foszfodiészter- vagy egyéb kötésen keresztül.

A leírás vonatkozásában a "hibridizáció" kifejezés a komplementer bázisok közötti hidrogénkötések kialakulását jelenti, melyet Watson-Crick bázispárosodásnak is neveznek, amely kölcsönhatás általában ellentétes értelmű nukleinsavszálak között vagy egy nukleinsavszál két különböző régiója között jön létre. A guanin és a citozin az ismert komplementer bázisok egy példája, melyekről köztudomású, hogy egymással három hidrogénkötést képesek kialakítani.

A "képes specifikusan hibridizálódni" kifejezés arra utal, hogy az oligonukleotidban a komplementaritás mértéke elegendően nagy ahhoz, hogy a nem célpontszekvenciákhoz történő nem specifikus kötődés elkerülhető legyen. Szakember számára kézenfekvő, hogy egy oligonukleotidnak

nem kell 100 %-osan komplementernek lennie a célnukleinsav-szekvenciával, ahhoz, hogy képes legyen specifikusan hibridizálódni.

A ras-luciferáz génexpresszió gátlása antiszensz oligonukleotidokkal

Egy sor antiszensz foszforotioát oligonukleotidot vizsgáltunk át a 2-5. példákban leírt ras-luciferáz-jelzőgénrendszer alkalmazásával, mely oligonukleotidok célpontja a H-ras-gén transzlációs iniciációs kódont vagy az aktivált H-ras-gén pontmutációt tartalmazó 12. kódont volt. A vizsgált oligonukleotidok közül hatról kimutattuk, hogy a ras-luciferáz-aktivitást jelentős mértékben, reprodukálhatóan gátolják. Az 1. táblázatban megadjuk ezen oligonukleotidok szekvenciáját, jelzőszámát, valamint szekvenciaazonosító számát.

1. táblázat

Jelzőszám	szekvencia	szekv. az. sz.
2502	CTT-ATA-TTC-CGT-CAT-CGC-TC	1
2503	TCC-GTC-ATC-GCT-CCT-CAG-GG	2
2570	CCA-CAC-CGA-CGG-CGC-CC	3
2571	CCC-ACA-CCG-ACG-GCG-CCC-A	4
2566	GCC-CAC-ACC-GAC-GGC-GCC-CAC	5
2560	TGC-CCA-CAC-CGA-CGG-CGC-CCA-CC	6

Az 1. ábra egy dózishatás-vizsgálat eredményét mutatja, amelyben normális lac-luciferáz-jelzőgént vagy mutáns lac-luciferáz-jelzőgént expresszáló sejteket a 2503-jelű (szekvenciaazonosító szám: 2) foszforotioát oligonukleotid növekvő koncentrációival kezeltünk. Ennek az oligonukleotidoknak a H-ras RNS-transzkriptum transzlációs iniciációs

kódonja a célpontja. Amint azt az 1. ábrán láthatjuk, amennyiben a sejteket ezzel az oligonukleotiddal kezeltük, a ras-luciferáz-aktivitás dózisfüggő gátlását tapasztaltuk, a kapott IC₅₀-érték közelítőleg 50 nmól/l volt, mind a normális, mind pedig a mutáns ras-célpont esetén. A kontrollkísérletben egy 20 bázishosszúságú véletlenszerű szekvenciájú foszforotioát oligonukleotidot alkalmaztunk. Az eredményeket a kezeletlen transzfektált sejtekben mérhető luciferáz-aktivitás százalékában adtuk meg. A kapott eredmény, miszerint a ras-transzlációs iniciációs kódonját célzó oligonukleotid egyformán hatásos mind a mutáns, mind pedig a normális ras-gén expressziójának gátlásában, várható volt, mivel a két különböző célpont szekvenciája az AUG transzlációs iniciációs kódon környezetében azonos.

A 2. ábrán egy olyan dózis-hatáskísérlet eredményeit láthatjuk, melyben sejteket a 2570-jelű (szekvenciaazonosító szám: 3) foszforotioát oligonukleotiddal kezeltünk, mely oligonukleotid célpontja a mutáns (aktivált) H-ras RNS 12. kódonjában található pontmutáció és környéke. A kontroll kísérletben egy véletlenszerű szekvenciájú foszforotioát oligonukleotidot alkalmaztunk, amely 20. bázishosszúságú volt. Az eredményeket a kezeletlen transzfektált sejtekben mérhető luciferáz-aktivitás százalékában fejeztük ki. Amint az ábrán látható, amennyiben a sejteket ennek az oligonukleotidnak növekvő koncentrációival kezeltük, a ras-luciferáz-aktivitásának dózisfüggő gátlását tapasztaltuk, mind a mutáns, mind pedig a normális formájú ras-luciferázt expresszáló sejtekben. Mindezáltal az eredmények alapos vizsgálatából kiderül, hogy kis koncentrációban alkalmazva a 2570-jelű oligonukleotid a ras-luciferáz mutáns formája irányában a normális formával szemben kb. háromszoros szelektivitást mutat. Valójában a 2570-jelű

oligonukleotid a ras-luciferáz mutáns formájával szemben 100 nmól/l-es IC50-értékkel rendelkezik, míg ugyanezen oligonukleotid IC50-értéke a nem mutáns formával szemben 250 nmól/l.

A 3. ábrán egy olyan tipikus kísérlet eredményeit láthatjuk, amelyben a ras-luciferáz normális és mutáns formáit expresszáló sejteket kezeltünk egyetlen dózisban (0,5 μ mól/l) olyan oligonukleotidokkal, melyek célpontja egyrészt a H-ras-gén transzlációs iniciációs kódonja volt, másrészt a 12. kódonban található pontmutáció. A vizsgált foszforotioát antiszensz oligonukleotidokat az 1. táblázatban foglaljuk össze. A kontroll oligonukleotid (2504) egy 20-bázishosszúságú véletlenszerű szekvenciájú foszforotioát oligonukleotid volt. Az eredményeket az oligonukleotiddal nem kezelt transzfektált sejtekben mérhető luciferáz-aktivitás százalékában adtuk meg. Amint azt a 3. ábrán láthatjuk, a ras-luciferáz-aktivitás gátlásában a 2503-jelű vegyület (szekvenciaazonosító szám: 2) bizonyult a leghatékonyabbnak, melynek célpontja a ras-gén transzlációs iniciációs kódonja volt. A három oligonukleotid közül, melyek célpontja az aktivált H-ras-gén 12. kódonjában található pontmutáció volt, csak a 2570-jelű (szekvenciaazonosító szám: 3) 17-tagú oligonukleotid mutatott szelektivitást a ras-luciferáz gén mutált formája irányában, a normális formával összehasonlítva. Ezt az eredményt a 4. ábrán is láthatjuk, amely ábra összefoglalja 13 H-ras-gén aktivált formájával komplementer oligonukleotid, valamint egy kevert szekvenciájú oligonukleotid (1966) és egy, a vad típusú ras-gén 12. kódonja körüli régióval komplementer kontroll oligonukleotid (2907) alkalmazásával kapott kísérleti eredményeket. Az ábrán láthatjuk valamennyi alkalmazott oligonukleotid hosszát, azt a régiót, mellyel az illető oligonukleotid komp-

lementer, valamint az oligonukleotidok aktivitását a ras-luciferáz fúziós fehérje expressziójának gátlásában. A 12. kódonban található pontmutációt célzó hosszabb foszforotioát oligonukleotidok a ras-luciferáz expresszió gátlásában jelentős antiszensz aktivitással bírtak, de nem bizonyultak selektívnek a ras-luciferáz fúziós fehérje mutáns formájú expressziójának gátlásában. A 12. kódonban található pontmutációt célzó foszforotioát oligonukleotidok közül azok, melyek 17 nukleotidnál rövidebbek voltak, a ras-luciferáz gén egyik formájával szemben sem mutattak aktivitást. Ezek az eredmények igazolják a találmány szerinti ras-szekvenciákat célzó foszforotioát oligonukleotidok antiszensz aktivitását.

A H-ras-gén AUG-kódonjával specifikusan hibridizálódni képes antiszensz oligonukleotidok

Három darab 20-bázishosszúságú, a H-ras-gén AUG-kódonját célzó foszforotioát oligonukleotid ras-luciferáz expressziót gátló hatását hasonlítottuk össze egy tranziens transzfekciós vizsgálati eljárás alkalmazásával, melyet a 2-5. példákban leírtak szerint hajtottunk végre. Az eredményeket az 5A és 5B ábrán foglaljuk össze. Az oligonukleotidokat - ISIS-2502 (szekvenciaazonosító szám: 1), 2503 (szekvenciaazonosító szám: 2) és 6186 (szekvenciaazonosító szám: 7), adataik a 2. táblázatban láthatók - ras-luciferáz expressziógátló hatását HeLa-sejtekben vizsgáltuk, az oligonukleotidokat egyetlen dózisban (100 nmól/l) alkalmazva. Mind a három AUG-kódot célzó oligonukleotid hatékonyan gátolta a ras-luciferáz expressziót. Ezt a három foszforotioát oligonukleotidot előállítottuk oly módon is, hogy a bennük található valamennyi cukoregység 2'-O-metilmodosítást tartalmazott. Az ISIS-2503 oligonukleotid (szekvenciaazonosító

szám: 2) 2'-O-metilált változata szintén gátolta a ras-luciferáz expressziót. A kísérlet eredményét a 6. ábrán láthatjuk.

2. táblázat

A mutáns H-ras-gént célzó antiszensz oligonukleotidok

(az oligonukleotidok szekvenciáit 5'→3'-irányban adjuk meg)

oligonukleotid	hossz	célpont	szekvencia	szekv.az. sz.
2502	20	AUG	CTTATATTCCGTCATCGCTC	1
2503	20	AUG	TCCGTCATCGCTCCTCAGGG	2
6186	20	AUG	TATTCCGTCATCGCTCCTCA	7
2563	5	CODON 12	CGACG	8
2564	7	CODON 12	CCGACGG	9
2565	9	CODON 12	ACCGACGGC	10
2567	11	CODON 12	CACCGACGGCG	11
2568	13	CODON 12	ACACCGACGGCGC	12
2569	15	CODON 12	CACACCGACGGCGCC	13
3426	16	CODON 12	CCACACCGACGGCGCC	14
3427	16	CODON 12	CACACCGACGGCGCCC	15
2570	17	CODON 12	CCACACCGACGGCGCCC	3
3428	18	CODON 12	CCCACACCGACGGCGCCC	16
3429	18	CODON 12	CCACACCGACGGCGCCCA	17
2571	19	CODON 12	CCCACACCGACGGCGCCCA	4
2566	21	CODON 12	GCCCACACCGACGGCGCCAC	5
2560	23	CODON 12	TGCCCACACCGACGGCGCCACC	6
2561	25	CODON 12	TTGCCCACACCGACGGCGCCACCA	18
907	17	CODON 12	CCACACCGCCGGCGCCC	19

(vad típus)

Az oligonukleotid hosszúsága befolyásolja az antiszensz aktivitást és a specifitást

A H-ras-gén 12. kódonjában található pontmutációt célzó oligonukleotidok hatékonynak bizonyultak a ras-luciferáz expresszió gátlásában is. Előállítottunk 11 foszforitot oligonukleotidot, melyek hossza 5 és 25 bázis közötti volt, és az oligonukleotidok mutáns és vad típusú ras-luciferáz expressziót gátló aktivitását tranziens transzfekciós vizsgálati eljárásokban határoztuk meg, a 2-5. példákban leírtak szerint. Az oligonukleotidok adatait a 2. táblázatban adjuk meg. A 15-tagú vagy annál hosszabb oligonukleotidok 100 nmól/l koncentrációban alkalmazva gátolták a mutáns H-ras célpont expresszióját. A vad típusú ras-luciferáz gén expressziójának gátlásához képest szelektív gátlást mutattak a 15 és 19 bázis közötti hosszúságú oligonukleotidok. A legnagyobb szelektivitást a mutáns ras-luciferáz expressziójának gátlásában a vad típusú forma gátlásához képest a 2570-jelű (szekvenciaazonosító szám: 3) 17-tagú oligonukleotid mutatta, a szelektivitás kb. 4-szeres volt. Annak igazolása érdekében, hogy a 2570-jelű oligonukleotid szekvenciaspecifikus módon hatott, megvizsgáltuk ennek az oligonukleotidnak egy variánsát is (2907; szekvenciaazonosító szám: 19), mely oligonukleotidban a központi adenozint citozinra cseréltük, és így módon ez az oligonukleotid tökéletesen komplementer lett a vad típusú H-ras célponttal. Az elmondottak értelmében amennyiben ez az oligonukleotid a mutáns H-ras-szekvenciával hibridizálódik, az oligonukleotid/RNS-duplex középpontjában található lesz két egymással nem párosodó bázis. Amint azt a 7. ábrán láthatjuk a 2907-jelű oligonukleotid szelektíven gátolta a vad típusú ras-luciferáz expresszióját a

mutáns ras-luciferázhoz képest, és a szelektivitás kb. 5-szörös volt, 100 nmól/l-es oligonukleotid dózisinál.

Vizsgáltunk egy 16-tagú és egy 18-tagú oligonukleotidot, melyek a mutáns 12. kódon körüli régióval voltak komplementerek (5. ábra, 2. táblázat), a 2-5. példákban leírtak szerint. A 8. ábrán egy olyan kísérlet eredményeit láthatjuk, amelyben 13, 15, 16, 17, 18 és 19 bázishosszúságú oligonukleotidok antiszensz aktivitását és mutáns szelektivitását vizsgáltuk dózisfüggő módon. Az eredmények azt mutatták, hogy a mutáns H-ras-szekvenciával szemben aktív oligonukleotidok szelektívnek is bizonyultak; és a legnagyobb szelektivitást (sorrendben 4- és 5-szörös szelektivitást) a 16 bázis (szekvenciaazonosító szám: 14 és szekvenciaazonosító szám: 15) és a 17 bázis (szekvenciaazonosító szám: 3) hosszúságú oligonukleotidok mutatták. A 2568-jelű (szekvenciaazonosító szám: 12) oligonukleotid egyetlen vizsgált koncentrációban sem mutatott antiszensz aktivitást.

Dezoxi-réseket tartalmazó 2'-O-metil kiméra-oligonukleotidok

A mutáns szelektív 17-tagú oligonukleotid (2570) szekvenciájából kiindulva szintetizáltunk egy sor 2'-O-metil foszforotioát kiméra-oligonukleotidot, mely oligonukleotidok két szélső régiója 2'-O-metil nukleozidokat tartalmazott, a középső régió pedig "dezoxi-rést" képezett. A dezoxinukleozid-egységek száma 0 (teljes mértékben 2'-O-metil) és 17 (teljes mértékben dezoxi) között változott. Az oligonukleotidok adatait a 3. táblázatban foglaljuk össze.

3. táblázat

2'-O-metil végződéseket (félköréven szedve) és központi dezoxi-rést tartalmazó foszforotioát kiméra-oligonukleotidok
(célpont: mutáns 12. kódon)

oligonukleotid	dezoxiszám	szekvencia	szekv.az.szám
4122	0	CCACACCGACGGCGCCC	3
3975	1	CCACACCGACGGCGCCC	3
3979	3	CCACACCGACGGCGCCC	3
4236	4	CCACACCGACGGCGCCC	3
4242	4	CCACACCGACGGCGCCC	3
3980	5	CCACACCGACGGCGCCC	3
3985	7	CCACACCGACGGCGCCC	3
3984	9	CCACACCGACGGCGCCC	3
2570	17	CCACACCGACGGCGCCC	3

A felsorolt oligonukleotidokat jellemeztük hibridizációs hatékonyság szempontjából - a 6. példában leírtak szerint -, RNáz-H-hasítást aktiváló hasítás szempontjából - *in vitro*, emlős-RNáz-H alkalmazásával, a 8. példában leírtak szerint -, valamint antiszensz aktivitás szempontjából. A teljes hosszúságú H-ras-mRNS-sel szembeni antiszensz aktivitást a 9. példában leírtak szerint határoztuk meg, tranziens kotranszfekciós jelzőgénrendszer alkalmazásával, amelyben a H-ras-gén expresszióját egy ras-reszponzív enhanszer szekvenciárészlet alkalmazásával követtük, mely szekvenciárészlet a luciferáz-jelzőgénhez volt kapcsolva.

Foszforotioát antiszensz oligonukleotidok hibridizációja egyszálú 25-tagú RNS-célponthoz

Az 5. ábrán és a 2. táblázatban megadjuk 15 foszforotioát oligonukleotid szekvenciáit, melyek célpontja a 12. kódonban G→U pontmutációt tartalmazó aktivált H-ras-mRNS volt. Az oligonukleotidok hosszúsága 5 és 25 bázis közötti volt, és szekvenciájuk középpontjában található a pontmutáció. Meghatároztuk ezeknek az antiszensz oligonukleotidoknak az olvadáspontját (T_m) 25-tagú mutáns és vad típusú RNS-célpont vonatkozásában, 4 $\mu\text{mol/l}$ oligonukleotid koncentrációt alkalmazva. A T_m -értékek az oligonukleotidok hosszúságával együtt növekedtek és minden egyes nukleotid esetén a mutáns célponthoz hibridizált oligonukleotid olvadáspontja nagyobb volt a vad típusú célponthoz hibridizált oligonukleotid olvadáspontjánál. A 2907-jelű oligonukleotid a 2570-jelű oligonukleotid 17-tagú foszforotioát variánsa, amelyben a központi adenozint citozinra cseréltük, és ily módon ezt az oligonukleotidot a vad típusú H-ras célponttal tökéletesen komplementerré tettük. Ahogy az várható volt, ha ezt az oligonukleotidot a vad típusú célponthoz hibridizáltuk, a kialakult komplex olvadáspontja magasabb volt, mint amikor az oligonukleotidot a mutáns célponttal hibridizáltuk, mivel a mutáns célponttal hibridizálva a kialakult oligonukleotid/RNS-duplex a pontmutáció helyén két egymással nem párosodó bázist tartalmaz. A mutáns H-ras célponttal tökéletesen komplementer 17-tagú foszforotioát oligonukleotid (2570) termodinamikai paramétereit kiszámítottuk a T_m -érték oligonukleotid koncentráció függéséből. A kapott adatok felhasználásával meghatároztuk az oligonukleotidok mutáns célponttal történő hibridizálódása és a vad típusú

célponttal történő hibridizálódása közötti szabadenergia-különbségeket ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$). Egy adott nukleotid vonatkozásában a $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ értéket a T_m -érték oligonukleotid koncentráció függéséből lehet meghatározni [Borer, P.N. és mtsai.: J. Mol. Biol. 86, 843 (1974)]. A 2570-jelű oligonukleotid $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ -értéke +1,8 kcal/mól-nak adódott.

Az egyes oligonukleotidok vonatkozásában a mutáns és vad típusú ras-szekvenciák támadása közötti szelektivitás maximális mértéke jelentősen növekszik a $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ -érték növekedésével. Ezért elmondhatjuk, hogy az antiszensz oligonukleotidok olyan kémiai módosításai, melyek növelik a $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ -értéket, növelik a szelektivitást is. Egy ilyen lehetséges módosítás a 2,6-diaminopurin bázis beépítése, amelyről feltételezik, hogy a dA-bázisnál szorosabban kötődik az U-bázishoz, és a dA-bázisnál kevésbé szorosan kötődik a G-bázishoz, és ezért az ilyen módosítás esetén az A-U $\rightarrow$ A-G-cseréhez viszonyítva a $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ -érték nagyobb lesz. A találmány szerinti megoldás alkalmazásával az RNáz-H-enzim szubsztrát specifitását szintén kihasználhatjuk szelektivitás fokozása érdekében. Amennyiben ez az enzim nem képes kötni és hasítani nem-párosodó bázisokat tartalmazó duplexet, a $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ -értékből következő szelektivitásnál nagyobb szelektivitás érhető el, ha olyan kiméra-oligonukleotidokat alkalmazunk, melyekben az RNáz-H felismerőhelye tartalmazza a nem párosodó bázisokat. Azt találtuk, hogy pontosan ez a valóságos helyzet; az RNáz-H valóban képes megkülönböztetni a csak párosodó bázisokat tartalmazó duplexet az olyan duplexektől, melyek tartalmaznak két egymással nem párosodó bázist.

A "dezoxi-rést" tartalmazó oligonukleotidok hibridizálása rövid oligonukleotid célpontokhoz

A 6. példában leírtak szerint végrehajtott hibridizációs analízis, amelyben egy dezoxi-rést tartalmazó 2'-O-metil oligonukleotid sorozat hibridizációját vizsgáltuk egy 25-tagú szintetikus oligoribonukleotid célponttal, kimutatta, hogy egy adott oligonukleotid esetében a T_m -érték közvetlenül korrelációban van a 2'-O-metil tartalommal. Amennyiben a 2'-O-metil módosított nukleotid-egységeket dezoxinukleotid-egységekre cseréltük, a T_m -értékek módosításonként kb. 1,5 °C-al csökkentek. A kísérletekben meghatározott T_m -értékek a 2'-O-metil-módosításokat tartalmazó oligonukleotidok esetében magasabbak voltak, mint az azonos szekvenciájú teljes mértékben dezoxi oligonukleotidok T_m -értékei.

