

Hibrid foszforotioát oligonukleotidok, az oligonukleotidokat tartalmazó gyógyászati készítmények és ezek antiszensz-terápiás alkalmazása

Worcester Foundation for Experimental Biology, Shrewbury, US

A bejelentés elsőbbsége: 1992. 08. 23. (07/918,239) US,

A PCT bejelentés napja: 1993. 08. 22.

A PCT bejelentés száma: PCT/US93/06884

A nemzetközi közzététel száma: WO 94/02498

KIVONAT

A találmány tárgyát a génkifejeződés tanulmányozásában és az antiszensz oligonukleotid terápiában alkalmazható szintetikus oligonukleotidok képezik. A találmány tárgyát közelebbről olyan, az említett alkalmazások vonatkozásában előnyös tulajdonságú hibrid foszforotioát és/vagy foszforoditioát oligonukleotidok képezik, melyek dezoxiribonukleozidot, ribonukleozidot vagy 2'-szubsztituált ribonukleozidot, valamint foszforotioát és/vagy foszforoditioát internukleotid kötést tartalmaznak.

jellemző alá írt
Benn

Képviselő:

A

DANUBIA SZABADALMI ÉS VÉDJEGY IRODA Kft.

**Hibrid foszforotioát oligonukleotidok, az oligonukleotidokat
tartalmazó gyógyászati készítmények és ezek antiszensz-
terápiás alkalmazása**

Worcester Foundation for Experimental Biology, Shrewsbury, US

Feltalálók:

METELEV, Valeri, Shrewsbury, US és

AGRAWAL Sudhir, Shrewsbury, US.

A bejelentés elsőbbsége: 1992. 08. 23. (07/918,239) US,

A PCT bejelentés napja: 1993. 08. 22.

A PCT bejelentés száma: PCT/US93/06884

A nemzetközi közzététel száma: WO 94/02498

A találmány tárgyát a génkifejeződés tanulmányozásában és az antiszensz oligonukleotid terápiában alkalmazható szintetikus oligonukleotidok képezik. A találmány tárgyát közelebbről olyan, az említett alkalmazások vonatkozásában előnyös tulajdonságú szintetikus oligonukleotidok képezik, melyek előnyös tulajdonságai az oligonukleotidok cukor-foszfát-gerincének módosításaiból fakadnak.

Az antiszensz-oligonukleotid-terápiás megközelítés gondolatát először három 1977-78-ban publikált tudományos közleményben vetették fel. Paterson és mtsai. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4370 (1978)] kimutatták, hogy az mRNS sejtmentes közegben végzett transzlációja az mRNS-sel komplementer oligonukleotid kötődése útján gátolható. Zamecnik és Stephenson [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 280 és 285 (1978)] kimutatták, hogy a Rous-szarkómavírus (RSV) genomjának egy részletével komplementer 13-tagú szintetikus oligonukleotid gátolja az RSV replikációját fertőzött csirke-fibroblasztokban, valamint a primer csirke-fibroblasztok malignus szarkómasejtekké történő, RSV-közvetítette átalakulását.

Ezeket a korai felismeréseket - miszerint a szintetikus oligonukleotidok alkalmasak vírus-szaporodás és neoplázia gátlására - a szintetikus oligonukleotidok legkülönbözőbb vírusok szaporodásának gátlására történő alkalmazása követte. Goodchild és mtsai. a 4 806 463 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban (amelyben foglalt teljes feltárás a technika állásához tartozó kitanítás részeként tekintendő) leírják a humán immundeficiencia vírus (HIV) szaporodásának a különböző HIV-genom-régiókkal komplementer szintetikus oligonukleotidokkal történő gátlását. Leiter és mtsai. [Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 85, 7079 (1988)] arról számolnak be, hogy a foszforotioát és a különböző foszforamidát-oligonukleotidok a hagyományos

oligo-dezoxinukleotidoknál hatékonyabban gátolják a HIV-1 szaporodását. Agrawal és mtsai. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 7790 (1989)] leírják, hogy korai és krónikusan fertőzött sejtek esetén a foszforotioát oligonukleotidok előnyös gátlószerek.