Dezoxi-rést tartalmazó oligonukleotidok hibridizációja strukturált mRNS célpontokhoz

További kísérletekben oligonukleotidokat hibridizáltunk nagyobb méretű H-ras célpontokhoz, amely a 12. kódon körüli régióban stabil hajtúszerkezetet tartalmazott. A 2'-O-metil-módosítások strukturált H-ras célpontokhoz történő antiszensz hibridizációra gyakorolt hatásait a 7. példában leírtak szerint "gél-shift" analízissel határoztuk meg.

Amint az a 9. ábrán látható, a teljes mértékben dezoxi 17-tagú oligonukleotid képezte a legkevésbé stabil duplexet a hajtú-alakú célponttal; a legstabilabb duplexet pedig a teljes mértékben 2'-O-metil 17-tagú oligonukleotid képezte. A dezoxi-rés méretének csökkenése, ami egyidejűleg a 2'-O-metil módosított nukleotid-egységek számának növekedését is jelentette, a duplex stabilitást fokozódását eredményezte.

Az RNS-célpont szekunder és terciér szerkezete befolyásolta az antiszensz oligonukleotidok hibridizációját. Előállítottunk egy sorozat 11-tagú kiméra-oligonukleotidot, melyek a ras-hajtű célpont különböző régióival voltak képesek hibridizálódni. Az ISIS-5055 oligonukleotid a hajtű szárának baloldali régiójához képes hibridizálódni (amennyiben a hajtű szerkezetet a 9. ábrán látható módon ábrázoljuk). Az ISIS-5056-jelű oligonukleotid a hurok baloldalához képes hibridizálódni. Az ISIS-5091-jelű oligonukleotid a hurok jobb oldalához, az ISIS-5147-jelű oligonukleotid pedig a hajtű szárának jobboldalához képes hibridizálódni. Valamennyi vizsgált oligonukleotid-egységesen foszforotioát oligonukleotid volt, középen 5 nukleotid-egységből álló dezoxi-rést tartalmaztak, melyeket 2'-O-metil módosított régiók szegélyeztek. Csak az a 11-tagú oligonukleotid kötődött a célponthoz mérhető módon, amely a hurok baloldalához volt képes hibridizálódni. A többi 11-tagú oligonukleotid nem kötődött a célponthoz kimutatható módon. Elkészítettük a vizsgált oligonukleotidok meghosszabbított változatait is. A kialakított 13-tagú oligoribonukleotidok mindegyike kimutathatóan kötődött a hajtű célponthoz, és a gél shift vizsgálat alapján megállapítottuk, hogy a legerősebb kötődést a hurok baloldalához hibridizálódó oligonukleotid mutatta.

Dezoxi-rést tartalmazó oligonukleotidok által kiváltott RNáz-H hasítás

A dezoxi-rést tartalmazó 2'-O-metil oligonukleotidok komplementer szálon történő RNáz-H-aktiváló képességét *in vitro* vizsgáltuk, RNáz-H forrásként HeLa-sejtek sejtmagkivonatát alkalmaztuk, a 8. példában leírtak szerint. Amint azt a 10. ábrán láthatjuk, nem tapasztaltunk hasítást a teljes mértékben 2'-O-metil módosított oligonukleotid esetén, sem pedig az egyet-

len dezoxi egységet tartalmazó oligonukleotid esetén. Azok az oligonukleotidok, melyek három, négy, öt, hét vagy kilenc nukleotid hosszúságú dezoxi-rést tartalmaztak, képesek voltak RNáz-H hasítást előidézni. A felsoroltak közül előnyösek az öt, hét vagy kilenc nukleotid hosszúságú dezoxi-rést tartalmazó oligonukleotidok, legelőnyösebbek pedig a hét vagy kilenc nukleotid hosszúságú dezoxi-rést tartalmazók.

A dezoxi-rést tartalmazó oligonukleotidok antiszensz aktivitása teljes hosszúságú ras-mRNS-sel szemben

A 2'-O-metil-módosításokat tartalmazó oligonukleotidok fokozott célpont affinitásában megnyilvánuló előnyös sajátosságait ki lehet használni antiszensz gátlás fokozása céljából is, feltéve, hogy ezek az oligonukleotidok megfelelő hosszúságú RNáz-H érzékeny dezoxi-réseket tartalmaznak. A dezoxi-réseket tartalmazó 2'-O-metil oligonukleotidok teljes hosszúságú ras-mRNS-sel szemben mutatott antiszensz aktivitását a 9. példában leírt H-ras transzaktivációs jelzőgén rendszer alkalmazásával vizsgáltuk. Az antiszensz kísérleteket eleinte egyetlen oligonukleotid koncentráció (100 nmól/l) alkalmazásával végeztük. Amint ez a 11. ábrán látható, az öt vagy több nukleotid-egységnyi hosszúságú dezoxi-réseket tartalmazó 2'-O-metil kiméra-oligonukleotidok gátolták a H-ras-gén expresszióját. Ezeknek az oligonukleotidoknak nagyobb aktivitásuk volt, mint az azonos szekvenciájú teljes mértékben dezoxi oligonukleotidoknak.

Dózishatás-kísérleteket végeztünk az aktív oligonukleotidok, valamint négy dezoxinukleotid-egységet tartalmazó 2'-O-metil kiméra-oligonukleotidok alkalmazásával. Amint azt a 11B ábrán láthatjuk, a vizsgált oligonukleotidok a teljes hosszúságú H-ras-gén expresszióját dózisfüggő

módon gátolták. A legaktívabb vegyület a hét dezoxinukleotid-egységet tartalmazó kiméra volt, melynek aktivitása kb. ötször nagyobb volt, mint az azonos szekvenciájú teljes mértékben dezoxi oligonukleotidé.

Rövidített kiméra-oligonukleotidok

Rövid kiméra-oligonukleotidok esetén is azt találtuk, hogy a 2'-O-metil-módosítás növeli a célpont affinitást. Egy sor rövid 2'-O-metil kiméra-oligonukleotid T_m -értékét és antiszensz aktivitását vizsgáltuk teljes hosszúságú ras-gén vonatkozásában, a 9. példában leírtak szerint. A 4. táblázatban öt vagy hét nukleotid-egység hosszúságú rést tartalmazó 11-, 13-, 15- és 17-tagú nukleotidok T_m -értékeit foglaltuk össze. A teljes mértékben dezoxi 13-tagú oligonukleotiddal éles ellentétben mindkét 13-tagú 2'-O-metil kiméra gátolta a ras-expressziót, és a 11-tagú kimérák közül is aktívnak bizonyult az egyik. Ezeket az eredményeket a 12. ábrán láthatjuk.

4. táblázat

hosszúság	T_m (°C)	szekvencia	
szekv.az.sz.			
17	77.2	CCACACCGACGGCGCCC	3
15	69.8	CACACCGACGGCGCC	13
13	62.1	ACACCGACGGCGC	12
11	47.3	CACCGACGGCG	11
17	74.6	CCACACCGACGGCGCCC	3
15	66.2	CACACCGACGGCGCC	13
13	58.0	ACACCGACGGCGC	12
11	27.7	CACCGACGGCG	11

A viszonylagos antiszensz aktivitás és az RNáz-H-hasítást aktiváló képesség a 2'-O-metil kiméra-oligonukleotidok vonatkozásában *in vitro* jól korrelált a dezoxi-rés hosszával (13. ábra).

Aszimmetrikus dezoxi-rések alkalmazása

Nem szükséges, hogy a dezoxi-rés a kiméra-molekula középpontjában legyen. Azt találtuk, hogy azok a kiméra-molekulák, melyekben a nukleotidok az egyik véghez közeli régióban a 2'-pozícióban módosítva vannak a kötése erősség fokozása céljából, és a molekula többi része módosítatlan (2'-dezoxi), képesek voltak gátolni a ras-expressziót. A 3. azonosítószámú szekvenciával bíró oligonukleotidok (17-tagú oligonukleotidok, a mutáns 12. kódon körüli régióval komplementerek), melyekben a hét nukleotid-egységnyi hosszúságú dezoxi-rés a nukleotidnak akár az 5'- akár a 3'-végére volt elhelyezve, akár pedig a molekula középső részén különböző pozíciókban, képesek voltak RNáz-H-t aktiválni, és rendelkeztek antiszensz aktivitással. Mindazáltal azt találtuk, hogy az öt nukleotid-egységnyi hosszúságú dezoxi-rés esetében már nem mindegy, hogy a rés pozíciója az oligonukleotidon belül milyen, mivel bizonyos rés- pozíciók esetén a kialakult duplex nem aktiválta megfelelően az RNáz-H-t és az ilyen oligonukleotidok gyenge antiszensz inhibitornak bizonyultak. Éppen ezért a dezoxi-rés hosszúsága előnyösen hét nukleotid-egységnyi.

Egyéb cukormódosítások

Vizsgáltuk a 2'-O-metil-módosítástól eltérő 2'-cukormódosítások hatását is a kiméra-oligonukleotidok antiszensz aktivitására. A vizsgált módosítások felsorolását az 5. táblázatban adjuk meg, ahol feltüntetjük azokat a T_m -értékeket is, melyeket a 6. példában leírtak szerint úgy kaptunk, hogy az

adott 17-tagú oligonukleotidot, amelyben egy hét nukleotid-egységnyi dezoxi-rést az adott 2'-módosított nukleotidok szegélyeztek, 25-tagú oligoribonukleotid célpontához hibridizáltunk. A vizsgált oligonukleotidok esetén összefüggést vettünk észre a T_m -érték és a 2'-pozícióban található alkil lánc hossza között. Az alkil lánc hosszának növekedésével a T_m -érték csökkent. A vizsgált oligonukleotidok közül a 2'-fluor kiméra-oligonukleotidok T_m -értéke volt a legmagasabb.

5. táblázat

Összefüggés 7-tagú dezoxi-rést tartalmazó 17-tagú 2'-módosított oligonukleotidok T_m -értékeinek összefüggése antiszensz aktivitásukkal

Szekvencia: CCACACCGACGGCGCCC (szekvenciaazonosító szám: 3)

2'-módosítás	T_m (°C)	IC ₅₀ (nmól/l)
deoxi	64,2	150
O-pentil	68,5	150
O-propil	70,4	70
O-metil	74,7	20
fluor	76,9	10

Vizsgáltuk a felsorolt 2'-módosított oligonukleotidok H-rassal szemben antiszensz aktivitását, a transzaktivációs jelzőgénrendszer alkalmazásával, a 9. példában leírtak szerint. Amint azt a 14. ábrán és az 5. táblázatban láthatjuk valamennyi vizsgált 2'-módosított kiméra-oligonukleotid gátolta a ras-expressziót, és a 7-tagú dezoxi-rést tartalmazó 2'-fluor oligonukleotid

volt a legaktívabb. A középén elhelyezkedő 5-tagú dezoxi-rést tartalmazó 2'-fluor kiméra-oligonukleotid szintén aktívnak bizonyult.

Összehasonlítottuk a 3. szekvenciaazonosító számú kiméra-foszforotioát oligonukleotidot, amelyben 5- vagy 7-tagú dezoxi-rést 2'-O-propil régiók szegélyeztek, 2'-O-metil kiméra-oligonukleotidokkal. A ras-gén expresszióját T24-sejtekben gátolták azok a 2'-O-metil és 2'-O-propil kiméra-oligonukleotidok, melyekben egy 7-tagú dezoxi-rés volt található és gerincük egységesen foszforotioát kötésekkel tartalmazott. Amennyiben a dezoxi-rés hosszát öt nukleotidra csökkentettük, csak a 2'-O-metil oligonukleotid gátolta a ras-expressziót.

A H-ras-gén expressziójának gátlása ráksejtekben antiszensz oligonukleotidok alkalmazásával

A 10. példában leírtak szerint vizsgáltunk két foszforotioát oligonukleotidot (2502, 2503), melyek szekvenciája komplementer volt a ras-gén AUG-régiójával, valamint két kiméra-oligonukleotidot (4998, 5122), melyek szekvenciája azonos volt, és 7-tagú dezoxi-rést tartalmaztak, melyet 2'-O-metil régiók szegélyeztek. Ezeket a kiméra-oligonukleotidokat a 6. táblázatban mutatjuk be.

6. táblázat

Központi dezoxi-rést és 2'-O-metil végződéseket (félkövéren szedve) tartalmazó kiméra-foszforotioát oligonukleotidok

(célpont: AUG)

oligo jele	dezoxi-rés	szekvencia	szekv.az.sz.
2502	20	CTTATATTCCGTCATCGCTC	1
4998	7	CTTATATTCCGTCATCGCTC	1
2503	20	TCCGTCATCGCTCCTCAGGG	2
5122	7	TCCGTCATCGCTCCTCAGGG	2

A 2503-jelű oligonukleotid T24-sejtekben 71 %-osan gátolta a ras-expressziót, és a 4998-jelű kiméra-oligonukleotid a ras-mRNS expresszióját még ennél is jobban gátolta (84 %-os gátlás). A 2502-jelű oligonukleotid, amely szintén az AUG-régióval komplementer, a ras-RNS szintet 26 %-al csökkentette, és ennek az oligonukleotidnak a kiméra-változata (5122) 15 %-os gátlást eredményezett. Az említett eljárással vizsgáltunk két olyan oligonukleotidot is, melyek célpontja a mutáns 12. kódon volt. A 2570-jelű oligonukleotid (szekvenciaazonosító szám: 3) a ras-RNS-szintet 82 %-al csökkentette, ugyanennek az oligonukleotidnak a 2'-O-metil kiméra-változata, amely 7-tagú dezoxi-rést tartalmazott (3985) a ras-RNS-szintet 95 %-al csökkentette.

A 2570- és 2503-jelű oligonukleotidok ras-expresszióra kifejtett hatását HeLa-sejtekben is vizsgáltuk, melyek vad típusú (azaz nem aktivált) 12. H-ras kódont tartalmaznak. Bár ezen oligonukleotidok mindegyike gátolta a ras-expressziót T24-sejtekben (melyek aktivált 12. kódont tartalmaznak), HeLa-sejtekben a ras-expressziót csak a 2503-jelű oligonukleotid gátolta, amely a ras-AUG-kódon környezetével képes specifikusan hibridizálódni. A 2570-jelű oligonukleotid (szekvenciaazonosító szám: 3), amely az aktivált 12. kódonnal képes specifikusan hibridizálni, nem gátolta a ras-expressziót HeLa-sejtekben, mivel ezek a sejtek nem tartalmazzák az aktivált 12. kódon célpontot.

Vizsgáltuk a 2570-jelű oligonukleotid - egy 17-tagú foszforotioát oligonukleotid, melynek szekvenciája az aktivált H-ras-gén 12. kódonja körüli régióval komplementer - ras-expressziógátló képességét (a 10. példában

leírtak szerint) T24-sejtekben, és ugyanebben a kísérletben vizsgáltuk a 3980-, 3985- és 3984-jelű kiméra-foszfotioát 2'-O-metil oligonukleotidok ras-expressziógátló hatását is, az utóbbi oligonukleotidok szekvenciája a 2570-jelű oligonukleotid szekvenciájával azonos, és sorrendben 5-, 7- és 9-tagú dezoxi-réseket tartalmaznak (lásd 3. táblázat). Mind a 2570-jelű teljes mértékben 2'-dezoxi oligonukleotid, mind pedig a három kiméra-oligonukleotid csökkentette a ras-mRNS-szintet T24-sejtekben. A 3985-jelű (7-tagú dezoxi-rés) és a 3984-jelű (9-tagú dezoxi-rés) oligonukleotidok 81 %-al csökkentették a ras-mRNS-szintet, a 3980-jelű oligonukleotid (öttagú dezoxi-rés) a ras-mRNS-szintet 61 %-al csökkentette. Azok a kiméra-oligonukleotidok, melyek szekvenciája azonos volt az előbbi nukleotidokkal, de 5-tagú dezoxi-rést (4689) vagy 7-tagú dezoxi-rést (4690) szegélyező 2'-fluor módosított régiókat tartalmaztak, szintén gátolták a ras-mRNS expresszióját T24-sejtekben, és a 7-tagú dezoxi-rést tartalmazó oligonukleotid bizonyult aktívabbnak (82 %-os gátlás, az 5-tagú dezoxi-rést tartalmazó 2'-fluor kiméra 63 %-os gátlást idézett elő).

Ráksejtek proliferációjának gátlása antiszensz oligonukleotidokkal

Vizsgáltuk három 17-tagú oligonukleotid hatását T24-ráksejtek proliferációjára, a 11. példában leírtak szerint. Az oligonukleotidok szekvenciája azonos volt (szekvenciaazonosító szám: 3) és szekvenciájuk az aktivált ras-gén 12. kódonja körüli régióval volt komplementer. Mindhárom vizsgált oligonukleotid foszfotioát-gerincet tartalmazott, a 3985-jelű oligonukleotidban egy 7-tagú dezoxi-rést 2'-O-metil nukleotidok szegélyeztek, és a 4690-jelű oligonukleotidban egy 7-tagú dezoxi-rést 2'-F nukleotidok szegélyeztek. A vizsgált oligonukleotidok hatása a ráksejtek

proliferációjára jól korrelált ugyanazok oligonukleotidok ras-mRNS expresszióra kifejtett hatásával, melyet Northern-blot analízissel határoztunk meg: a 2570-jelű oligonukleotid a sejtproliferációt 61 %-osan gátolta, a 2'-O-metil kiméra-oligonukleotid (3985) a sejtproliferációt 82 %-osan gátolta, és a 2'-fluor kiméra analóg a sejtproliferációt 93 %-osan gátolta. A fenti oligonukleotidok sejtproliferációgátló hatásának dózis-hatás-összefüggéseit is megvizsgáltuk, és kimutattuk, hogy az oligonukleotidok a 25 nmól/l-100 nmól/l koncentráció-tartományban a sejtproliferációt dóziszfüggő módon gátolják. A 4690-, 3985- és 2570-jelű oligonukleotidok IC₅₀-értékei sorrendben 44 nmól/l-nek, 61 nmól/l-nek és 98 nmól/l-nek adódtak. A véletlenszerű szekvenciájú kontroll oligonukleotidok a vizsgált dózisokban gátló hatást nem mutattak.

Az ISIS-2570-jelű oligonukleotid sejtproliferációra kifejtett hatása sejttípus-specifikus volt. Ez az oligonukleotid a T24-sejtek proliferációját négyszer olyan erősen gátolta, mint a HeLa-sejteket, azonos oligonukleotid koncentráció alkalmazása esetén (100 nmól/l). Az ISIS-2570-jelű oligonukleotid célpontja az aktivált (mutáns) 12. ras-kódon, amely a T24-sejtekben megtalálható, viszont a HeLa-sejtekben nem, mivel a HeLa-sejtek a vad típusú 12. kódot hordozzák.

Gerincmódosított kiméra-oligonukleotidok

Az előzőekben tárgyalt oligonukleotidok egységes foszforotioát-gerinccel rendelkeztek. Az előbbieken tárgyalt 2'-módosított kiméra-oligonukleotidok, amennyiben egységes foszfodiészter-gerinccel rendelkeznek, nem aktívak. Előállítottunk egy kiméra-oligonukleotidot (ISIS-4226), amelyben egy 5-tagú dezoxi-rést 2'-O-metil régiók szegélyeztek, és az

oligonukleotid a dezoxi-rés régióban P=S-gerincet, a szegélyező régiókban pedig P=O-gerincet tartalmazott. Előállítottunk egy másik kiméra-oligonukleotidot is (ISIS-4223), amely a rés régióban P=O-gerincet, a szegélyező régióban pedig P=S-gerincet tartalmazott. Ezeket az oligonukleotidokat a 7. táblázatban mutatjuk be.

Szintetizáltunk további oligonukleotidokat is, melyek kizárólag 2'-dezinukleotid-egységeket tartalmaztak, és gerincük túlnyomórészt foszforotioát kötésekkel tartalmazott, de a molekula középpontjában volt bennük egy foszfodiészter (ISIS-4248), két foszfodiészter (ISIS-4546), három foszfodiészter (ISIS-4551), négy foszfodiészter (ISIS-4593), öt foszfodiészter (ISIS-4606) vagy tíz foszfodiészter kötés is (ISIS-4241). Ezeket az oligonukleotidokat is a 7. táblázatban mutatjuk be.

7. táblázat

Központi dezoxi-rést és 2'-O-metil végződéseket (félkövér) tartalmazó

kiméra-gerincű (P=S/P=O) oligonukleotidok

[a gerincben található kötések S (P=S) vagy O (P=O) betűkkel jelöltük;

célpont: mutáns 12. kódon]

oligo jele	P=S	szekvencia	szekv.az.szám
2570	16	CsCsAsCsAsCsCsGcAsCsGsGsCsGsCsCsC	3
4226	5	CoCoAoCoAoCsCsGsAsCsGoGoCoGoCoCoC	3
4233	11	CsCsAsCsAsCoCoGoAoCoGsGsCsGsCsCsC	3
4248	15	CsCsAsCsAsCsCsGsAoCsGsGsCsGsCsCsC	3
4546	14	CsCsAsCsAsCsCsGoAoCsGsGsCsGsCsCsC	3
4551	13	CsCsAsCsAsCsCsGoAoCoGsGsCsGsCsCsC	3
4593	12	CsCsAsCsAsCsCoGoAoCoGsGsCsGsCsCsC	3
4606	11	CsCsAsCsAsCsCoGoAoCoGoGsCsGsCsCsC	3
4241	6	CsCsAsCoAoCoCoGoAoCoGoGoCoGsCsCsC	3

Az oligonukleotidokat nyers HeLa-sejtkivonattal inkubáltuk 37 °C-on nukleázos degradációval szemben érzékenységük meghatározásának céljából, Dignam és mtsai. eljárása szerint [Nucleic Acids. Res. 11, 1475 (1983)]. A 423-jelű oligonukleotid, amelyben egy 5-tagú diészter rést foszforotioát/2'-O-metil régiók szegélyeztek, $T_{1/2}$ -értéke hét órának bizonyult. A foszforotioát/2'-O-metil végződés között 5-tagú foszforotioát rést tartalmazó oligonukleotid $T_{1/2}$ -értéke 30 órának adódott. Megvizsgáltuk egy sorozat oligonukleotid nukleázérzékenységét is, melyek 1-10 diészter-kötést tartalmaztak. A 4248-jelű oligonukleotid, amely egyetlen foszfodiészter kötést tartalmazott, nukleázos degradációval szemben ugyanolyan stabilnak bizonyult, mint a kizárólag foszforotioát kötések tartalmazó oligonukleotid, az ISIS-2570, és HeLa-sejtkivonatban öt órás inkubáció után sem volt kimutatható a degradációja. A kettő, három, négy, öt és tíz dezoxi kötést tartalmazó oligonukleotidok $T_{1/2}$ -értékei sorrendben a következők voltak: 5,5 óra, 3,75 óra, 3,2 óra, 1,75 óra és 0,9 óra.

A gerincmódosított kiméra-oligonukleotidok antiszensz aktivitása

Az antiszensz aktivitás meglétéhez nem szükséges, hogy az oligonukleotid foszforotioát-gerinccel rendelkezzen. Az ISIS-4226- és ISIS-4233-jelű oligonukleotidok ras-expressziót gátló hatását a 2-5. példákban leírtak szerint, ras-luciferáz-jelzőgénrendszer alkalmazásával vizsgáltuk. Ugyanebben a rendszerben megvizsgáltuk az ISIS-2570 (kizárólag foszforotioát kötések tartalmazó, teljesen dezoxi oligonukleotid), az ISIS-3980 (kizárólag foszforotioát kötések tartalmaz, a közepén levő dezoxi-rést 2'-O-metil régiók szegélyezik) és az ISIS-3961 jelű (kizárólag foszfodiészter kötések tartalmaz, a középső dezoxi-rést 2'-O-metil régiók

szegélyezik) oligonukleotidokat is. Valamennyi olyan oligonukleotid, amely tartalmazott egy P=S (azaz nukleázrezisztens) rés-régiót, gátolta a ras-expressziót. A kísérlet eredményeit a 15. ábrán láthatjuk. Megvizsgáltuk két teljes mértékben 2'-deoxi oligonukleotid aktivitását is, melyek foszforotioát-gerince vagy egyetlen foszfodiészter kötést (4248) vagy tíz foszfodiészter kötést (ISIS-4241) tartalmazott. Az egyetlen P=O kötést tartalmazó oligonukleotid ugyanolyan aktívnak bizonyult, mint a kizárólag P=S kötések tartalmazó molekula, míg az azonos szekvenciájú oligonukleotid, amely 10 P=O kötést tartalmazott, teljesen inaktív volt.

Előállítottunk olyan 3. azonosítószámú szekvenciájú foszforotioát-gerincet tartalmazó oligonukleotidokat is, melyek kizárólag a 7-tagú deoxi-résben tartalmaztak foszforotioát-gerincet, a szegélyező régiókban pedig foszfodiészter kötések tartalmaztak, az oligonukleotidok 2'-O-metil vagy 2'-O-propil-módosításokat tartalmaztak. Az az oligonukleotid, amely a 2'-propil diészter szegélyező régiókat tartalmazta, képes volt ras-expressziót gátolni.

A ras-luciferáz génexpresszió gátlása módosított bázisokat tartalmazó antiszensz oligonukleotidokkal

Előállítottunk egy sor foszforotioát antiszensz oligonukleotidot, melyek szekvenciája az aktivált ras-gén pontmutációt tartalmazó 12. kódonja körüli régió szekvenciájával volt komplementer, az ismertetett módon. Az oligonukleotidok az elmutált 12. kódon uracil bázisával szemköztí pozícióban 2'-(amino)-adenint tartalmaztak. Mivel az adenin 2-es pozíciójában aminocsoport található, ez a bázis képes hidrogénkötést kialakítani az uracil 2-es pozíciójában található oxigénnel, és így módon a szokásos két hidrogén

híd helyett három hidrogén híd alakul ki. Ez a módosítás nagy mértékben stabilizálja a 2-(amino)-adenin-módosított antiszensz oligonukleotid aktivált ras-génhez történő hibridizációját, míg ugyanezen módosítás a vad típusú 12. kódonhoz történő hibridizációt destabilizálja vagy semmilyen hatással nincs arra, mivel az ilyen hibridizáció esetében a kérdéses pozícióban egy módosított A és egy G bázis található, melyek egymással nem párosodnak. Ez a módosítás tehát fokozza a módosított oligonukleotid kívánt célpont iránti specititását.

Azt találtuk, hogy egy oligonukleotid, amely a kérdéses pozícióban 2,6-(diamino)-adenozint tartalmazott, és egyébként módosítatlan, kizárólag foszforotioát kötésekkel tartalmazó 17-tagú oligonukleotid volt (szekvenciája azonos a 2570-jelű oligonukleotid szekvenciájával, szekvenciaazonosító szám: 3) legalább olyan hatékony szubsztátja volt az RNáz-H-nak, mint a 2570-jelű oligonukleotid. Éppen ezért várhatóan ez az oligonukleotid egy hatásos antiszensz molekula. Kimutattuk, hogy az említett pozícióban 2,6-(diamino)-adenozint és egyébként módosítatlan bázisokat tartalmazó oligonukleotid, amely foszforotioát-gerincet és dezoxi-rést tartalmazott és szekvenciája az előző oligonukleotidokéival azonos volt, szintén aktiválja az RNáz-H-t.

Az oligonukleotidok *in vivo* antitumor aktivitása

Megvizsgáltuk az ISIS-2503-jelű oligonukleotid (szekvenciaazonosító szám: 2) *in vivo* aktivitását humán tumorokkal szemben, a 13. és 14. példában leírtak szerint. Ezekben a vizsgálatokban csupasz egerekbe szubkután beültetett humán tüdőadenokarcinoma sejtvonalat (A549) alkalmaztunk, az egerekben a beültetés helyén tumor növekedett. Mivel ezek a sejtek a HA-

ras-génben nem tartalmaznak mutációt, hanem normális HA-rés-gént expresszálnak, kizárólag az ISIS-2503-jelű oligonukleotid antitumor aktivitását vizsgáltuk, mivel ennek az oligonukleotidnak a célpontja az AUG-kódon környéke.

Az első kísérletsorozatban foszforotioát oligonukleotidokat adtunk be sóoldatban, intraperitoneális injekció formájában, 20 ml/kg-os dózisban. A kezelést akkor kezdtünk, amikor a tumorok először váltak láthatóvá (a tumorsejtbeültetést követő 28. napon) és a kezelést minden második nap megismételtük. Amint a 16. ábrán láthatjuk, a nem hibridizálódó szekvenciájú ISIS-1082 jelű kontrol oligonukleotid alkalmazása esetén a tumor növekedésében semmiféle változást nem észleltünk. A HA-ras-specifikus ISIS-2503 (szekvenciaazonosító szám: 2) jelű oligonukleotid alkalmazása esetén azonban a tumornövekedés jelentős gátlódását figyeltük meg. A HA-ras-specifikus oligonukleotid tumorelles hatását először az első kezelést követő 20. napon figyeltük meg, és a hatás megfigyelhető maradt egészen a kísérlet befejezéséig.

Egy második kísérletsorozatban a foszforotioát oligonukleotidokat pationos lipiddel együtt szereltük ki (DMRIE:DOPE) és a 15. példában leírtak szerint a kezelést szubkután injektálással végeztük. A kezelést a tumorsejtek beültetését követően egy hét elteltével kezdtük meg, és csak négy héten keresztül folytattuk hetente három kezelést végezve. A kapott eredmények hasonlóak voltak az előző kísérletsorozatban kapott eredményekhez, a HA-ras-specifikus oligonukleotid (ISIS-2503; szekvenciaazonosító szám: 2) alkalmazása a tumor növekedésében jelentős csökkenést eredményezett, a nem hibridizálódó szekvenciájú kontrol oligonukleotid

(ISIS-1082) alkalmazása a tumornövekedésre kimutatható hatással nem volt (17. ábra). A tumortérfogat csökkenését először a látható tumor megjelenését követő 20. napon észleltük, és a csökkenés a kísérlet további részében is megfigyelhető maradt.

A 2'-módosított foszfodiészter oligonukleotidok stabilitása sejtekben

Ahhoz, hogy a sejtekben az antiszensz aktivitás kialakuljon, szükséges, hogy az oligonukleotidokat úgy módosítsuk, hogy nukleázos emésztéssel szemben stabilak legyenek. Azt találtuk, hogy bizonyos módosítások a cukoregység 2'-pozíciójában olyan mértékű nukleáz rezisztenciát okoznak, amely elégséges ahhoz, hogy az oligonukleotid sejtekben is antiszensz hatásnak bizonyuljon, gerincmódosítás nélkül is. Amint az a 18. ábrán látható, egy egységesen 2'-propoxi módosított foszfodiészter oligonukleotid (szekvenciaazonosító szám: 3) kimutathatóan gátolta a HA-ras expressziót T24-sejtekben, 24 órával az adagolás után, a gátlás mértéke megegyezett az azonos szekvenciájú foszforotioát 2'-dezoxi oligonukleotid által kifejtett gátlás mértékével. Az egységesen 2'-detoxi-módosításokat tartalmazó foszfodiészter oligonukleotid is mutatott bizonyos aktivitást. A 2'-pentoxi-módosításokat tartalmazó oligonukleotid legalább olyan aktívnak bizonyult, mint a 2'-propoxi-módosításokat tartalmazó.

A KI-ras-génnel szemben aktív antiszensz oligonukleotidok

Előállítottunk olyan oligonukleotidokat is, melyek a humán KI-ras onkogén 5'-végi nem transzlálódó régiójával, 3'-végi nem transzlálódó régiójával és a gén kódoló régiójával voltak komplementer szekvenciájúak [McGrath, J.P. és mtsai.: Nature 304, 501 (1983)]. A kódolón régió belül az előállított oligonukleotidok célpontja egyrészt a 12. és 61. kódon volt,

mely kódonokban bekövetkező mutációkról kimutatták, hogy KI-ras közvetítette transzformációhoz vezetnek, másrészt a 38. kódon, amelyről nem ismeretes, hogy szerepe volna a transzformációban. Az előállított oligonukleotidokat a 8. táblázatban mutatjuk be.

8. táblázat

A humán Ki-ras-génnel komplementer szekvenciájú antiszensz oligonukleotidok

Oligo jele	szekvenciája	célpont	szekv.az.szám
6958	CTG CCT CCG CCG CCG CGG CC	5' UTR/5' cap	20
6957	CAG TGC CTG CGC CGC GCT CG	5'-UTR	21
6956	AGG CCT CTC TCC CGC ACC TG	5'-UTR	22
6953	TTC AGT CAT TTT CAG CAG GC	AUG	23
6952	TTA TAT TCA GTC ATT TTC AG	AUG	24
6951	CAA GTT TAT ATT CAG TCA TT	AUG	25
6950	GCC TAC TCC ACC AGC TCC AAC	12. kódon (WT)	26
6949	CTA CGC CAC CAG CTC CA	12. kódon (WT)	27
6948	G TAC TCC TCT TGA CCT GCT GT	61.kódon (WT)	28
6947	CCT GTA GGA ATC CTC TAT TGT	38. kódon	29
6946	GGT AAT GCT AAA ACA AAT GC	3'-UTR	30
6945	GGA ATA CTG GCA CTT CGA GG	3'-UTR	31
7453	TAC GCC AAC AGC TCC	12. kódon (G→T mut.)	32

12 Ki-ras-specifikus oligonukleotid antiszensz aktivitását vizsgáltuk három olyan vastagbél karcinoma sejtvonal vonatkozásában, melyek a Ki-ras onkogén 12. kódonjában mutációt tartalmaztak, és az aktivitást a Ki-ras-mRNS-szint mérése alapján értékeltük. Amint az a 19. ábrán látható, a vizsgált oligonukleotidok fele jelentős aktivitást mutatott (legalább 40 %-os gátlás). A Ki-ras transzkriptummal szemben, a legaktívabbnak azok az oligonukleotidok bizonyultak, melyek célpontja az 5'- és a 3'-végi nem transzlálódó régiókban volt. Jelentős Ki-ras expressziógátlást figyeltünk meg azok oligonukleotidok esetében is, melyek célpontja a vad típusú 12. vagy 61. kódon volt. A jelentős aktivitású oligonukleotidok mindhárom vizsgált karcinóma sejtvonallal szemben hatásosak voltak.

Az előállított oligonukleotidok dózis-hatás-analízise alapján azt találtuk, hogy a Ki-ras-gén leghatásosabb inhibitorai a vizsgáltak közül az ISIS-6958 és az ISIS-6957 jelűek voltak, melyek célpontja az 5'-végi nem transzlálódó régióban volt. Ezeket az oligonukleotidokat megvizsgáltuk, hogy képesek-e Ki-ras transzformált sejtvonalak proliferációját gátolni. Az SV480-jelű vastagbél karcinoma sejtvonal sejtjeit egyetlen dózisoligonukleotiddal kezeltük (200 nmól/l), és azután a sejtszámot öt napon keresztül meghatároztuk. Amint azt a 20. ábrán láthatjuk, mindkét Ki-ras-specifikus oligonukleotid az SV480-sejtek proliferációjának hatékony inhibitora volt, és az ISIS-6957 (szekvenciaazonosító szám: 21) oligonukleotid nagyobb aktivitásúnak bizonyult, mint az ISIS-6958 jelű (szekvenciaazonosító szám: 20). Ez az aktivitásban megfigyelhető különbség jól korrelál a Ki-ras-mRNS expresszió gátlásának mértékével (19. ábra).

A mutáns Ki-ras-gén szelektív gátlása normális Ki-ras-génhez viszonyítva

Megvizsgáltuk a Ki-ras-gént célzó oligonukleotidok normális Ki-ras-génhez viszonyított szelektív gátló hatását mutáns Ki-ras-gén vonatkozásában. A vizsgálatban két különböző sejtvonalat alkalmaztunk: egyrészt az SV480-sejtvonalat, amely mutáns Ki-ras-gént expresszál (elmutált 12. kódon, G → T mutáció), másrészt a HeLa-sejtvonalat, amely normális Ki-ras-gént expresszál. Két különböző oligonukleotidot vizsgáltunk: ISIS-6957 (szekvenciaazonosító szám: 21), 20-tagú foszforotioát oligonukleotid, melynek célpontja a Ki-ras-gén 5'-végi nem transzlálódó régiójában van, és ISIS-7453 (szekvenciaazonosító szám: 32), egy 15-tagú foszforotioát oligonukleotid, melynek célpontja a Ki-ras-gén 12. kódon körüli régiója. A Ki-ras-mRNS-szintet a kezelést követően 24. órával mértük. A 12. kódot célzó oligonukleotid hatékonynak bizonyult a mutáns Ki-ras-gént expresszáló sejtvonalban. Amint azt a 21. ábrán láthatjuk, a Ki-ras-gén 5'-végi nem transzlálódó régióját célzó oligonukleotid mindkét sejtvonal esetén hatékonyan gátolta a Ki-ras expressziót. Azt találtuk, hogy a mutáns Ki-ras-gén iránti szelektivitás függött egyrészt az oligonukleotid alkalmazott koncentrációjától, másrészt az oligonukleotid RNS-célpont iránti affinitásától.

Dezoxi-réseket tartalmazó Ki-ras-specifikus oligonukleotidok

Előállítottunk olyan foszforotioát oligonukleotidokat (szekvenciaazonosító szám: 21; célpont: a Ki-ras-gén 5'-végi nem transzlálódó régiója), melyekben egy hat vagy nyolc nukleotid hosszúságú 2'-dezoxi-rést 2'-O-metil módosított régiók szegélyeztek. Amint azt Northern-blot analízissel megállapítottuk, mindkét dezoxi-rést tartalmazó oligonukleotid aktívnak bizonyult Ki-ras expresszióval szemben. Egy egysé-

gesen 2'-O-metil-módosítást tartalmazó oligonukleotid (melyben nem volt dezoxi-rés) inaktívnak mutatkozott. Azt találtuk, hogy egy további oligonukleotid, az ISIS-7679 jelű (szekvenciaazonosító szám: 33, a Ki-ras-gén 5'-végi nem transzlálódó régiójával és az AUG-régiójával komplementer) szintén aktív, amennyiben hat vagy nyolc tagú dezoxi-rést tartalmaz.

A találmány szerinti oligonukleotidokat kényelmesen és rutinszerűen előállíthatjuk a szakember számára jól ismert szilárdfázisú szintetikus eljárások alkalmazásával. Ilyen szintézisek végrehajtására alkalmas berendezéseket többek között az Applied Biosystems forgalmaz. Az oligonukleotidok előállítására alkalmazható egyéb szintetikus eljárás is, mindezáltal az alkalmazható eljárások ismerete a szakember köteles tudásához tartozik. Szakember számára jól ismert hasonló eljárások alkalmazásával előállíthatunk másfajta oligonukleotidokat is, például foszforotioát és alkilált származékokat.

A találmány szerinti oligonukleotidokat úgy terveztük, hogy szekvenciájuk komplementer legyen a H-ras-génből származó messenger-RNS szekvenciájával, és így képesek legyenek az említett messenger-mRNS-sel hibridizálódni. Amennyiben létrejön az ilyen hibridizáció, az megakadályozza a messenger-mRNS normális működését, és ennek következtében a messenger-mRNS által kódolt funkció a sejtből hiányozni fog. A találmány szerinti oligonukleotidok károsíthatják a messenger-mRNS bármely létfontosságú funkcióját, ilyenek lehetnek többek között: az RNS transzlokációja a protein transzláció helyszínére, az RNS templáton folyó proteintranszláció, az RNS egy vagy több mRNS molekulaféleséget eredményező érési folyamata, és az adott RNS-hez kapcsolódó esetleges független katalitikus aktivi-

tás. A találmány szerinti oligonukleotidok némelyikét úgy terveztük, hogy aktiválják a ras-mRNS RNáz-H által történő hasítását.

A többi emlős ras-gén, az N-ras és a K-ras fehérje termékének szekvenciája az első 85 aminosav tekintetében azonos a H-ras fehérjetermék szekvenciájával. A három ras-gén nukleinsav szekvenciája ismert, és bár ezek nem azonosak, szakember a jelen leírásban adott kitanítás felhasználásával képes olyan oligonukleotidokat előállítani, melyek képesek specifikusan hibridizálódni az N-ras és a K-ras-génekkal. Bár a találmány előnyös megvalósítási módjait olyan antiszensz oligonukleotidok jelentik, melyek képesek specifikusan hibridizálódni a H-ras-mRNS 12. kódonjával, szakember a leírásban adott kitanítás alkalmazásával képes olyan oligonukleotidokat előállítani, melyek képesek specifikusan hibridizálódni a ras-gén egyéb pontmutációival, különösen a H-ras, N-ras és a K-ras-gének 12., 13. és 61. kódonjaiban található pontmutációkkal, melyek szekvenciája jól ismert.

A találmány szerinti oligonukleotidok alkalmazhatók diagnosztikumokban, gyógyászati készítményekben és kutatási reagensekben, valamint reagenskészletekben. Mivel a találmány szerinti oligonukleotidok képesek a ras-génnel hibridizálódni, alkalmazásukkal könnyen kifejleszthetünk szendvics-típusú és egyéb vizsgálati eljárásokat. Továbbá, mivel a találmány szerinti oligonukleotidok preferenciálisan a ras-onkogén mutáns (aktivált) formájához képesek hibridizálódni, alkalmazásukkal kifejleszthetők olyan vizsgálati eljárások, melyek alkalmasak sejtek és szövetek vizsgálatára, abból a célból, hogy hordozzák-e a ras-gén vad típusából aktivált formájúvá történő átalakulását okozó mutációkat. Az ilyen vizsgálati eljárások alkalmazhatók

morfológiailag hasonló tumorok differenciális diagnózisára, valamint a ras-gén aktiválódásából származó fokozott rák kialakulási veszély kimutatására. Az oligonukleotid ras-génhez történő hibridizációjának kimutatására alkalmas eljárások végrehajtása szakember számára nem okoz gondot. A hibridizáció kimutatása megvalósítható az oligonukleotid enzimhez történő konjugálása vagy radióaktív jelzése útján, vagy bármely más alkalmas kimutatási rendszer alkalmazásával. Előállíthatók olyan reagenskészletek is, melyek alkalmasak a ras-gén vagy az aktivált ras-gén jelenlétének vagy hiányának kimutatására.

Az alábbi példákkal tovább kívánjuk szemléltetni a találmány szerinti megoldást, anélkül azonban, hogy igényünket az ismertetettekre korlátoz-
nánk.