Ezen felül kifejlesztettek kiméra-oligonukleotidokat is, melyek több különböző típusú internukleotid kötést tartalmaznak. A kiméra-oligonukleotidok csak dezoxiribonukleotidokat tartalmaznak, de vannak olyan régiók is, melyekben különböző internukleotid kötések találhatók. Pederson és mtsai. az 5 XXX XXX számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban (bejelentés száma: 07/480 269, megadva: 1991. 12. 24; amelyben foglalt teljes feltárás a technika állásához tartozó kitanítás részeként tekintendő) olyan kiméra-oligonukleotidokat írnak le, melyekben egy belső foszfodiészter- vagy foszforotioát oligonukleotid-szekvenciát foszforamidát-, metilfoszfonát- vagy foszforamidát-oligonukleotid-szekvenciák szegélyeznek. Furdon és mtsai. [Nucleic Acids Res. 17, 9193 (1989)] olyan kiméra-oligonukleotidokat írnak le, melyek foszforotioát vagy metilfoszfonát internukleotid-kötéseket tartalmazó régiókon kívül tartalmaznak foszfodiészter-kötéseket tartalmazó régiókat is. Quartin és mtsai. [Nucleic Acids Res. 17, 7523 (1989)] olyan kiméra oligonukleotidokról számolnak be, melyek foszfodiészter és metilfoszfonát oligonukleotid régiókat tartalmaznak. Valamennyi fent említett vegyületben dezoxiribonukleotid-foszforotioát-régiók találhatók, melyek csökkent duplex-stabilitással jellemezhetők. Atabekov és mtsai. [FEBS Letters 232, 96 (1988)] olyan kiméra oligonukleotidokról számolnak be, melyekben valamennyi internukleotid kötés foszfodiészter-kötés, azonban találhatók bennük mind oligoribonukleotid-kötés, mind pedig oligodezoxiribonukleotid-régiók. Inoune és mtsai. [FEBS Letters 215 (1987)] olyan kiméra

oligonukleotidokról számolnak be, melyek kizárólag foszfodiészter-kötéseket tartalmaznak, de találhatóak bennük mind oligodezoxiribonukleotid-, mind pedig 2'-OMe-ribonukleotid-régiók. Az említett, kizárólag foszfodiészter-kötéseket tartalmazó vegyületek egyike sem endonukleáz- vagy exonukleáz-rezisztens.

A felsorolt módosított oligonukleotidok közül sok hozzájárult az antiszensz oligonukleotid terápiás megközelítés potenciális hatékonyságának javításához. Mindazáltal valamennyi ismert oligonukleotid rendelkezik bizonyos hátrányos tulajdonságokkal és ezek a hátrányos tulajdonságok megakadályozhatják, hogy az ilyen oligonukleotidokat hatékony terápiás ágensként alkalmazzuk. Wickstrom, J. [Biochem. Biophys. Methods 13, 97 (1986)] beszámol arról, hogy a foszfodiészter-oligonukleotidok nukleáz-közvetítette degradációra érzékenyek. Ez a nukleáz-érzékenység korlátozhatja az említett oligonukleotidok *in vivo* hozzáférhetőségét. Agrawal és mtsai.: [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1401 (1990)] beszámolnak arról, hogy a foszforamidát- és a metilfoszfónát-oligonukleotidok RNS-hez hibridizálódva nem aktiválják az RN-áz-H-t, amely enzim aktivitása fontos lehet az antiszensz oligonukleotidok működése szempontjából. Agrawal és mtsai.: [Nukleosides & Nucleotides 8, 5 (1989)] arról is beszámolnak, hogy a foszforotioát oligodezoxinukleotidok RNS-hez hibridizálódva csökkent duplex-stabilitással rendelkeznek.

Az elmondottakból tehát belátható, hogy szükség van olyan javított oligonukleotidokra, melyek nem bírnak a technika állása szerint ismert oligonukleotidok felsorolt hátrányos tulajdonságaival. Az ilyen oligonukleotidok ideális esetben nukleolitikus degradációval szemben rezisztensek, RNS-sel stabil duplexeket alkotnak, valamint RNS-hez hibridizálódva aktiválják az RN-áz-H-t.