1. példa

Oligonukleotid-szintézis

A szubsztituált és szubsztituátlan dezoxi oligonukleotidokat automatikus DNS-szintetizátoron szintetizáltuk (Applied Biosystems, 380B modell), közismert foszforamidált kémiát alkalmazva, az oxidációt jóddal végeztük. Foszforotioát oligonukleotidok előállításakor a standard oxidációs edényt olyan edényre cseréltük, amely 3H-1,2-benziditiol-3-on-1, 1-dioxid 0,2 mól/l-es acetonitriles oldatát tartalmazta, a foszfát kötések lépésenkénti tiálása céljából. A tiálási lépés időtartamát 68 másodpercre hosszabbítottuk meg, amelyet egy "sapkázó" lépés követett. Miután a megszintetizált oligonukleotidokat a CPG-oszlopról lehasítottuk, majd a védőcsoportokat 55 °C-on tömény ammóniumhidroxiban eltávolítottuk (18 óra alatt), az

oligonukleotidokat kétszer kicsapással tisztítottuk, 0,5 mól/l NaCl-oldatból 2,5 térfogatetanolal csaptuk ki őket. Ezt követően analitikai gélelektroforézist hajtottunk végre, 20 %-os akrilamid gélben, 8 mól/l karbamidot tartalmazó 454 mmól/l-es Tris-borát puffer alkalmazásával (pH=7,0). A poliakrilamid gélelektroforézis alapján megállapítottuk, hogy a reakciótermékek több, mint 80 %-ban a teljes hosszúságú oligonukleotidokat tartalmazták.

Az oligo ribonukleotidokat automata szintetizátor alkalmazásával szintetizáltuk, 5'-dimetoxi-tritil-2'-terc-butyl-dimetil-szilil-3'-O-foszforamiditek felhasználásával (American Bionetics, Hayward, CA). Az A, C és G bázisok exociklusos aminjainak védőcsoportjai fenoxi acetyl csoportok voltak [Wu, T., Oglivie, K.K. és Pon, R.T.: Nucl. Acids Res. 17, 3501 (1989)]. A szokásosan alkalmazott szintézisciklust módosítottuk, és a tetrazol bejutatását követő várakozási lépést 900 másodpercre hosszabbítottuk meg. Az oligonukleotidokról a védőcsoportokat metanolos ammóniában távolítottuk el, egy éjszakán át végzett szobahőmérsékleten történő inkubálással. Az oligonukleotidokat ezután vákumban megszárítottuk, és a 2'-szilil csoportot egy éjszakán át szobahőmérsékleten végzett inkubációval távolítottuk el, 1 mól/l-es tetrabutyl-ammonium-fluorid oldatban (Aldrich, Milwaukee, WI), az oldatot tetrahydrofuranban készítettük. Az oligonukleotidokat egy C18-jelű "Sep-Pak" oszlopon (Waters, Milford, MA) tisztítottuk, majd etanolos kicsapás következett. Analitikai denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel kimutattuk, hogy a reakciótermékek több, mint 90 %-ban a teljes hosszúságú RNS-oligonukleotidokat tartalmazták.

2. példa

Ras-luciferáz-jelzőgénrendszer

A leírásban bemutatott ras-luciferáz-jelzőgéneket PCR-technológia alkalmazásával állítottuk elő. Olyan láncindító oligonukleotidokat állítottunk elő, melyek alkalmasak voltak a humán H-ras-gén mind mutáns (12. kódon), mind nem mutáns (vad típusú) formája 1. exonja 5'-végi régióinak PCR-klónozására. A pT24-C3-plazmidot - amely tartalmazta a C-H-ras1 aktivált onkogént (12. kódon, GGC-GTC) - és a pbc-N1-plazmidot - amely tartalmazta a C-H-ras proto-onkogént - az "American Type Culture Collection" intézettől (Bethesda, MD) szereztük be. A pT3/T7-luc-plazmidot - amely tartalmazta az 1,9 kb-os szentjános bogár luciferáz gént - a Clontech Laboratories-től (Palo Alto, CA) szereztük be. A PCR-láncindító oligonukleotidokat szokásos PCR-reakciókörülmények között használtuk, templátként pedig mutáns és nem mutáns H-ras-gént alkalmaztunk. Az alkalmazott láncindítók egy 145 bázispáros DNS-termék amplifikálódását idézték elő, melynek szekvenciája megegyezett a normális vagy mutáns H-ras-gén -53 - + 65 nukleotidjainak szekvenciájával (a transzlációs kezdőponthoz viszonyítva), és ezt a szekvenciárészletet a DNS-terméken egy NheI és egy HindIII restrikciós endonukleáz hasítóhely szegélyezte. A PCR-terméket gélből tisztítottuk, a DNS-t kicsaptuk, a csapadékot mostuk, majd vízben felfuszpendáltuk, szokásos eljárások alkalmazásával.

A *P. pyralis* (szentjánosbogár) luciferáz génjének klónozására alkalmas PCR-láncindítókat úgy terveztük, hogy a keletkező PCR-termék a teljes hosszúságú luciferáz fehérjét kódolja, kivéve az aminoterminális metionint, amely aminosavat két másik aminosavval helyettesítettük egy amino-

terminális lizinnel és egy azt követő leucinnal. A luciferáz gén klónozására alkalmas PCR-láncindító oligonukleotidokat standard PCR-reakciókban használtuk, templátként pedig egy kereskedelmi forgalomban beszerezhető plazmidot (pT3/T7-Luc; Clontech) alkalmaztunk, amely tartalmazta a luciferáz-jelzőgént. Az alkalmazott láncindítók a luciferáz génnek megfelelő kb. 1,9 kb hosszúságú termék kialakulását idézték elő, melyet egyedi HindIII és BssHII restrikciós endonukleáz hasítóhelyek szegélyeztek. A kapott PCR-fragmentst gélből tisztítottuk, kicsaptuk, mostuk és vízben fel-szuszpendáltuk, szokásos eljárások alkalmazásával.

A ras-luciferáz fúziós jelzőgén összeállítását úgy fejeztük be, hogy a ras és a luciferáz géneket hordozó PCR-termékeket a megfelelő restrikciós endonukleázokkal megemésztettük, és az emésztett fragmenseket egy három résztvevős ligálási reakcióban egy olyan expressziós vektorban klónoztuk, amely tartalmazta a szteroiddal indukálható egér emlőrák-vírus MMTV-promóterét, a klónozáshoz NheI, HindIII és BssHII enzimeket használtunk. A kialakított plazmidban a H-ras-gén 5'-végi szekvenciái (-53 - +65) azonos leolvasási fázisban fuzionálódtak a szentjánosbogár luciferáz génnel. Az előzőek szerint kialakított expressziós vektor egy ras-luciferáz fúziós terméket kódol, melynek expressziója a szteroiddal indukálható MMTV-promóter szabályozása alatt áll. A kialakított plazmidkonstrukciók tartalmazzák az aktivált (RA2) vagy normális (RA4) formájú H-ras fehérje első 22 aminosavat kódoló szekvenciárészletet, amely a szentjánosbogár luciferázt kódoló szekvenciákkal azonos leolvasási fázisban van fuzionálva. A ras-luciferáz fúziós mRNS transzlációjának iniciációja a természetes H-ras-eredetű AUG-kodonon történik. Mind a mutáns, mind a normális szekvenciákat tartalmazó

H-ras-luciferáz fúziós konstrukciók szekvenciáját ellenőriztük, szokásos eljárások szerint végrehajtott DNS-szekvenciaanalízissel.

3. példa

Sejtek transzfektálása plazmid DNS-sel

A transzfekciós kísérleteket Greenberg eljárása szerint hajtottuk végre ["Current Protocols in Molecular Biology", szerk.: F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.A. Smith, J.G. Seidman és K. Strahl, John Wiley and Sons, NY], az alábbi módosításokkal. A HeLa-sejteket 60 mm-es tenyésztőtálcákra széleztettük, 5×10^5 sejt/tálca koncentrációban. Minden egyes tálcán található sejtekhez 10 vagy 12 μg DNS-t adtunk, ezen belül 1 μg mennyiségben egy olyan vektort, amely a patkány glukokortikoid receptort expresszált, a konstitutív Rous-féle szarkóma-vírus (RSV) promóterének szabályozása alatt, a sejtekhez adott DNS-mennyiség fennmaradó részét a ras-luciferáz-jelzőplazmid tette ki. A sejtekről a kalciumfoszfát-DNS csapadékot 16-20 óra elteltével távolítottuk el, Tris-szel puffereelt sóoldattal [50 mmól/l Tris-HCl (pH=7,5) 150 mmól/l NaCl] végzett mosással, a mosóoldat tartalmazott 3 mmól/l EGTTA-t is. A sejtekhez ezután 10 % magzati borjúsavót is tartalmazó Tris-táptalajt adtunk. Ebben az időpontban a sejteket a jelzőgén expresszió dexamethason-nal történő aktiválása előtt antiszensz oligonukleotidokkal előkezeltük.

4. példa

A sejtek kezelése oligonukleotidokkal

A plazmidokkal végrehajtott transzfekciót követően a sejteket foszfáttal pufferelt sóoldattal mostuk, melyet 37 °C-ra előmelegítettünk, és minden egyes tálcához (mélyületenként 1,0 ml mennyiségben) "Opti-MEM"-oldatot adtunk, amely tartalmazott 5 µg/ml N[1-(2,3-dioleiloxi)-propil]-N,N,N-trimetil-ammonium-kloridot (DOTMA). Az oligonukleotidokat 50 µmol/ml-es törzsoldatokból adtuk a tálcákba, majd a tálcákat 37 °C-on 4 órán keresztül inkubáltuk. A táptalajt ezután eltávolítottuk a sejtekről és 10 % magzati borjúsavót tartalmazó DMEM-táptalajjal helyettesítettük, ezután a sejteket további két órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk a megfelelő oligonukleotiddal a jelzett koncentrációkban, majd a jelzőgén expresszióját a sejtekhez 0,2 µmol/l végkoncentrációban adott dexametazonnal aktiváltuk. A sejteket a dexametazonos aktiválást követően 15 órával begyűjtöttük és luciferáz-aktivitásukat meghatároztuk.

5. példa

A luciferáz-aktivitás meghatározása

A luciferázt a sejtekből a sejtek triton X-100 detergenssel történő lizáltatása útján kivontuk, Greenberg, M.E. eljárása szerint ("Current Procols in Molecular Biology", szerk.: F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.A. Smith, J.G. Seidman és K. Strahl, John Wiley and Sons, NY). A luminesszencia csúcsértékét luciferin (Sigma) hozzáadása (625 µmol/l végkoncentrációban) után mértük, "Dynatech ML1000" luminométer alkalmazásával. Valamennyi sejtkivonat esetén több ízben el-

végeztük a luciferáz-aktivitás meghatározását, oly módon, hogy az extraktumból különböző mennyiségeket használtunk, ily módon biztosítva azt, hogy az aktivitás meghatározásához használt adatok a vizsgálati eljárás lineáris szakaszából származzanak.

6. példa

A duplexek olvadáspontjának meghatározása

Az abszorbancia hőmérsékletfüggését 260 nm-en határoztuk meg, egy IBM PC számítógéphez kapcsolt "Gilford 260" spektrofotométer alkalmazásával, valamint "Gilford Response II" spektrofotométer alkalmazásával. Az alkalmazott reakciópuffer összetétele a következő volt: 100 mmól/l Na^+ , 10 mmól/l foszfát, 0,1 mmól/l EDTA, pH=7. Az oligonukleotid koncentráció mindkét szál vonatkozásában 4 $\mu\text{mól/l}$ volt, a koncentráció a 85 °C-on mért abszorbancia értékből számítottuk az extinciókoefficiens ismeretében, Puglisi és Tinocco eljárása alapján [Methods in Enzymol, 180, 304 (1989)]. A T_m -értékeket, a duplex kialakulásának szabad energiáját, és az asszociációs konstans értékét oly módon határoztuk meg, hogy a mért adatokat egy kétállapotú modellel feleltük meg, lineárisan emelkedő alapvonal alkalmazásával [Petersheim, M. és Turner, D.H.: Biochemistry 22, 256 (1983)]. A megadott kísérleti eredményeket legalább három független kísérlet átlagaként kaptuk meg. Bizonyos oligonukleotidok esetében a duplex kialakulásának szabadenergia értékét oly módon is meghatároztuk, hogy ábrázoltuk a T_m -értékek reciprokát, a $\log_{10}$ (koncentráció) értékek függvényében [Borer, P.N., Dengler, B., Tinoco, I., Jr., és Uhlenbeck, O.C., J. Mol. Biol., 86, 843 (1974)].

7. példa

"Gél shift" vizsgálati eljárások

A strukturált ras-transzkriptum célpontot - egy 47 nukleotid hosszúságú hajtűalakú szerkezetet, amely tartalmazta az elmutált 12. kódot - Lima és mtsai. eljárása szerint - állítottuk elő és térképeztük. A hibridizációs reakciókat 20 µl térfogatban végeztük, a reakcióelegy összetétele a következő volt: 100 mmól/l nátrium, 10 mmól/l foszfát, 0,1 mmól/l EDTA, 100 cpm T7-generált mRNS (kb. 10 pmól/l) valamint antiszensz oligonukleotid 1 pmól/l és 10 µmól/l közötti koncentrációban. A reakcióelegyeket 24 órán át 34 °C-on inkubáltuk. A hibridizációt követően a reakcióelegyekhez felvivőpuffert adtunk, és a reakciótermékeket 20 %-os natív poliakrilamid gélen elválasztottuk, melyet 1 mmól/l MgCl₂-t tartalmazó 45 mmól/l-es Tris-borát pufferben (TBM) készítettünk. Az elektroforézist 10 °C-on végeztük, és a géleket "Molecular Dynamics Phosphorimager" alkalmazásával értékeltük ki.

8. példa

Az RNáz-H aktivitásának meghatározása

Az RNáz-H enzim aktivitásának meghatározását egy kémiai szintetizált 25 bázis hosszúságú oligoribonukleotid alkalmazásával végeztük, melynek szekvenciája az aktivált (12. kódon G → U) H-ras-mRNS +24 - +47 nukleotidjai közötti szekvenciának felelt meg. Az 5'-végén jelölt RNS-t 20 nmól/l koncentrációban alkalmaztuk, és tízszeres molaritás feleslegben lévő antiszensz oligonukleotidokkal inkubáltuk, a következő összetételű reakcióelegyben: 20 mmól/l Tris-HCl, pH = 7,5, 100 mmól/l KCl, 10 mmól/l

MgCl₂, 1 mmól/l ditiotreitol, 10 µg tRNS, és 4 E Rnazin, a reakcióelegy térfogata 10 µl volt. A reakcióelegyet 15 percig 37 °C-on előmelegítettük, majd lassan engedték szobahőmérsékletre hűlni. Az emlőseredetű RNáz-H forrásaként HeLa-sejtek sejtmagjainak kivonatát alkalmaztuk. A reakciókat 2 µg sejtmagkivonat (5 µl) hozzáadásával indítottuk, és a reakciókat 10 percig 37 °C-on engedték lejátszódni. A reakciókat ezután fenol/kloroformos extrakcióval állítottuk le, és az RNS-t etanollal kicsaptuk. A reakciótermékekből egyenlő rádióaktivitású mennyiségeket 7 mól/l karbamidot tartalmazó 20 %-os poliakrilamid gélre vittünk, és a hasítási termékeket elektroforézissel elválasztottuk, majd autoradiográfiával láthatóvá tettük. A hasítási termékek mennyiségét egy "Molecular Dynamics" által forgalmazott denzitométerrel határoztuk meg.

9. példa

Ras-transzaktivációs jelzőgén rendszer

A pSV2-oli expressziós plazmidot, amely egy aktivált (12. kódon, GGC → GTC) H-ras cDNS-inszertet tartalmazott a konstitutív SV40-promóter szabályozása alatt, dr. Bruno Tocque ajándéka volt (Rhone-Poulenc Sante, Vitry, France). Ezt a plazmidot használtuk templátként egy H-ras expressziós plazmid kialakítását célzó PCR-reakcióban, amely expressziós plazmidban a H-ras-gén a szteroiddal indukálható egér emlőrák vírus (MMTV) promóter szabályozása alatt állt. A H-ras kódoló szekvenciát úgy állítottuk elő, hogy a H-ras-gén 570 bázispár hosszúságú kódoló régióját PCR-eljárással amplifikáltuk. A PCR-láncindítókat úgy terveztük, hogy egyedi restriktációs hasítóhelyeket tartalmazzanak 5'-végi régiójukban, a

klónozás megkönnyítése céljából. A PCR-terméket, amely tartalmazta a 12. kódonban mutáns H-ras onkogén kódoló régióját, gélből tisztítottuk, megemésztettük, ismét gélből tisztítottuk, majd a megfelelő plazmidban klónoztuk. A kívánt konstrukciót úgy állítottuk elő, hogy az előzőek szerint izolált fragmenst a pMAMneo-plazmidba (Clontech Laboratories, CA) klónoztuk.

A ras expresszió kimutatására a pRDO53-jelű ras reszponzív jelzőgént használtuk [Owen és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 87, 3866 (1990)].

10. példa

Az *in vivo* ras-expresszió vizsgálata Northern-blot analízissel

A T24-jelű humán húgyhólyagrák sejtvonalat az "American Type Culture Collection" intézettől szereztük be (Rockville, MD). A sejteket L-glutamint tartalmazó McCoy-féle 5A-táptalajban tenyésztettük (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), amelyet 10 % hővel inaktivált magzati borjúsérummal egészítettünk ki, valamint 50 E/ml penicillinnel és 50 E/ml sztreptomocinnel. A sejteket 100 mm-es tenyésztőtálcákra oltottuk le. Amikor a sejtek 70 %-os konfluenciáig növekedtek, oligonukleotidokkal kezeltük őket. A tálcákat 10 ml előmelegített PBS-oldattal és 5 ml redukált szérumtartalmú Opti-MEM táptalajjal mostuk, amely 2,5 µl DOTMA-t tartalmazott. Ezután a kívánt koncentrációban oligonukleotidokat adtunk a sejtekhez. Négy órás inkubáció után a táptalajt McCoy-féle táptalajra cseréltük. A sejteket az oligonukleotidos kezelés után 48 órával begyűjtöttük, és a közismert CsCl-os tisztítási eljárás alkalmazásával RNS-t izoláltunk belőlük (Kingston, R.E.

eljárása a "Current Protocols in Molecular Biology" kézikönyvben: Ausubel, F.M. és mtsai., John Wiley and Sons, NY).

A HeLa-229-jelű humán epiteloid karcinóma sejtvonalat az "American Type Culture Collection" intézettől szereztük be (Bethesda, M.D.). A HeLa-sejteket hat mélyületű tenyésztőtálcákon egy rétegben tenyésztettük, Dulbecco-féle módosított Eagle-táptalajban (DMEM), melyet 10 % magzati borjúsavóval és 100 E/ml penicillinnel egészítettünk ki. Az oligonukleotidos kezelést és az RNS-izolálást lényegében a T24-sejtek esetén alkalmazott fent leírt eljárás szerint végeztük. Northern-hibridizáció: az izolált RNS-mintákból 10 µg-ot 1,2 %-os agaróz/formaldehid-gélben elektroforetizáltunk, majd az elválasztott RNS-mintákat egy éjszaka alatt átvittük GeneBind-45 nylon membránra (Pharmacia LKB, Piscataway, NJ), közismert eljárások alkalmazásával (Kingston, R.E. eljárása a "Current Protocols in Molecular Biology" kézikönyvben: Ausubel, F.M. és mtsai., John Wiley and Sons, NY). Az RNS-t UV-fény alkalmazásával a membránhoz kötöttük. Kettősszálú ³²P jelzett próbákat szintetizáltunk a "Prime a Gene" DNS jelölő reagenskészlet (Promega, Madison, WI) alkalmazásával. Ras-specifikus hibridizációs próbaként az aktivált (mutáns) H-ras-mRNS-ből származó cDNS klón SalI/NheI-fragmensét alkalmaztuk, a kiindulási mRNS GGC → GTC mutációt hordozott a 12. kódonban. Kontroll hibridizációs próbaként a G3PDH-jelű próbát alkalmaztuk. A membránra kötött mRNS-t 68 °C-on 15 percig előhibridizáltuk a "QuickHyb" hibridizációs oldat alkalmazásával (Stratagene, La Jolla, CA). A hővel denaturált radioaktív hibridizációs próbát (2,5 x 10⁶ beütés/2 ml hibridizációs oldat), melyet 100 µl 10 mg/ml-es lazacsperma-DNS oldattal kevertünk össze, a membránhoz

adtuk, és a hibridizációt egy órán át 68 °C-on végeztük. A membránokat ezután szobahőmérsékleten 2 x 15 percig mostuk 2 x SSC/0,1 % SDS-oldatban, majd egyszer 30 percig 60 °C-on 0,1 x SSC/0,1 % SDS-oldatban. A membránokat ezután autoradiografáltuk, és a jelintenzitást mennyiségileg egy "ImageQuant PhosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) alkalmazásával értékeltük ki. A Northern-blotokat tartalmazó membránokat először a ras-specifikus hibridizációs próbával hibridizáltuk, majd a kötődött hibridizációs próbát 0,1 X SSC/0,1% SDS-oldatban 15 percig tartó forralással eltávolítottuk, és a membránokat újrahibridizáltuk a G3PDH kontroll hibridizációs próbával, a megfelelő mintafelvitel ellenőrzése céljából.