A találmány tárgyát olyan hibrid oligonukleotidok képezik, melyek nukleolitikus degradációval szemben rezisztensek, RNS-sel és DNS-sel stabil duplexet képeznek és RNS-hez hibridizálódva aktiválják az RN-áz-H-t. A találmány szerinti oligonukleotidok azért rendelkeznek az ismertetett sajátságokkal, mert találhatók bennük foszforotioát és/vagy foszforoditioát internukleotid kötések, valamint oligodezoxiribonukleotid régiók csakúgy, mint oligoribonukleotid régiók vagy 2'-szubsztituált oligoribonukleotid régiók. A leírásban használt értelemben a "2'- szubsztituált" kifejezés azt jelenti, hogy a ribóz molekula 2'-OH-ja szubsztituálva van például: 2'-OMe-, 2'-allil-, 2'-aril-, 2'-alkil- vagy 2'-amino-csoporttal, vagy 2'-halogénatommal, de a 2'-szubsztituens minden esetben hidrogénatomtól eltérő, és az allil-, aril- vagy alkil-csoportok vagy szubsztituátlanok vagy szubsztituáltak, például: halogénatommal, hidroxil-, trifluor-metil-, cianid-, nitro-, acil-, aciloxi-, alkoxi-, karboxil-, karbalkoxil-vagy aminocsoportokkal.

A találmány szerinti megoldás egyik célja olyan oligonukleotidok előállítása, melyek alkalmasak arra, hogy segítségükkel megvizsgáljuk és megmagyarázzuk az antiszensz oligonukleotidok hatékonyságában a következő paraméterek jelentőségét: nukleáz-rezisztencia, duplex-stabilitás és RN-áz-H-aktiválás. A találmány szerinti megoldás másik célja olyan oligonukleotidok előállítása, melyek alkalmasak arra, hogy a celluláris, a patogén-eredetű vagy a virális génexpresszió mRNS-szinten történő szabályozására. Célul tűztük ki továbbá olyan oligonukleotidok előállítását, melyek alkalmasak nagy hatékonyságú antiszensz oligonukleotidokon alapuló terápiás kezelések végrehajtására. A találmány szerinti oligonukleotidok megvalósítják valamennyi ismertetett célkitűzésünket.

A következőkben röviden ismertetjük a leíráshoz csatolt ábrákat.

Az 1. ábrán nukleáz-kezelt oligonukleotidok ioncserélő HPLC-analízisének eredményeit láthatjuk. Az ábra A-részén látható A-, B- és C-görbék sorrendben az F-, C- és A-oligonukleotidokról készültek 420 perces SVPD-emésztés után. Az ábra B-részén az A-görbe egy emésztetlen foszfodiészter oligonukleotidról készült, a B-görbe pedig ugyanarról az oligonukleotidról készült, egyperces SVPD-emésztés után.

A 2. ábra a 4. példa szerinti oligonukleotidokkal végzett RN-áz-H aktiválási vizsgálatok eredményeit mutatja.

A találmány szerinti oligonukleotidok egyrészt alkalmasak azoknak a paramétereknek a tanulmányozására, melyek az antiszensz oligonukleotidok hatásossága szempontjából jelentősek lehetnek. A leírásban használt értelemben az "oligonukleotid" kifejezés két vagy több ribonukleotidból vagy dezoxiribonukleotidból vagy mindkettőből álló polimereket jelöl, melyekben a ribonukleotid vagy dezoxiribonukleotidból monomerek 5'-3'-kötésekkel vannak összekapcsolva, és az említett kötések bármilyen - a technika állása szerint ismert - antiszensz oligonukleotidokban található internukleotid kötések lehetnek. Az oligonukleotid kifejezés ezen felül jelent olyan molekulákat is, melyek módosított nukleinsav-bázisokat és/vagy cukorkomponenseket, valamint egyéb addicionális szubsztituenseket, mint például diaminokat, koleszterint vagy más lipofil-csoportokat tartalmaznak. A találmány szerinti oligonukleotidokban található monomerek és inter-monomer-kötések bizonyos előnyös kombinációit a későbbiekben részletesen tárgyalni fogjuk.

Általánosan elfogadott az az álláspont, hogy az antiszensz oligonukleotidok hatásukat a célnukleinsav molekulához való kötődés útján fejtik ki, lehetetlenné téve ily módon a célmolekula megfelelő működését vagy egyszerűen a hibridizáció következtében, vagy pedig úgy, hogy a célmolekulához való kötődés aktiválja az RN-áz-H-t, ami a célmolekula meg-