11. példa

Ráksejtek proliferációjának gátlása antiszensz oligonukleotidokkal

Sejteket tenyésztettünk és oligonukleotidokkal kezeltük őket lényegében a 10. példában szerint. A sejteket 60 mm-es tenyésztőtálcákra oltottuk le, majd miután elérték a 70 %-os konfluenciát, DOTMA jelenlétében oligonukleotidokkal kezeltük őket. A kísérlet időbeli lefolyása a következő volt: az első napon a sejteket egyetlen dózis oligonukleotiddal kezeltük 100 nmól/l végkoncentrációban. A táptalajt naponta egyszer cseréltük, majd a harmadik naptól kezdődően a sejteket öt napon keresztül minden nap megszámoltuk, sejtszámláló kamra alkalmazásával. A dózis-hatás-összefüggést a következő kísérlettel vizsgáltuk: a sejtekhez különböző koncentrációban oligonukleotidokat adtunk (10, 25, 50, 100 vagy 250 nmól/l), majd a sejteket három nappal később begyűjtöttük és megszámoltuk őket. A 2570-, 3985-

és 4690-jelű oligonukleotidok T24-jelű ráksejtek proliferációjára kifejtett hatását vizsgáltuk meg.

12. példa

2-(amino)-adenin-szubsztituált oligonukleotidok szintézise

Az oligonukleotidokat az 1. példában leírtak szerint szintetizáltuk, a következő eltéréssel: azokban a pozíciókban, ahova a 2-(amino)-adenint be kívántuk juttatni, a szokásos foszfor-amiditet kereskedelmi forgalomban beszerezhető 2-amino-dezoxiadenozin-foszforamiditre cseréltük (Chemgenes).

13. példa

A549-sejtek tenyésztése

Az A549-sejteket [az "American Type Culture Collection" (Bethesda MD) intézettől szereztük be őket] konfluenciáig növesztettük 6 mélyületű tenyésztőtálcákban (Falcon Labware, Lincoln Park, NJ), Dulbecco-féle módosított Eagle-táptalajban (DME), amely 1 g/l glükózt tartalmazott, valamint 10 % magzati borjúsavót (FCS, Irvine Scientific, Santa Ana, CA).

14. példa

Intraperitoneális injekcióval csupasz egerekben juttatott humán tumorsejtek kezelése oligonukleotidokkal

Az A549-jelű humán tüdőkarcinóma-sejteket begyűjtöttük, és 5×10^6 -sejtet (200 μ l) szubkután csupasz egerek belső combjába injektáltunk. A kitapintható tumor a beoltást követően kb. egy hónappal alakult ki. Az egereknek intraperitoneálisan 20 mg / testsúly kg dózisban ISIS-2503 és 1082-

jelű (nem hibridizálódó kontrol oligonukleotid) foszforotioát oligonukleotidokat adtunk be, minden másnap kb. tíz héten keresztül. Ezalatt az idő alatt ellenőriztük az egerekben a tumor növekedését.

15. példa

Csupasz egerekben kationos lipidekkel együtt szubkután injekcióban bejuttatott humán tumorsejtek kezelése oligonukleotidokkal

Az A549-jelű humán tüdőkarcinóma sejteket begyűjtöttük és 5×10^6 sejtet (200 μ l) szubkután csupasz egerek belső combjába injektáltunk. Tapintható tumorok kb. egy hónap elteltével alakultak ki. A kationos lipidben kisserelt (DMRIE/DOPE, 60 mg/kg) foszforotioát szerkezetű ISIS-2503-jelű oligonukleotidot, valamint a nem hibridizálódó ISIS-1082-jelű kontroll oligonukleotidot szubkután adagoltuk, a tumor helyén (5 mg/kg dózisban). A kezelést a tumorsejtek beoltását követően egy héttel kezdtük meg, és a kezeléseket hetente kétszer, mindössze négy héten át végeztük. A tumor-növekedést kilenc héten át kísértük figyelemmel az egerekben.

16. példa

A 2'-módosított oligonukleotidok stabilitása T24-sejtekben

A T24-jelű húgyhólyagrák-sejteket a 10. példában leírtak szerint tenyésztettük. A sejteket egyetlen dózis (1 μ mól/l) oligonukleotiddal kezeltük, és 24 órával később Northern-blot eljárással vizsgáltuk a sejtek H-ras-mRNS-expresszióját. A vizsgált oligonukleotidok az ISIS-2570-jelű oligonukleotid (szekvenciaazonosító szám: 3) analógjai voltak, amely egy 17-tagú oligonukleotid, melynek célpontja a 12. H-ras kódon.

17. példa

A Ki-ras-specifikus oligonukleotidok aktivitása vastagbélrák-sejtekkel szemben

A Calu-1, SV480- és SV620-jelű humán vastagbélrák-sejtvonalakat az "American Type Culture Collection (ATCC)" intézettől szereztük be, és a 10. példában a HeLa-sejtek vonatkozásában leírtak szerint tenyésztettük és tartottuk fent őket. A sejteket egyetlen dózis oligonukleotiddal kezeltük (200 nmól/l) és a Ki-ras-mRNS expresszióját 24 órával később Northern-blot analízissel vizsgáltuk. A proliferációs kísérletek során a sejteket egyetlen dózis oligonukleotiddal kezeltük (200 nmól/l) a nulladik napon, és a sejtszámot öt napig kísértük figyelemmel.

18. példa

A mutáns és vad típusú Ki-ras-gének gátlása oligonukleotidok alkalmazásával

Az SV480-sejteket az előző példában leírtak szerint tenyésztettük. A HeLa-sejteket a 10. példában leírtak szerint tenyésztettük. A sejteket egyetlen dózis oligonukleotiddal kezeltük (100 nmól/l), és az mRNS-szinteket 24 órával később Northern-blot analízis alkalmazásával határoztuk meg.

SZEKVENCIALISTA

AZ 1. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: nem

AZ 1. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CTTATATTCC GTCATCGCTC 20

A 2. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: nem

A 2. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

TCCGTCATCG CTCCTCAGGG 20

A 3. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 17 bázispár

- 75 -

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 3. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CCACACCGAC GGCGCCC

17

A 4. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 19 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 4. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CCCACACCGA CGGCGCCCA

19

AZ 5. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 21 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

AZ 5. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GCCCACACCG ACGGCGCCCA C 21

A 6. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 23 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 6. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

TGCCACACCG GACGCGCCC ACC 23

A 7. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 7. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

TATCCGTCA TCGCTCCTCA 20

- 77 -

A 8. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 5 bázispár/

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 8. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CGACG

5

A 9. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 7 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 9. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CCGACGG

7

A 10. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 9 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENZ: igen

A 10. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

ACCGACGGC

9

A 11. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 11 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENZ: igen

A 11. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CACCGACGGC G

11

A 12. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENZ: igen

A 12. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

ACACCGACGG CGC

13

A 13. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 15 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 13. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CACACCGACG GCGCC 15

A 14. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 16 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 14. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CCACACCGAC GGCGCC 16

A 15. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 16 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 15. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CACACCGACG GCGCCC 16

A 16. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 18 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 16. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CCCACACCGA CGGCGCCC 18

A 17. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 18 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 17. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CCACACCGAC GGCGCCCA 18

A 18. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 25 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENZSZ: igen

A 18. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

TTGCCACAC CGACGGCGCC CACCA 25

A 19. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 17 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENZSZ: igen

A 19. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CCACACCGCC GGCGCCC 17

A 20. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 20. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CTGCCTCCGC CGCCGCGGCC 20

A 21. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 21. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CAGTGCCTGC GCCGCGCTCG 20

A 22. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 22. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

AGGCCTCTCT CCCGCACCTG 20

A 23. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 23. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

TTCAGTCATT TTCAGCAGGC 20

A 24. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 24. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

TTATATTCAG TCATTTTCAG 20

A 25. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 25. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CAAGTTTATA TTCAGTCATT 20

A 26. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 21 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 26. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GCCTACGCCA CCAGCTCCAA C 21

A 27. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 17 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 27. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CTACGCCACC AGCTCCA 17

A 28. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 21 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENZSZ: igen

A 28. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GTACTCCTCT TGACCTGCTG T 21

A 29. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 21 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENZSZ: igen

A 29. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CCTGTAGGAA TCCTCTATTG T 21

A 30. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 30. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GGTAATGCTA AAACAAATGC 20

A 31. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 31. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GGAATACTGG CACTTCGAGG 20

A 32. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 15 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 32. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

TACGCCAACA GCTCC 15

A 33. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 33. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

TTTTCAGCAG GCCTCTCTCC

20

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Oligonukleotid, amely 8-30 nukleotid-egységből áll, és képes specifikusan hibridizálódni a humán ras-génből származó kiválasztott DNS- vagy mRNS-molekulákkal, *azzal jellemezve*, hogy képes a H-ras-gén expresszióját gátolni.

2. Az 1. igénypont szerinti oligonukleotid, *azzal jellemezve*, hogy a nukleotid-egységek közötti kötőcsoportok legalább egyike foszforotioát-módosítást tartalmaz.

3. Az 1. igénypont szerinti oligonukleotid, *azzal jellemezve*, hogy nukleotid-egységeinek legalább egyike a 2'-pozícióban módosítva van.

4. A 3. igénypont szerinti oligonukleotid, *azzal jellemezve*, hogy a 2'-pozícióban 2'-O-alkil- vagy 2'-fluor-módosítást tartalmaz.

5. Az 1. igénypont szerinti oligonukleotid, *azzal jellemezve*, hogy a H-ras- vagy Ki-ras-génből származó DNS vagy mRNS molekulához képes specifikusan hibridizálódni.

6. Az 5. igénypont szerinti oligonukleotid, *azzal jellemezve*, hogy a humán H-ras-gén transzlációs iniciációs helyével vagy 12. kódonjával képes specifikusan hibridizálódni.

7. A 6. igénypont szerinti oligonukleotid, *azzal jellemezve*, hogy képes szelektíven gátolni az aktivált humán H-ras-gént.

8. A 7. igénypont szerinti oligonukleotid, *azzal jellemezve*, hogy szekvenciája megegyezik a 3., 4., 13., 14., 15., 16. és 17. azonosítószámú szekvenciák valamelyikével.

9. Az 5. igénypont szerinti oligonukleotid, *azzal jellemezve*, hogy képes specifikusan hibridizálódni a humán Ki-ras-gén 5'-végi nem transzlálódó régiójával, 3'-végi nem transzlálódó régiójával, 12. kódonjával vagy 61. kódonjával.

10. A 9. igénypont szerinti oligonukleotid, *azzal jellemezve*, hogy képes szelektíven gátolni az aktivált humán Ki-ras-gént.

11. A 10. igénypont szerinti oligonukleotid, *azzal jellemezve*, hogy szekvenciája megegyezik a 32. azonosítószámú szekvenciával.

12. Az 5. igénypont szerinti oligonukleotid, *azzal jellemezve*, hogy szekvenciája megegyezik az 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 11., 12., 13., 14., 15., 16., 17., 18., 19., 20., 21., 22., 26., 28., 31., 32. és 33. azonosítószámú szekvenciák valamelyikével.

13. Oligonukleotid, *azzal jellemezve*, hogy szekvenciája megegyezik a 2. azonosítószámú szekvenciával.

14. Oligonukleotid, *azzal jellemezve*, hogy szekvenciája megegyezik a 3. azonosítószámú szekvenciával.

15. Oligonukleotid, *azzal jellemezve*, hogy szekvenciája megegyezik a 21. azonosítószámú szekvenciával.

16. A 13., 14. vagy 15. igénypont szerinti oligonukleotid, *azzal jellemezve*, hogy tartalmaz legalább egy 2'-O-alkil- vagy 2'-fluor-módosítást.

17. Oligonukleotid, amely 8-30 nukleotid-egységből áll, és képes specifikusan hibridizálódni valamely humán ras-génből származó kiválasztott DNS- vagy mRNS-molekulával, *azzal jellemezve*, hogy szubsztrátja az RNáz-H-enzimnek, és tartalmaz legalább egy olyan módosítást, amely nö-

veli nukleáz rezisztenciáját, és legalább egy olyan módosítást, amelyik növeli a kiválasztott DNS vagy mRNS-molekula iránti affinitását.

18. Kiméra-oligonukleotid, amely 8-30 nukleotid-egységet tartalmaz, és képes specifikusan hibridizálódni valamely humán ras-génből származó kiválasztott DNS- vagy mRNS-molekulával, *azzal jellemezve*, hogy stabilizálva van nukleázos emésztéssel szemben, és tartalmaz egy első régiót, amely magában foglal legalább egy olyan nukleotidot, amely a célszekvencia iránti affinitás fokozása céljából módosítva van, és tartalmaz egy másik régiót, amely az RNáz-H-enzim szubsztrátja.

19. A 18. igénypont szerinti kiméra-oligonukleotid, *azzal jellemezve*, hogy azt a régiót, amely az RNáz-H-enzim szubsztrátja, olyan régiók szegélyezik, melyeket a célszekvencia iránti affinitás fokozása céljából módosítottak.

20. A 18. igénypont szerinti kiméra-oligonukleotid, *azzal jellemezve*, hogy célszekvencia-affinitásának növelése céljából módosított régiója tartalmaz legalább egy nukleotidot, amely a 2'-pozícióban módosítva van.

21. A 20. igénypont szerinti kiméra-oligonukleotid, *azzal jellemezve*, hogy 2'-pozícióban található módosításként 2'-O-alkil- vagy 2'-fluor-módosítást tartalmaz.

22. A 18. igénypont szerinti kiméra-oligonukleotid, *azzal jellemezve*, hogy abban a régiójában, amely szubsztrátja az RNáz-H-enzimnek, tartalmaz 4-9 darab 2'-dezoxinukleotid-egységet.

23. A 18. igénypont szerinti kiméra-oligonukleotid, *azzal jellemezve*, hogy a nukleotid-egységei közötti kötőcsoportok közül legalább az egyik foszforotioát-módosítást tartalmaz.

24. A 18. igénypont szerinti kiméra-oligonukleotid, *azzal jellemezve*, hogy H-ras- vagy Ki-ras-génből származó DNS- vagy mRNS-molekulával képes specifikusan hibridizálódni.

25. A 24. igénypont szerinti kiméra-oligonukleotid, *azzal jellemezve*, hogy képes specifikusan hibridizálódni a H-ras-gén transzlációs iniciációs helyével vagy 12. kódonjával.

26. A 24. igénypont szerint kiméra-oligonukleotid, *azzal jellemezve*, hogy képes specifikusan hibridizálódni a humán Ki-ras-gén 5'-végi nem transzlálódó régiójával, 3'-végi nem transzlálódó régiójával, 12. kódonjával vagy 61. kódonjával.

27. A 24. igénypont szerinti kiméra-oligonukleotid, *azzal jellemezve*, hogy szekvenciája megegyezik az 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 11., 12., 13., 14., 15., 16., 17., 18., 19., 20., 21., 22., 26., 28., 31., 32. és 33. azonosítószámú szekvenciák valamelyikével.

28. Eljárás humán ras-gén expressziójának gátlására, *azzal jellemezve*, hogy a humán ras-gént tartalmazó szöveteket vagy sejteket az előző igénypontok bármelyike szerinti oligonukleotiddal érintkeztetjük.

29. Eljárás humán ras-gén kimutatására sejtekben vagy szövetekben, *azzal jellemezve*, hogy a sejteket vagy szöveteket az 1-27. igénypontok bármelyike szerinti oligonukleotiddal érintkeztetjük, és a hibridizáció esetleges megtörténtét kimutatjuk.

30. Eljárás ráksejtek proliferációjának gátlására, *azzal jellemezve*, hogy a ráksejtet az 1-27. igénypontok bármelyike szerinti oligonukleotiddal érintkeztetjük, és ily módon a sejtek proliferációját gátoljuk.

31. Eljárás aktivált H-ras-gén kimutatására, aktivált H-ras-gén vonatkozásában differenciális affinitással rendelkező oligonukleotidok alkalmazásával, *azzal jellemezve*, hogy a feltételezhetően aktivált H-ras-gént tartalmazó sejtek vagy szövetek egy részletét olyan oligonukleotiddal érintkeztetjük, melynek szekvenciája megegyezik a 3., 4., 13., 14., 15., 16. és 17. azonosítószámú szekvenciák valamelyikével; és az említett sejtek vagy szövetek egy másik részletét az előbbiekkal azonos módon olyan oligonukleotiddal érintkeztetjük, melynek szekvenciája megegyezik az 1., 2., 5., 7., 18. vagy 19. azonosítószámú szekvenciák valamelyikével.

32. Eljárás aktivált Ki-ras-gén kimutatására, aktivált Ki-ras-gén vonatkozásában differenciális affinitással rendelkező oligonukleotidok alkalmazásával, *azzal jellemezve*, hogy a feltételezhetően aktivált Ki-ras-gént tartalmazó sejtek vagy szövetek egy részletét olyan oligonukleotiddal érintkeztetjük, melynek szekvenciája megegyezik a 32. azonosítószámú szekvenciával; és az említett sejtek vagy szövetek egy másik részletét az előbbiekkal azonos módon olyan oligonukleotiddal érintkeztetjük, melynek szekvenciája megegyezik az 20., 21., 22., 26., 28., 31. vagy 33. azonosítószámú szekvenciák valamelyikével.

33. A 31. vagy 32. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy oligonukleotidként legalább egy olyan oligonukleotidot alkalmazunk, amelyben legalább az egyik nukleotid-egységek közötti kötőcsoport foszforotioátmódosítást tartalmaz.

34. A 31. vagy 32. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy oligonukleotidként legalább egy olyan oligonukleotidot alkalmazunk, melynek legalább egyik oligonukleotid-egysége a 2'-pozícióban módosítva van.

35. A 34. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy oligonukleotidként legalább egy olyan oligonukleotidot alkalmazunk, melynek legalább egy oligonukleotid-egysége a 2'-pozícióban 2'-O-alkil- vagy 2'-fluor-módosítást tartalmaz.

36. A 31. vagy 32. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy oligonukleotidként legalább egy olyan oligonukleotidot alkalmazunk, amely szubsztrátja az RNáz-H-enzimnek, és tartalmaz legalább egy olyan módosítást, ami nukleáz rezisztenciáját fokozza, és legalább egy olyan módosítást, amely az aktivált H-ras-DNS vagy -mRNS iránti affinitását fokozza.

37. A 31. vagy 32. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy oligonukleotidként legalább egy olyan oligonukleotidot alkalmazunk, amely kiméra-oligonukleotid, és amely nukleázos emésztéssel szemben stabilizálva van, és tartalmaz egy első régiót, amely magába foglal legalább egy olyan nukleotidot, amely célszekvencia-affinitásának fokozása céljából van módosítva, valamint egy második régiót, amely az RNáz-H-enzim szubsztrátja.

22 oldal
93. oldal
115. oldal
116. oldal

A meghatalmazott:

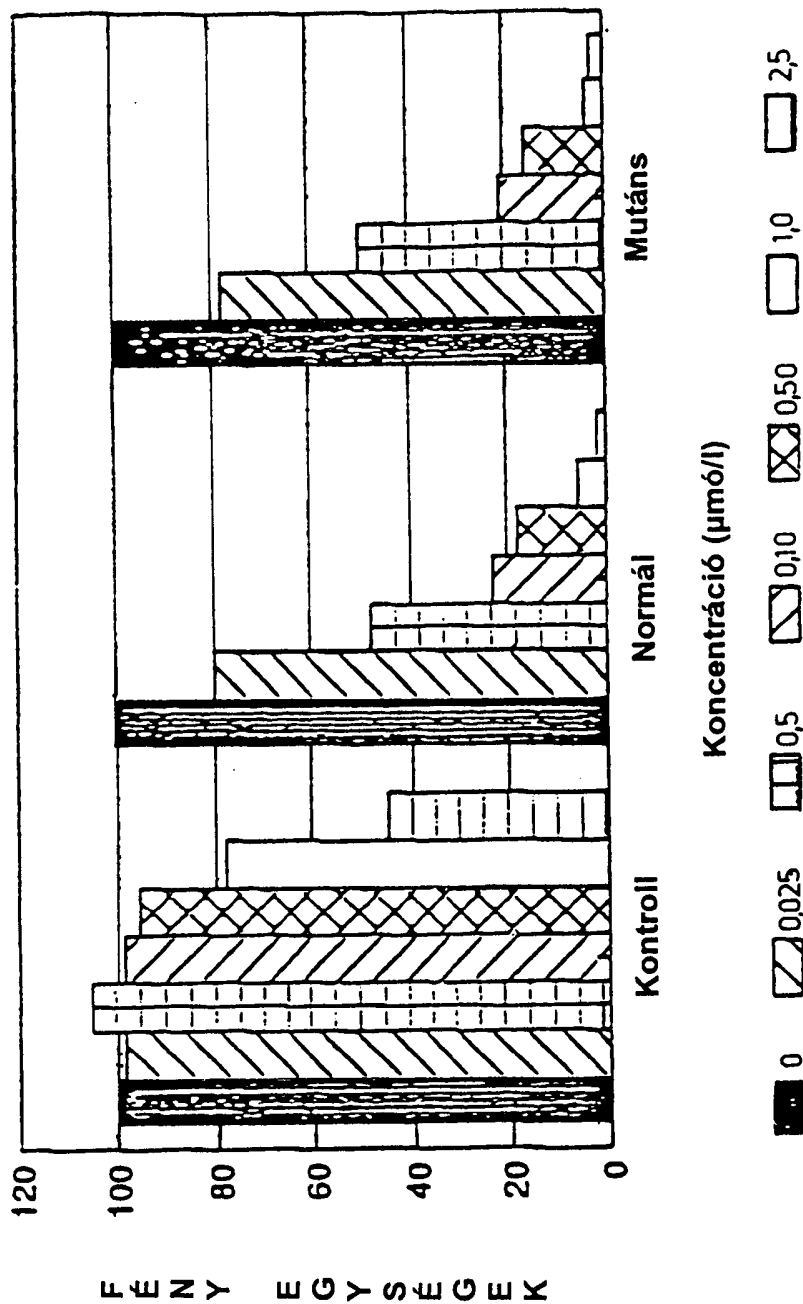
DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
46.
Válasz

9700374

04.08.96

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

1/22



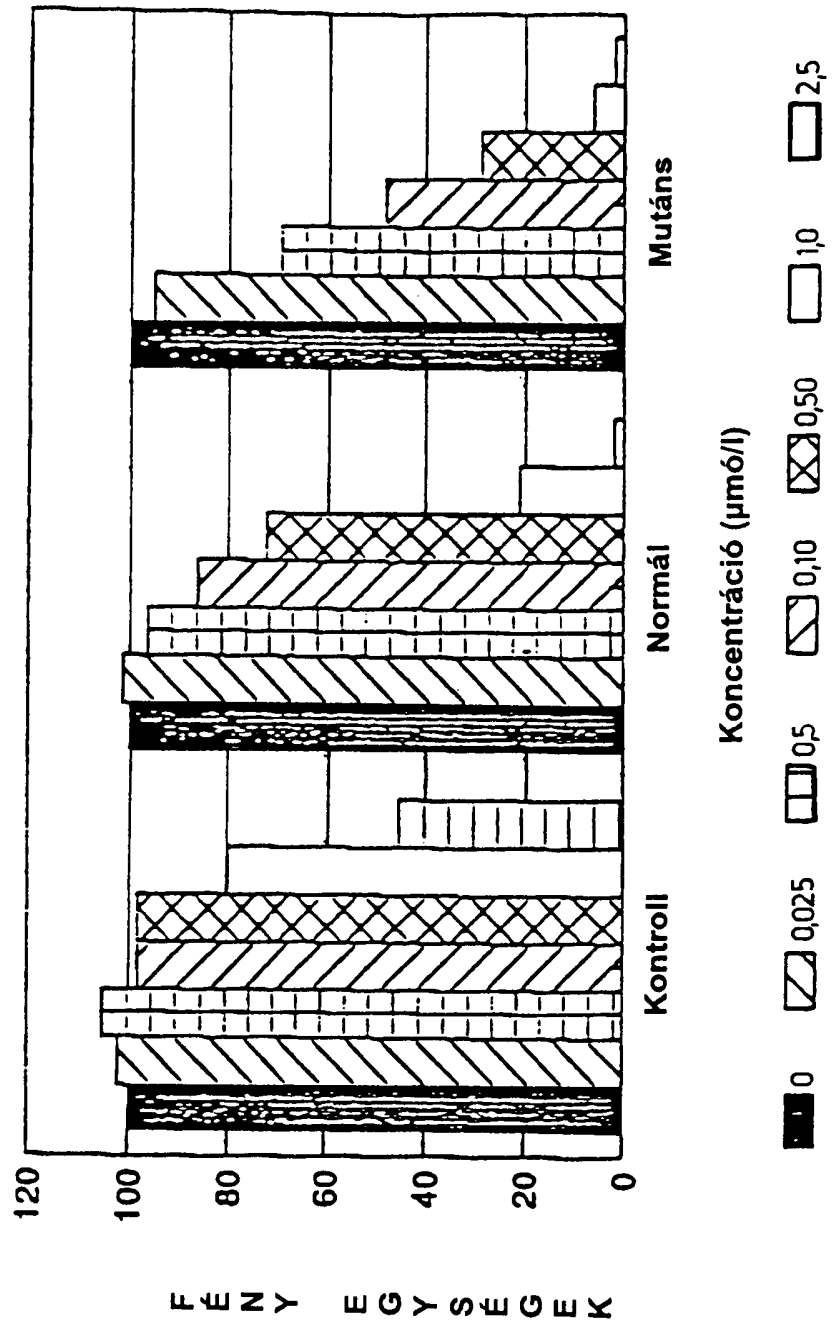
1. ábra

9805737

6408/46

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

2/22



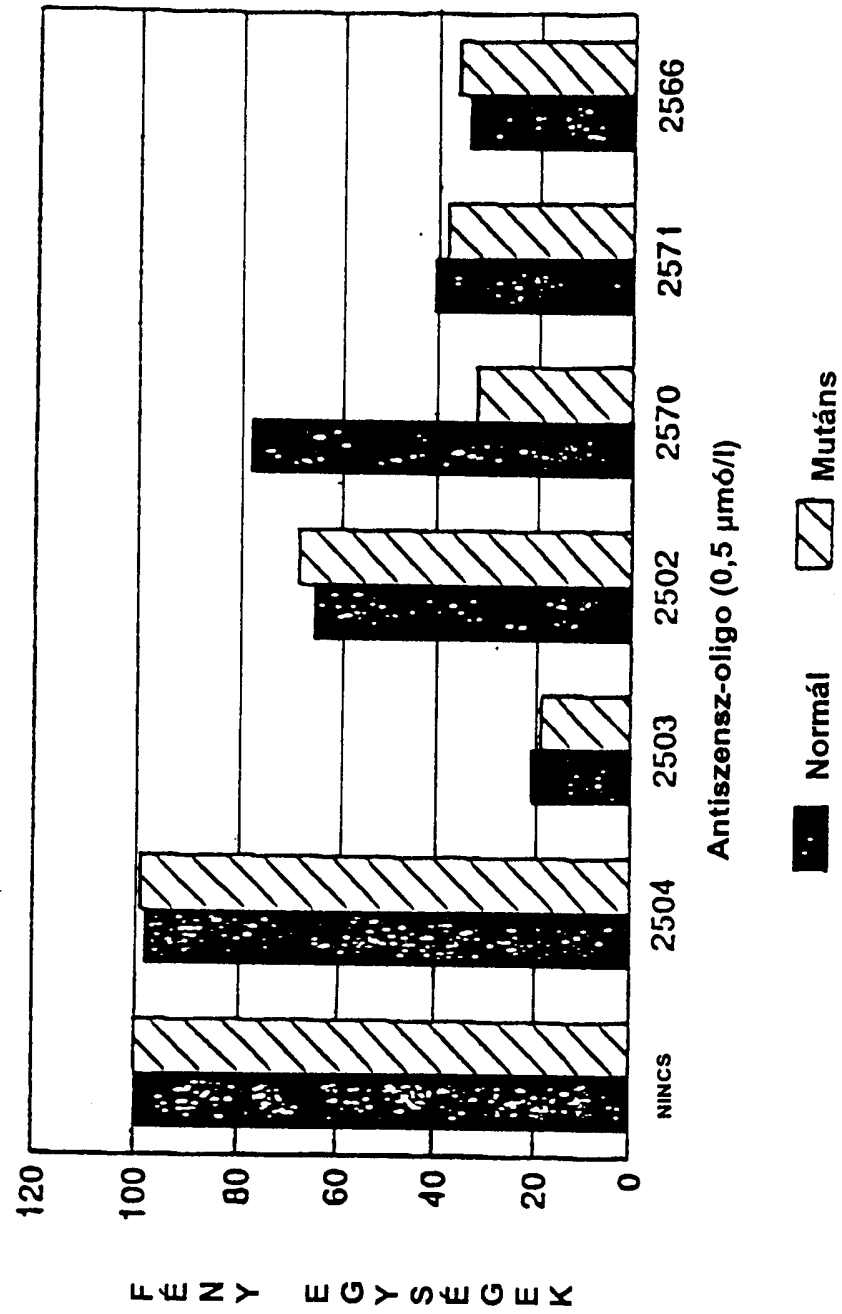
2. ábra

752 07 2-9

0408/016

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

3/22



3. ábra

9870 779

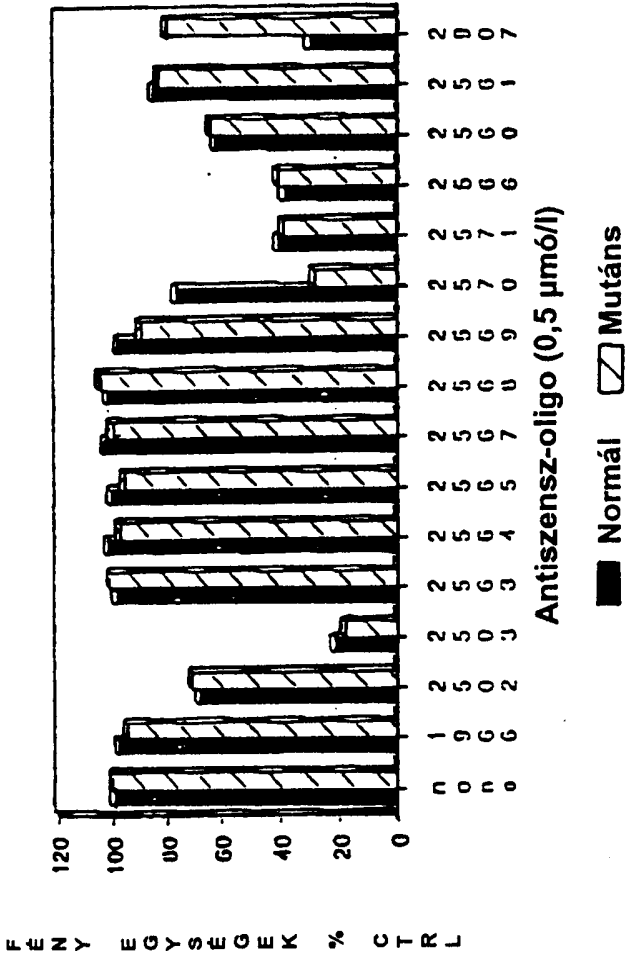
KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

6408/46

4/22

A RAS-pontmutációk antiszensz támadása

OLIGO	HOSSZ	CÉLPONT	IC ₅₀ μmól	SZELEKTIVITÁS
2502	20	AUG	0,75	NINCS
2503	20	AUG	0,05	NINCS
2563	5	PONT	NEM AKTÍV	
2564	7	PONT	NEM AKTÍV	
2565	9	PONT	NEM AKTÍV	
2567	11	PONT	NEM AKTÍV	
2568	13	PONT	NEM AKTÍV	
2569	15	PONT	NEM AKTÍV	
2570	17	PONT	0,10	2-3x
2571	19	PONT	0,25	NINCS
2566	21	PONT	0,25	NINCS
2560	23	PONT	0,75	NINCS
2561	25	PONT	1,00	NINCS



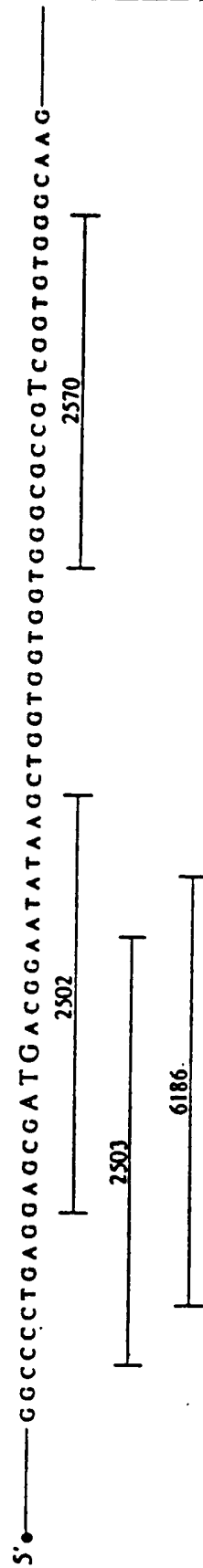
4. ábra

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

5/22

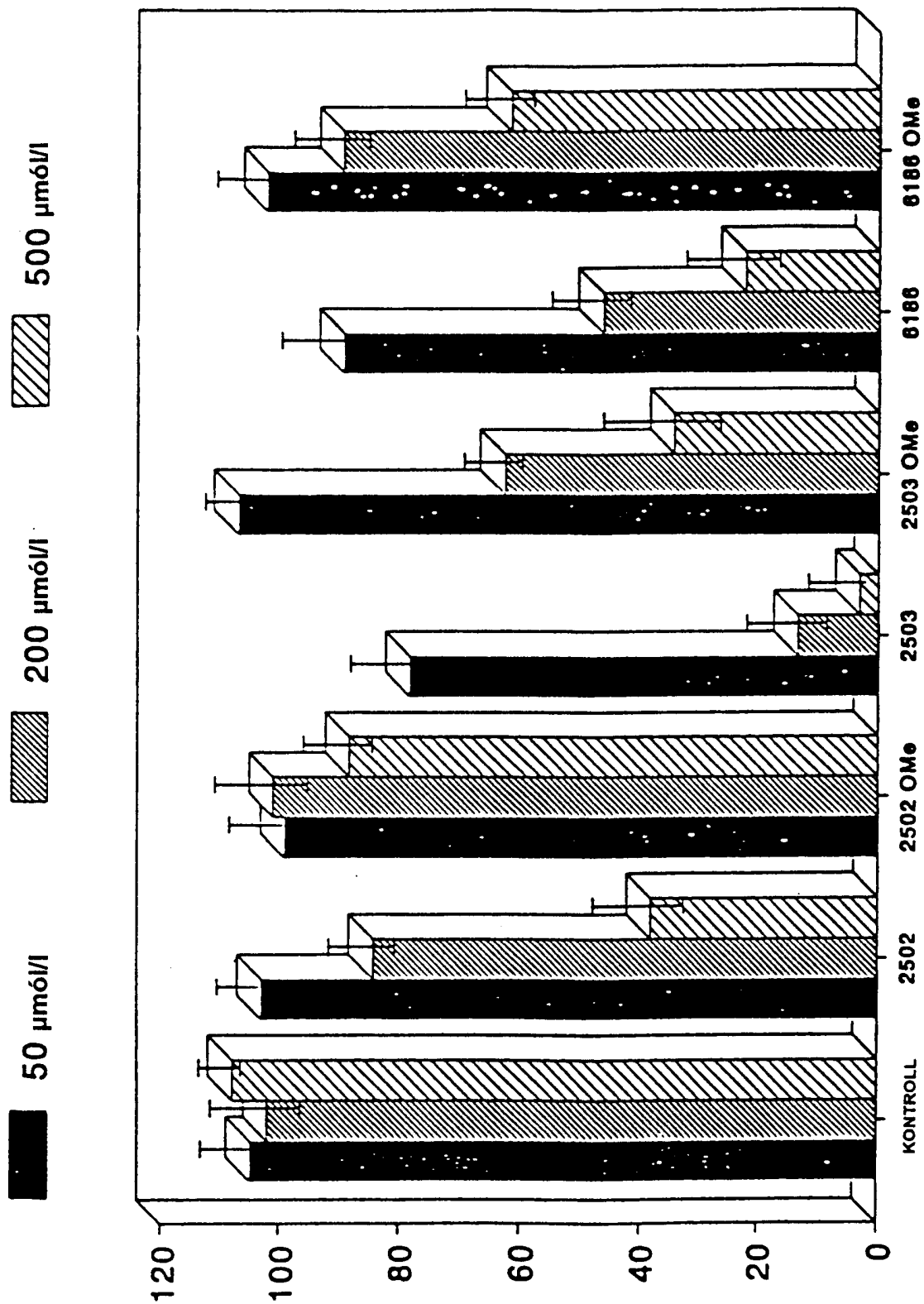
G			OLIGO	HOSSZ	CÉLPONT
AUG			2502	20	AUG
AUG			2503	20	AUG
AUG			2563	5	12. KÓDON
AUG			2564	7	12. KÓDON
AUG			2565	9	12. KÓDON
AUG			2567	11	12. KÓDON
AUG			2568	13	12. KÓDON
AUG			2569	15	12. KÓDON
AUG			3426	16	12. KÓDON
AUG			3427	16	12. KÓDON
AUG			2570	17	12. KÓDON
AUG			3428	18	12. KÓDON
AUG			3429	18	12. KÓDON
AUG			2571	19	12. KÓDON
AUG			2566	21	12. KÓDON
AUG			2560	23	12. KÓDON
AUG			2561	25	12. KÓDON
AUG			2907	17	12. KÓDON (vad típus)

5A ábra



5B ábra

Dezoxioligonukleotidok és 2'-O-Me-oligonukleotidok összehasonlítása
azonos módosítások

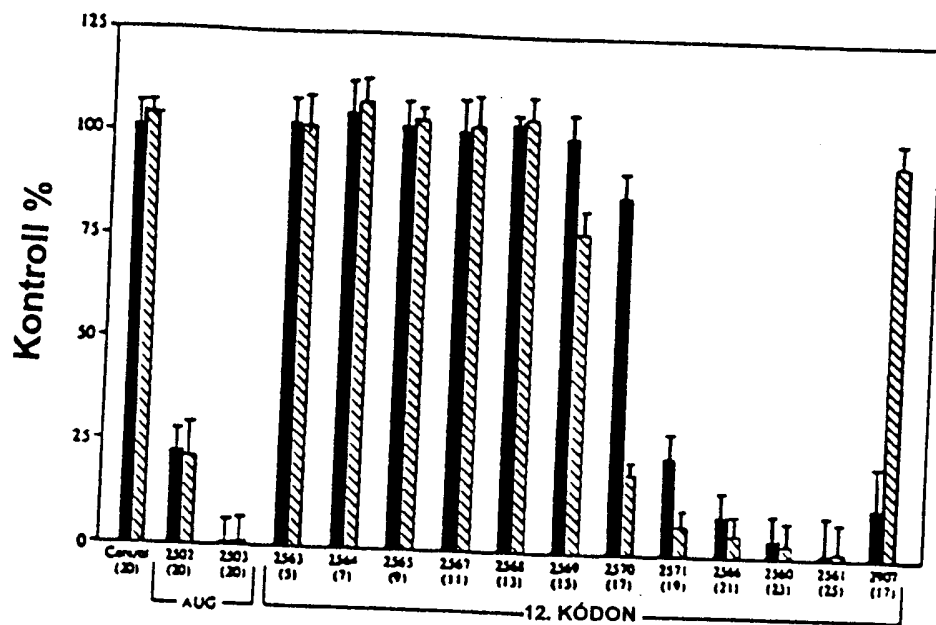


6. ábra

950073
KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

6408/96

8/22



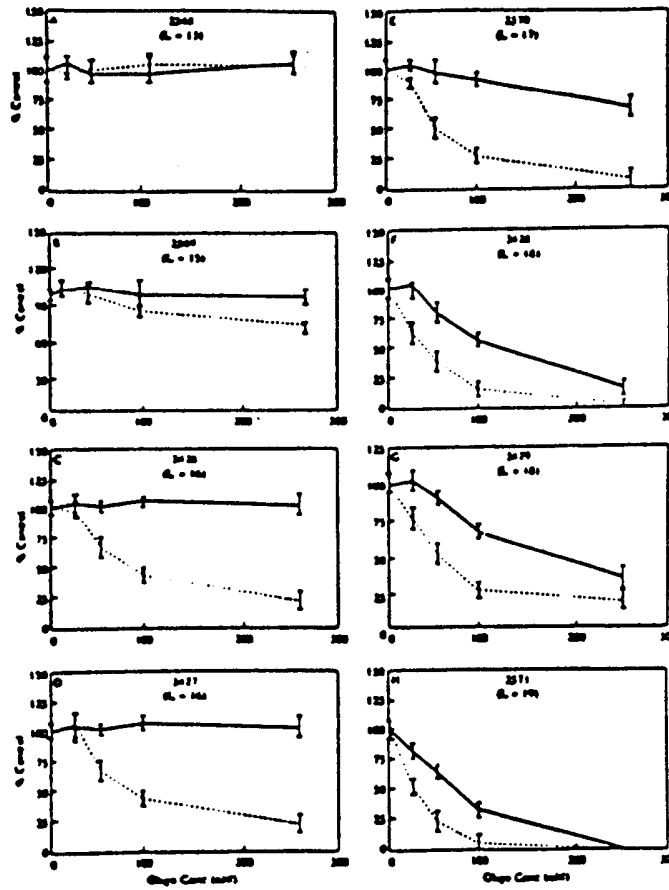
7. ábra

9/22/96

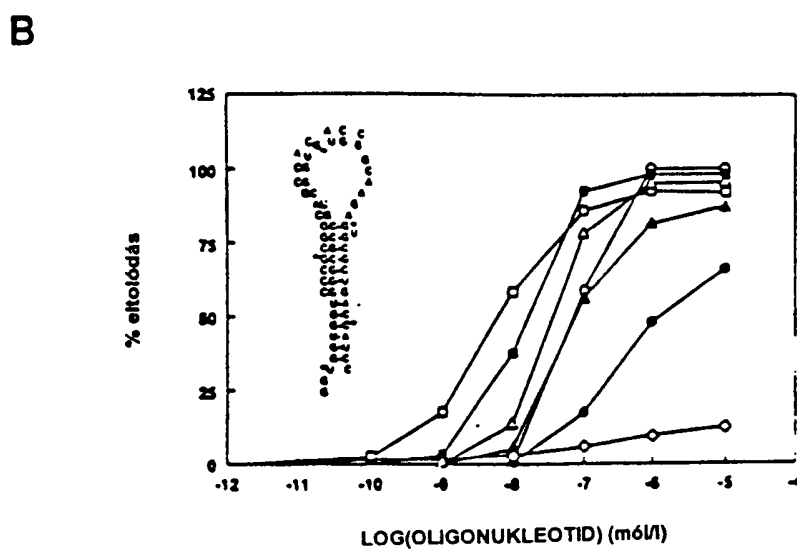
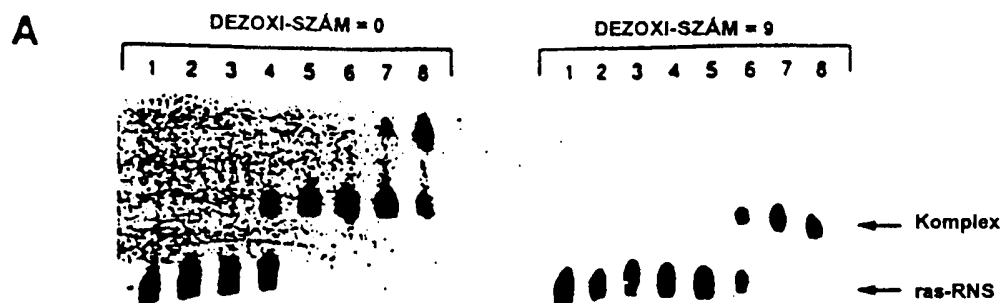
6408/96