semmisüléséhez vezet. Ezekből a feltételezett hatásmechanizmusokból következik, hogy az antiszensz oligonukleotidok aktivitása szempontjából két paraméter különösen fontos: a duplex-stabilitás és az RN-áz-H aktiválás. A duplex stabilitás azért fontos, mert az oligonukleotidnak ahhoz hogy hatását kifejtthesse akár pusztán a hibridizáció folytán, akár RN-áz-H-közvetítette célmolekula-megsemmisítés útján, feltételezhetőleg duplexet (vagy a Hoogsteen-féle párképzési mechanizmus szerint triplexet) kell képeznie a célnukleinsav-molekulával. Az antiszensz oligonukleotidok RN-áz-H aktiválási hatásmechanizmusa (az a képessége, hogy cél-RNS-hez hibridizálva aktiválja az RN-áz-H-t) akkor játszik szerepet, amikor a célnukleinsav-molekula RNS, mivel ilyen esetekben az RN-áz-H aktiválás a cél-RNS-molekula hatékony megsemmisítéséhez vezet. Az elmondottakon túl ahhoz, hogy egy antiszensz oligonukleotid molekula *in vivo* hatásos legyen, ellenállónak kell lennie a degradációs behatásokkal szemben, hogy elég ideje legyen a célnukleinsav-molekulával való kölcsönhatás létrejöttéhez. Figyelembe véve azt a tényt, hogy az *in vivo* környezet endonukleáz és ekzonukleáz aktivitást egyaránt tartalmaz, az előbbi megállapításból egy harmadik fontos paraméter következik, mégpedig az, hogy az antiszensz oligonukleotidoknak nukleolitikus degradációval szemben ellenállónak kell lenniük.

Ahhoz, hogy az említett paraméterek mindegyikének fontosságát vizsgálni és magyarázni tudjuk, szükséges, hogy rendelkezünk olyan oligonukleotidokkal, melyek az említett paraméterek szempontjából egymástól eltérőek. Az alábbi 1. táblázatban néhány ismert oligonukleotid sajátosságait ismertetjük.

1. táblázat

Különböző oligonukleotidok sajátosságai

Oligonukleotid	Duplex-stabilitás ¹	Nukleáz-rezisztencia ²	RN-áz-H-aktiválás ³
Oligodezoxiribonukleotid (foszfát)	-	-	igen
Oligodezoxiribonukleotid (foszforotioát)	kicsi	+	igen
Oligodezoxiribonukleotid (foszforodioát)	kicsi	++	igen
Oligodezoxiribonukleotid (szelenát)	kicsi	+	nincs adat
Oligodezoxiribonukleotid (foszforamidát)	kicsi	+++	nem
Oligoribonukleotid (foszfát)	nagy	--	nem
Oligoribonukleotid (foszforotioát)	nagy	+	nem
2'-OMe-Oligonukleotid (foszfát)	nagy	+	nem
2'-OMe-Oligoribonukleotid (foszforotioát)	nagy	++	nem
Oligodezoxiribonukleotid-metilfoszfonát	kicsi	+++	nem

¹A komplementer oligoribonukleotiddal képzett duplex stabilitása fiziológias körülmények között, a DNS-RNS duplex stabilitásához hasonlítva.

²DNS-sel összehasonlítva (foszfodiészteráz emésztés).

³Az oligonukleotid RNS-sel alkotott duplexének RN-áz-H-aktiváló képessége.

A találmány szerinti hibrid oligonukleotidok RNS-sel stabilabb duplexet képeznek, mint a foszforotioát oligodezoxiribonukleotidok. Ezen felül endonukleázos és ekzonukleázos degradációval szemben ellenállóbbak, mint a foszforotioát oligodezoxiribonukleotidok és általában aktiválják az RN-áz-H-t. Az elmondottakból következően a találmány szerinti oligonukleotidok kiegészítik az 1. táblázatban bemutatott oligonukleotidokat, az antiszensz oligonukleotidok hatásossága szempontjából lényeges paraméterek vizsgálhatósága tekintetében.