KÖZZÉTÉTEL PÉLDÁNY

9/22



8. ábra



C

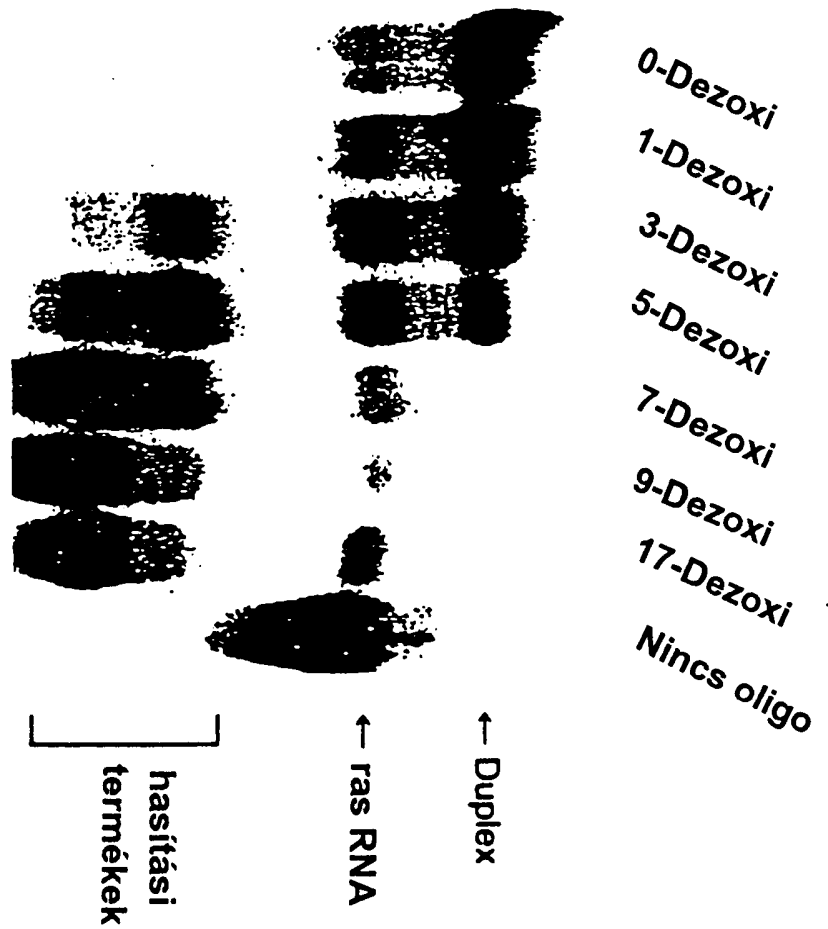
9. ábra

91509777

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

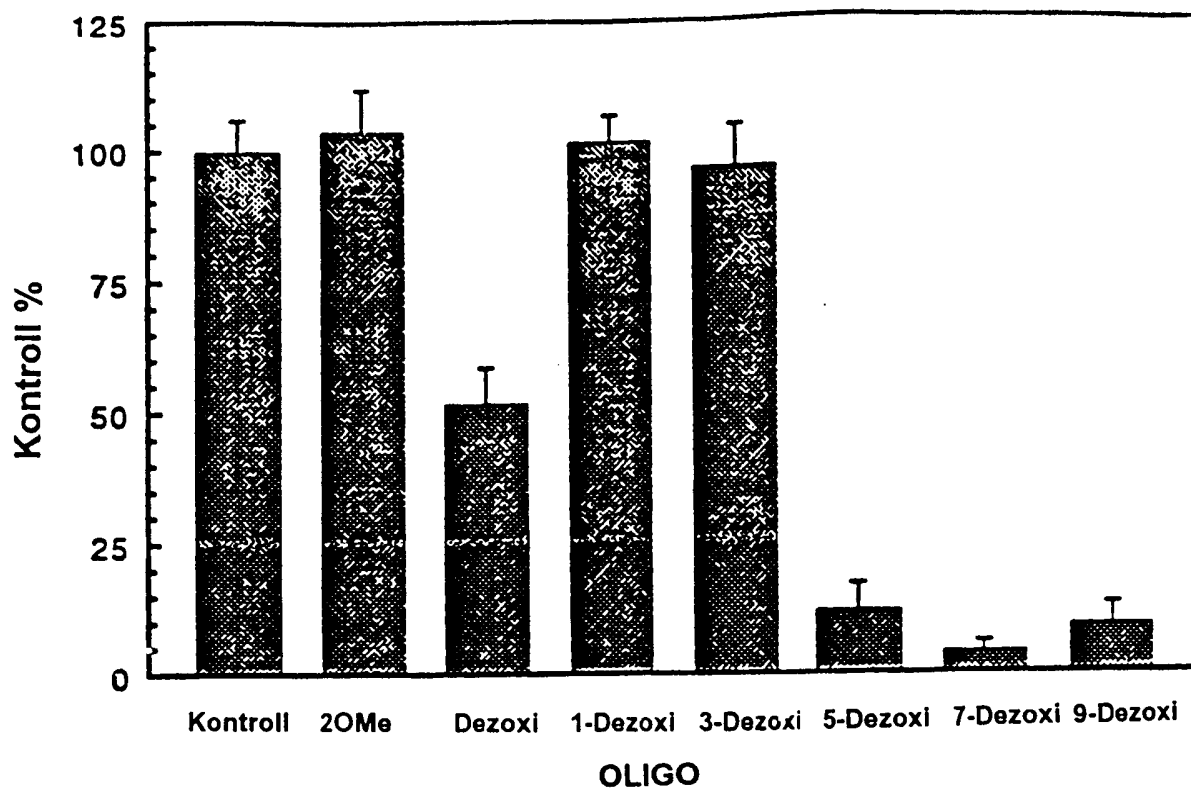
6408

11/22

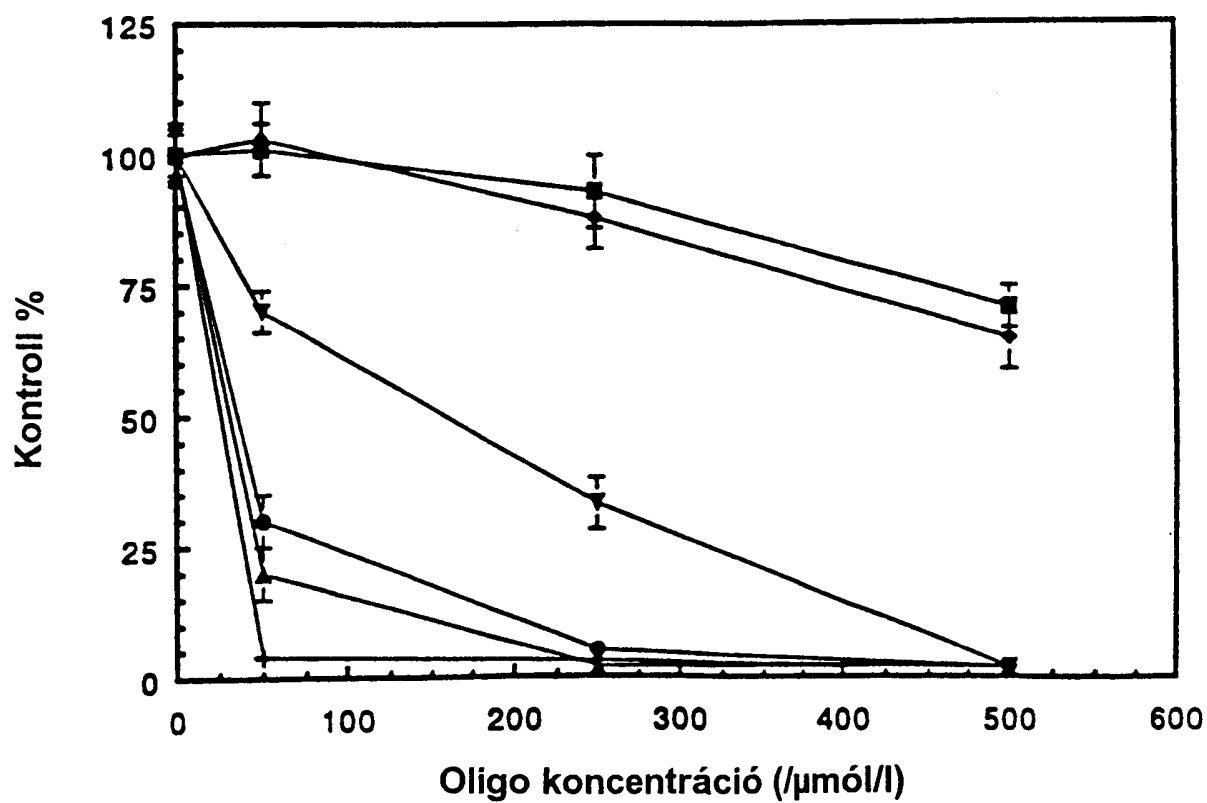


10. ábra

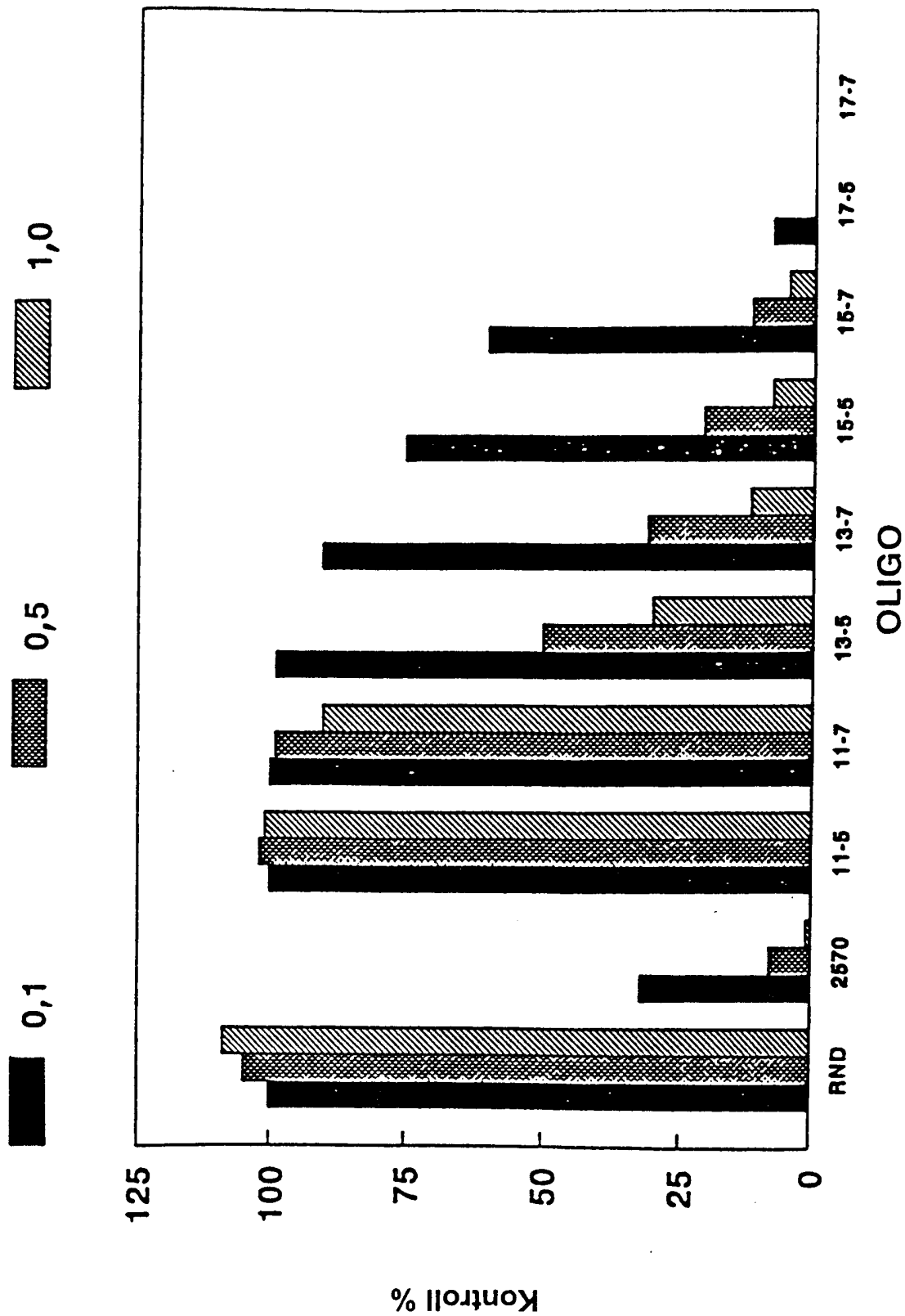
A.



B.

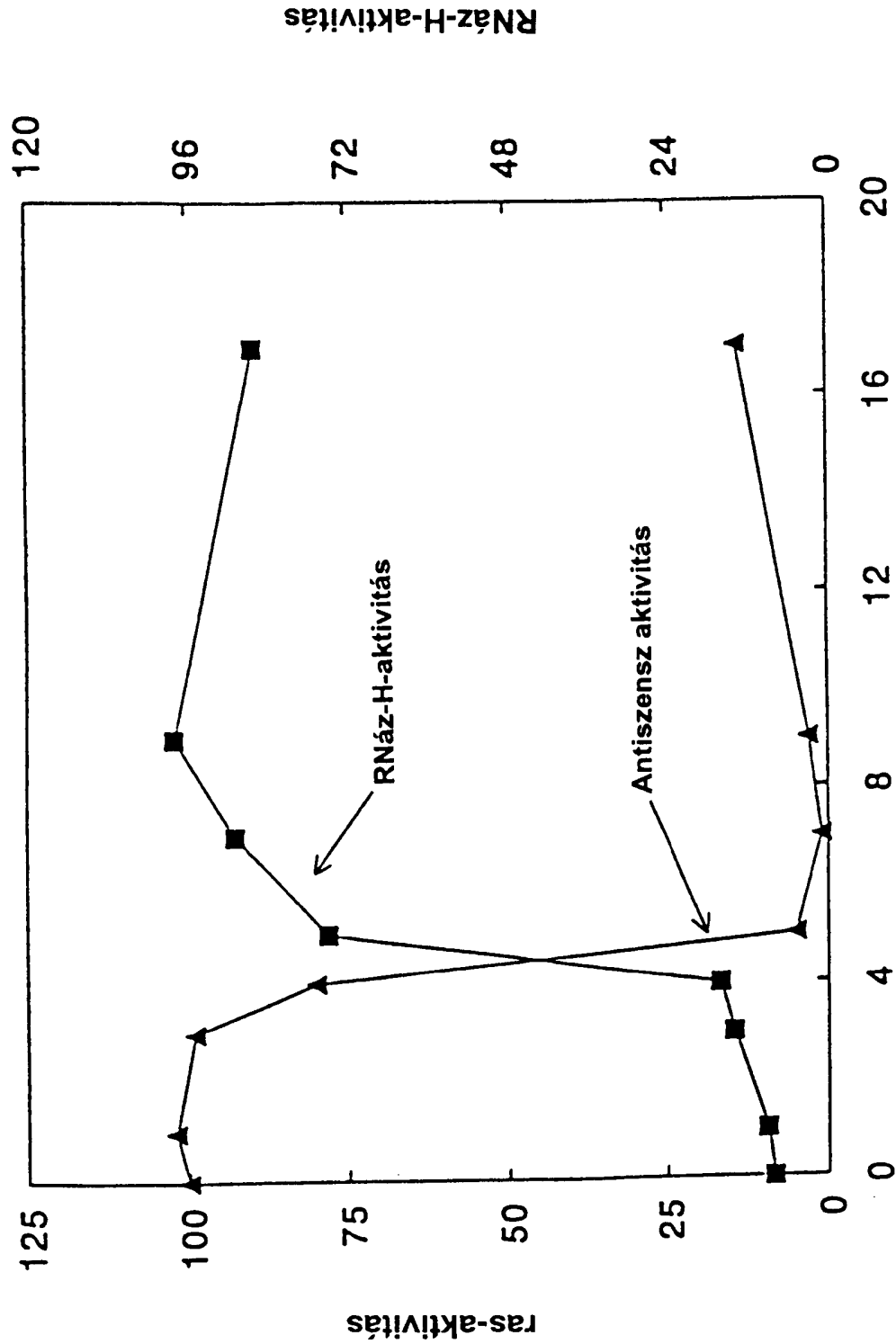


11. ábra



12. ábra

Az antiszensz és az RNáz-H-aktivitás összehasonlítása
2'-O-Metil-dezoxi-rések



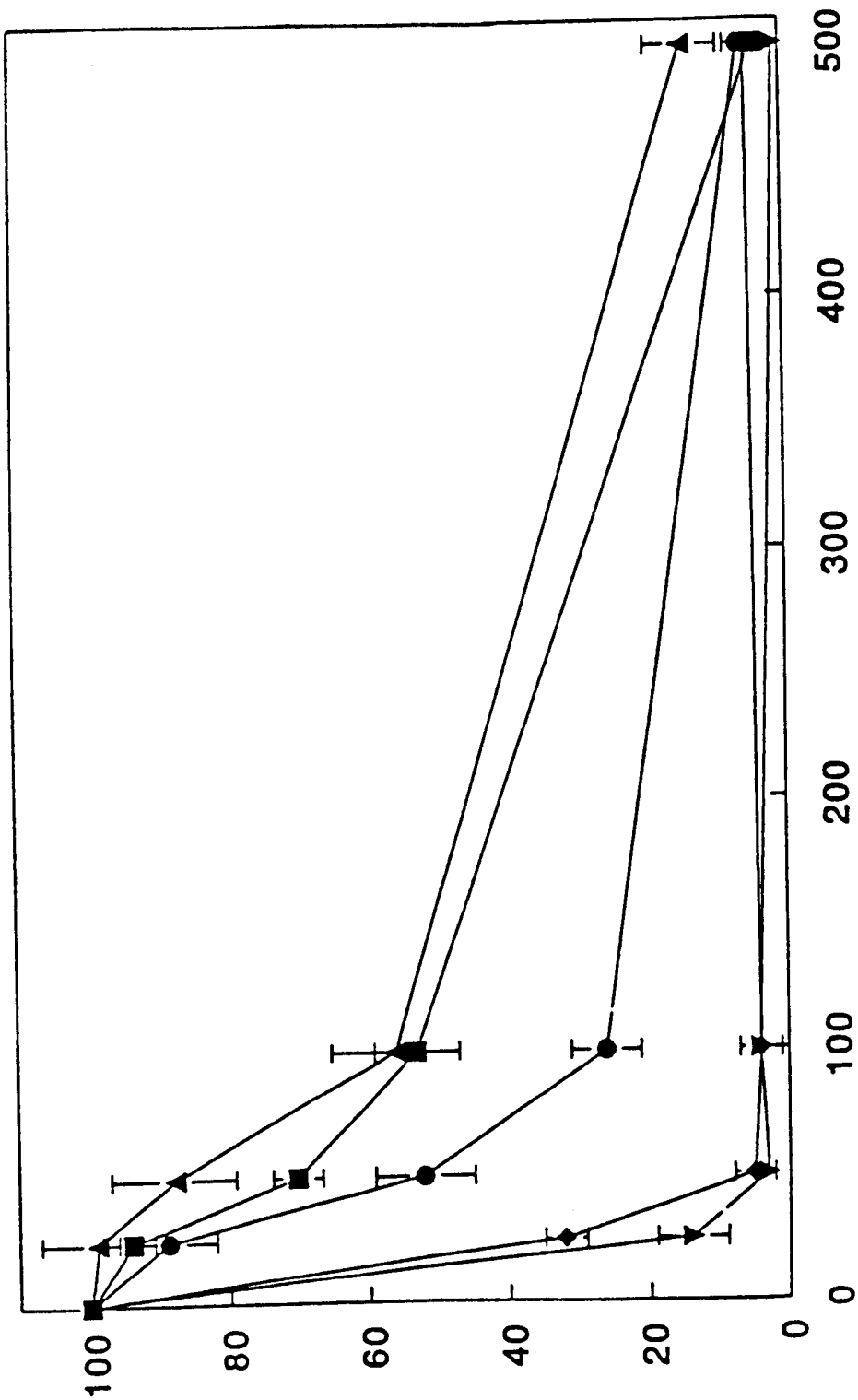
13. ábra

0170026

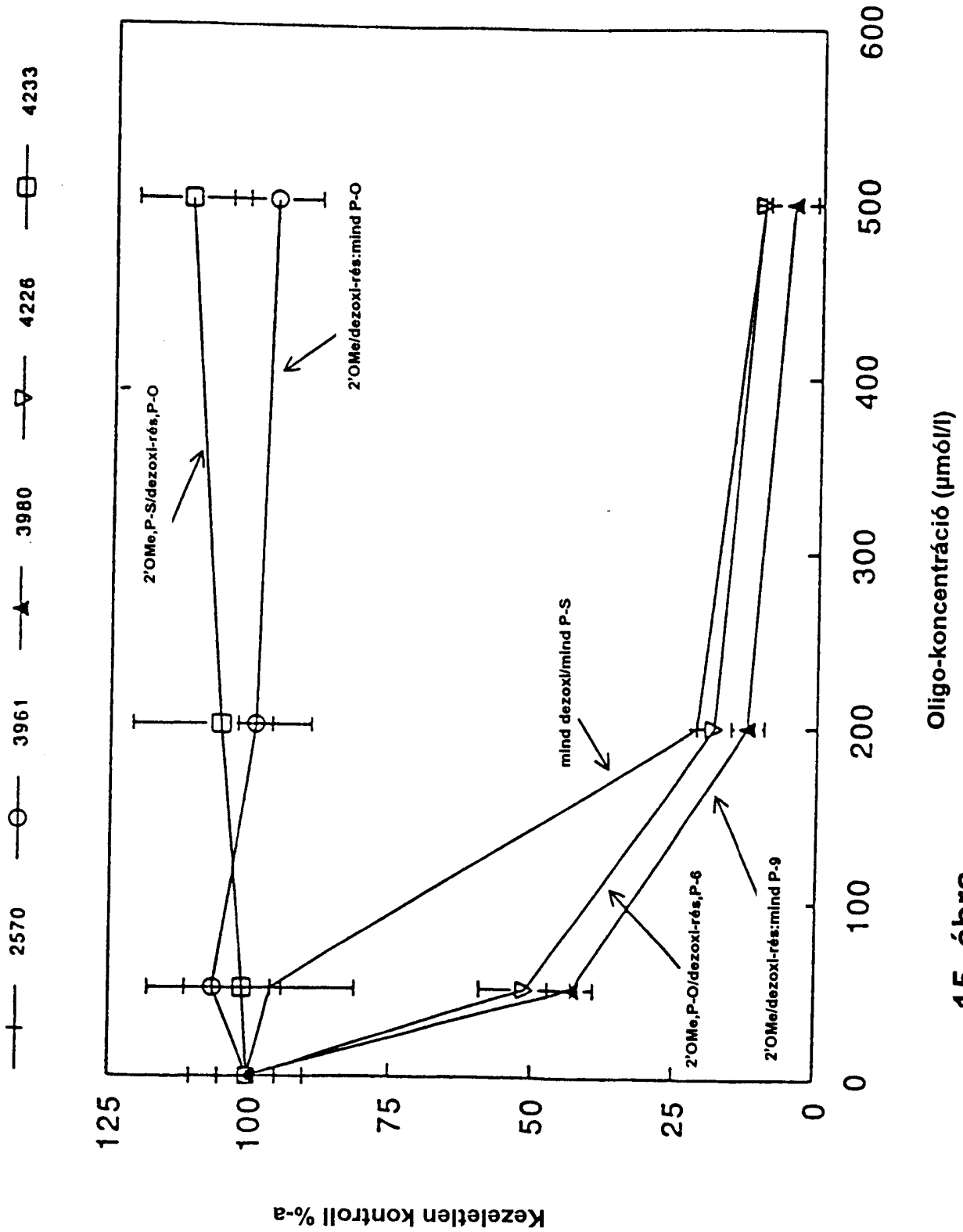
6408/96

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

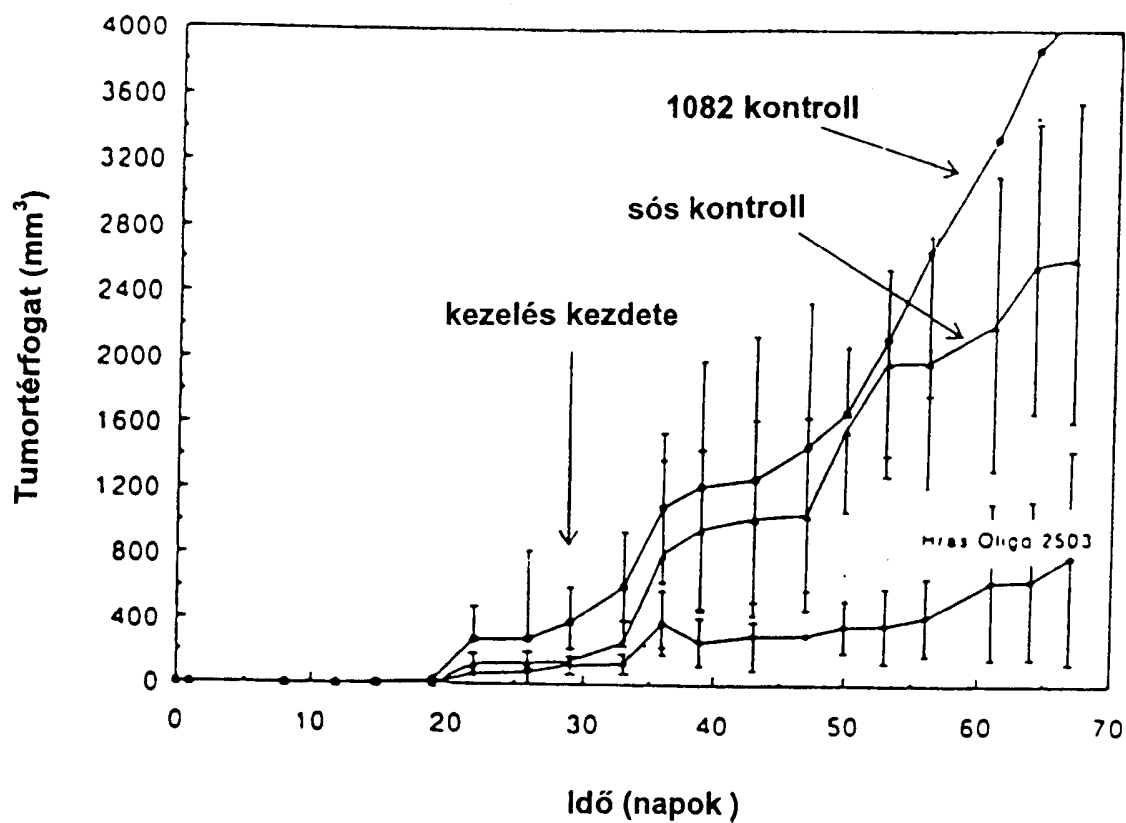
15/22



14. ábra



15. ábra



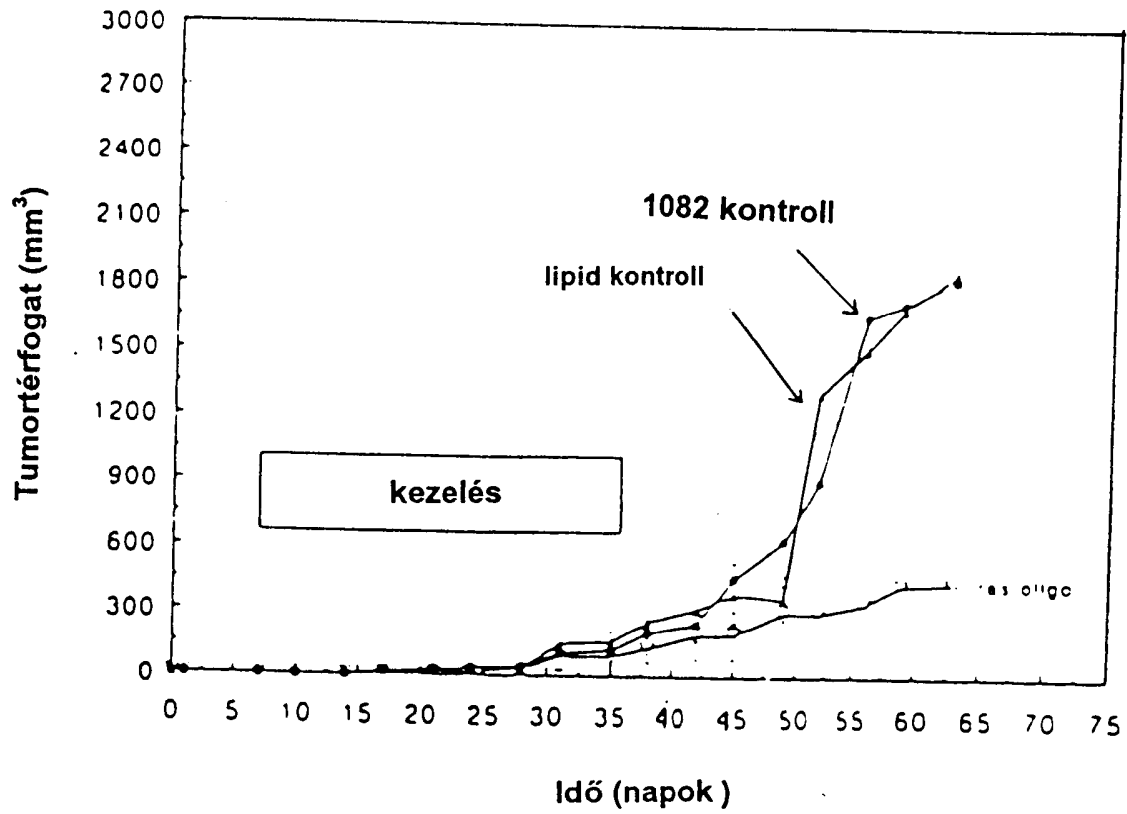
16. ábra

1912/775

0408/96

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

18/22



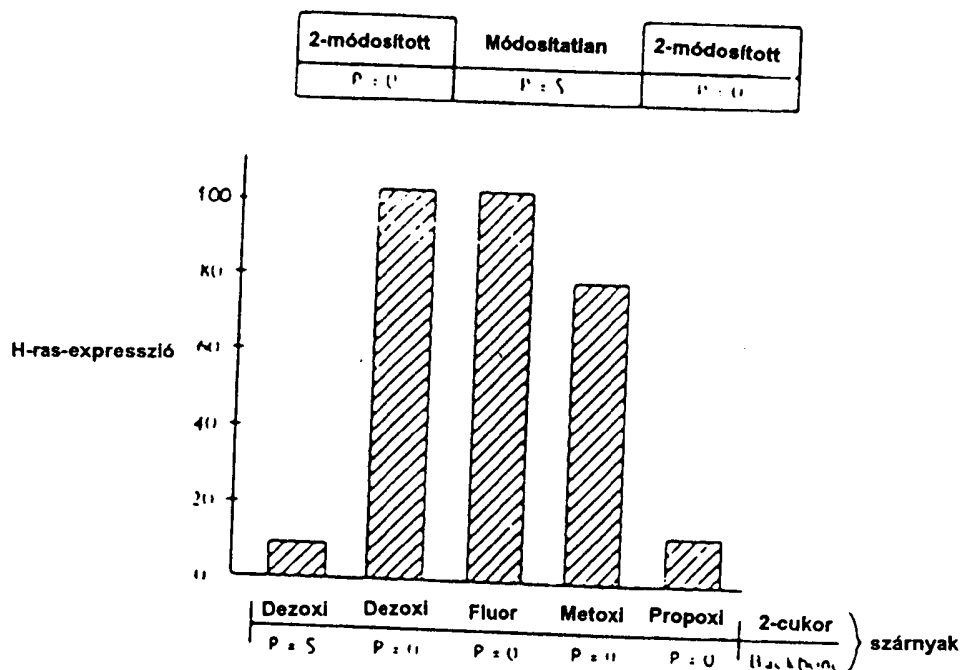
17. ábra

97003701

0408/96

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

19/22



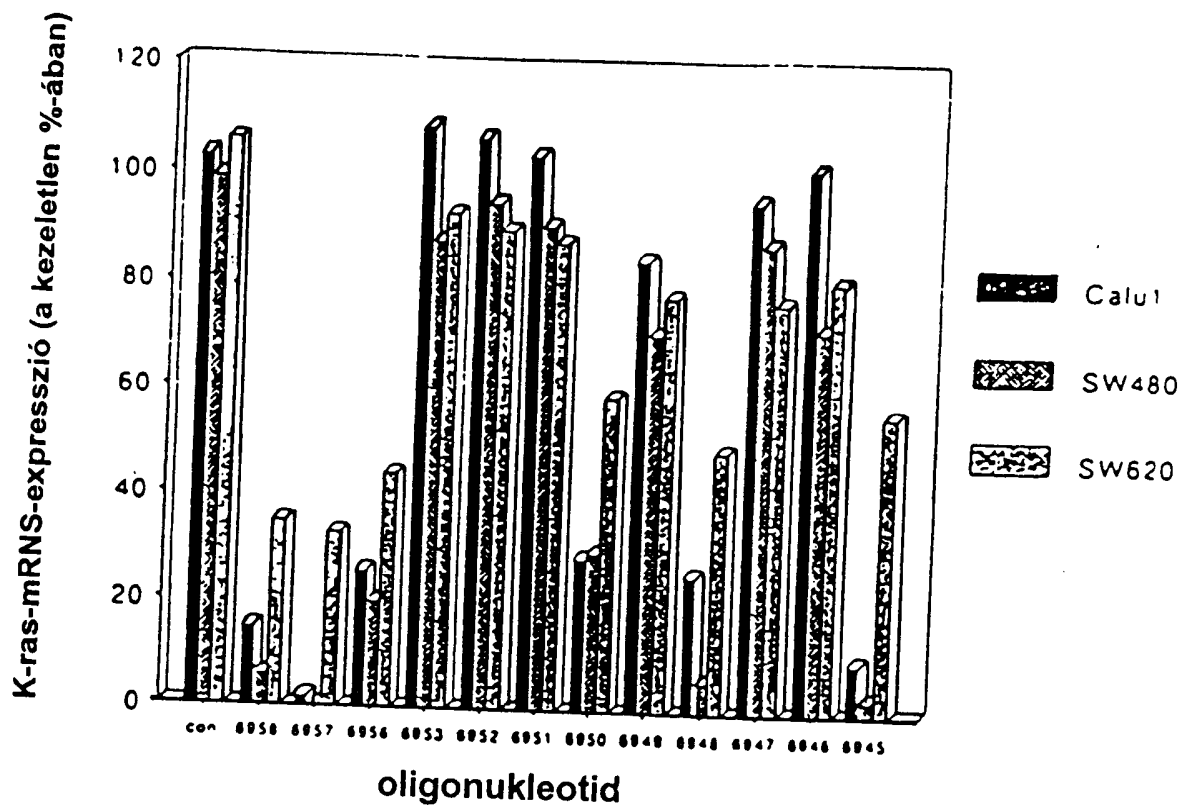
18. ábra

9500979

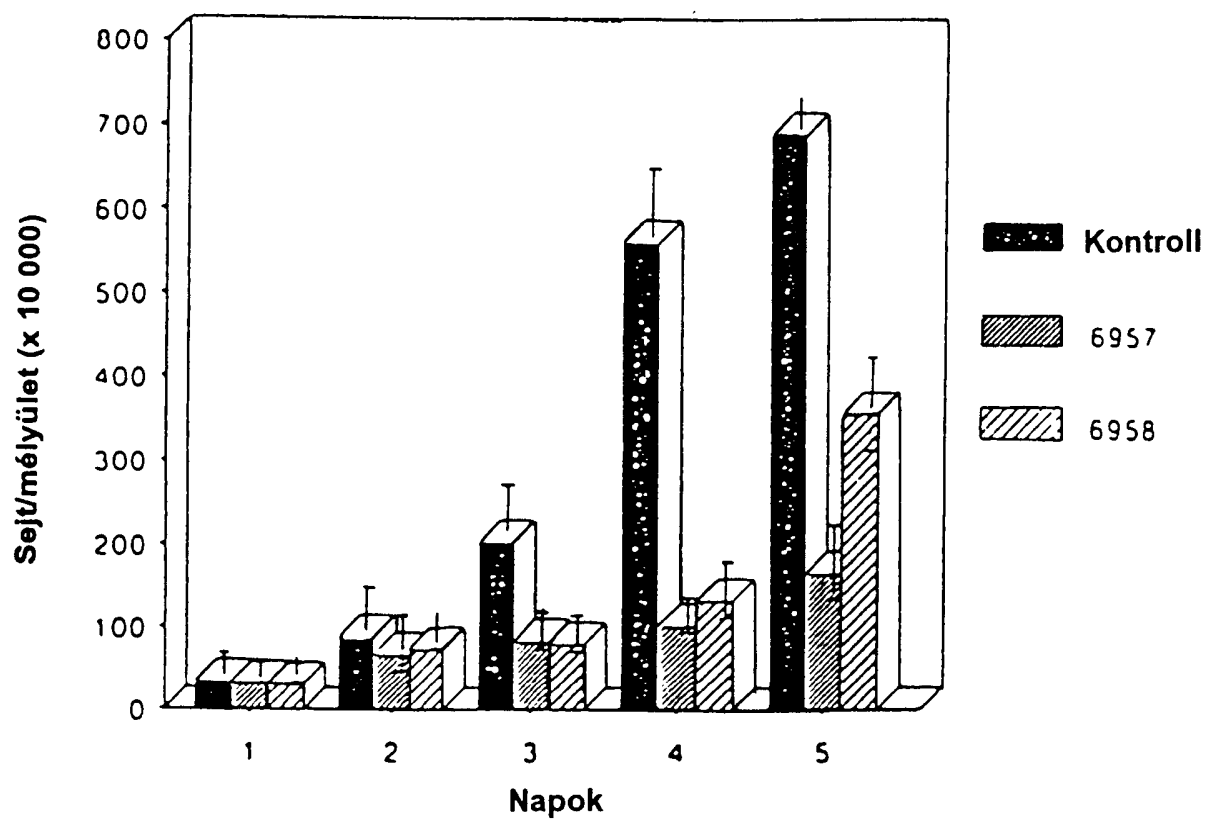
6408, 46

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

20/22



19. ábra



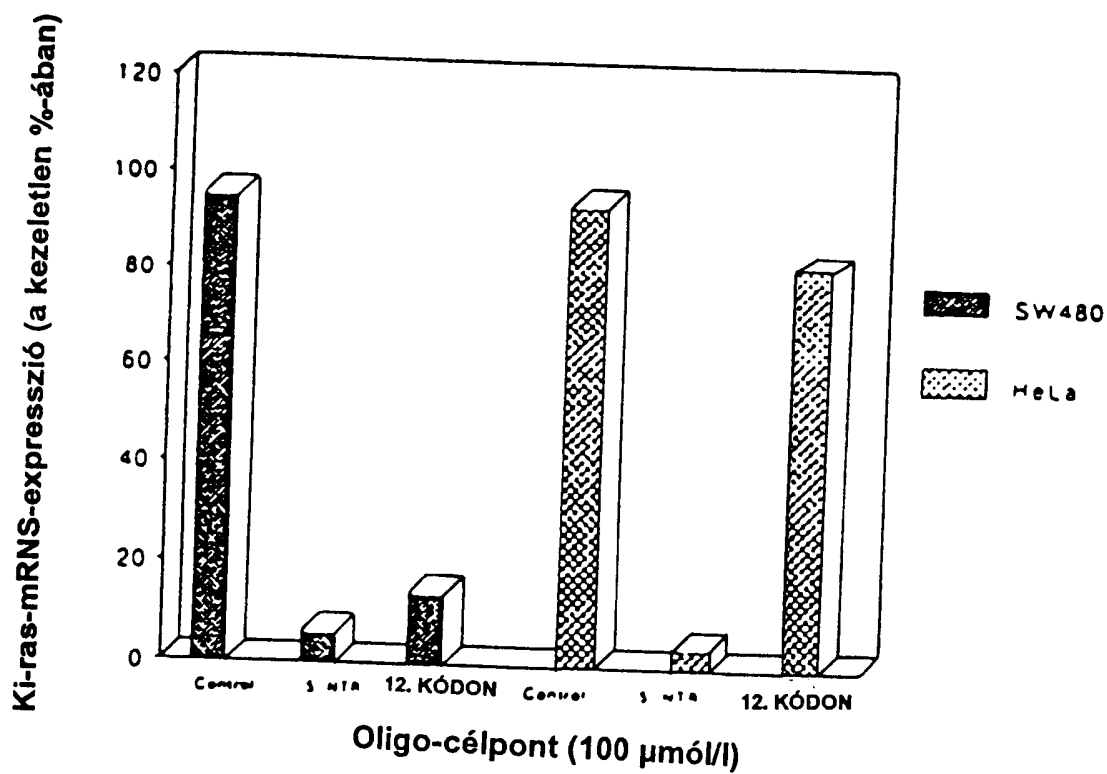
20. ábra

9500977

6408/96

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

22/22



21. ábra