A találmány szerinti oligonukleotidok - amennyiben az antiszensz oligonukleotidok hatásossága szempontjából fontos paraméterek vizsgálatára kívánjuk őket alkalmazni - bármilyen szekvenciájúak lehetnek, mivel a vizsgálat céljára szükséges bármilyen szekvenciájú komplementer oligonukleotidok előállíthatók. A paraméterek vizsgálata céljából előállított találmány szerinti oligonukleotidok a következő lényeges sajátságokkal rendelkeznek. Először, a találmány szerinti oligonukleotidokban található internukleotid kötések közül legalább néhány foszforotioát és/vagy foszforoditioát kötés. A találmány különböző megvalósítási módjai szerint az oligonukleotidokban található foszforotioát és/vagy foszforoditioát internukleotid kötések száma egytől az oligonukleotidban jelenlévő összes internukleotid kötés számáig terjedhet. Az elmondottak alapján a "foszforotioát és/vagy foszforoditioát oligonukleotid" kifejezés magába foglal minden fent említett megvalósítási módot. A találmány szerinti megoldás egy előnyös megvalósítási módja szerint a találmány szerinti oligonukleotidok hossza kb. 2 és kb. 50 nukleotid közötti, és legelőnyösebben kb. 6 és kb. 50 nukleotid közötti. Ebből következően az említett előnyös megvalósítási módok szerint a találmány szerinti oligonukleotidokban 1-49 darab foszforotioát és/vagy foszforoditioát internukleotid kötés található.

A találmány szerinti oligonukleotidok egy második fontos sajátága, hogy dezoxiribonukleozidok vannak jelen bennük. A találmány szerinti oligonukleotidok tartalmazznak legalább egy dezoxiribonukleozidot. A találmány szerinti oligonukleotidok előnyösen tartalmazznak egy négy vagy több dezoxiribonukleotidból álló folytonos részletet, amely RN-áz-H-aktiváló részletként funkcionál. A találmány szerinti megoldás bizonyos előnyös megvalósítási módjai szerint az oligonukleotidokban több, mint egy ilyen aktiváló részlet található. Az ilyen aktiváló részletek az oligonukleotidokon belül bárhol elhelyezkedhetnek.

A találmány szerinti oligonukleotidok tartalmazhatnak többségükben dezoxiribonukleozidokat. Valójában az ilyen találmány szerinti oligonukleotidokban egy kivétellel valamennyi nukleozid lehet dezoxiribonukleozid. Az elmondottak értelmében a találmány egyik előnyös megvalósítási módja szerint az oligonukleotidok kb. 2 és kb. 50 nukleozid hosszúságúak vagy legelőnyösebben kb. 6 és kb. 50 nukleozid közötti hosszúságúak és a bennük található dezoxiribonukleozidok száma 1 és kb. 59 közötti.

A találmány szerinti oligonukleotidok egy harmadik lényeges sajátága a ribonukleozidok, 2'-szubsztituált ribonukleozidok vagy ezek kombinációjának jelenléte. A leírásban használt értelemben a "2'-szubsztituált" kifejezés a ribóz molekula 2'-OH-jának szubsztitúcióját jelöli például 2'-OMe-, 2'-allil-, 2'-aril-, 2'-alkil-, 2'-halo- vagy 2'-aminocsoporttal, a 2'-H-szubsztitúciót nem beleértve, ahol az allil-, aril- vagy alkil-csoportok vagy nincsenek szubsztituálva vagy szubsztituálva vannak, például halogén atommal, hidroxil-, trifluor-metil-, cianid-, nitro-, acil-, aciloxi-, alkoxi-, karboxil-, karbalkoxil-, vagy aminocsoportokkal. A találmány szerinti oligonukleotidok tartalmazznak legalább egy ribonukleozidot és/vagy 2'-szubsztituált

ribonukleozidot. A találmány szerinti megoldás egy előnyös megvalósítási módja szerint az oligonukleotidokban hat vagy több ribonukleozid és/vagy 2'-szubsztituált ribonukleozid található a duplex stabilitás fokozásának céljából. Az ilyen ribonukleozidok és/vagy 2'-szubsztituált ribonukleozidok a találmány szerinti oligonukleotidokban jelen lehetnek egyenként, párosával vagy hosszabb folyamatos részletekben, jelen lehetnek az oligonukleotidok bármely részén és jelen lehetnek több, mint egy helyen is. A találmány szerinti oligonukleotidokban egy kivételével valamennyi nukleozid lehet ribonukleozid és/vagy 2'-szubsztituált ribonukleozid. Az elmondottak értelmében a találmány szerinti megoldás egy előnyös megvalósítási módja szerint az oligonukleotidok kb. 2 és kb. 50 nukleozid közötti hosszúságúak és legelőnyösebben kb. 6 és kb. 50 nukleozid közötti hosszúságúak, a bennük található ribonukleozidok és/vagy 2'-szubsztituált ribonukleozidok száma pedig kb. 1-től kb. 49-ig terjedhet.

Az a képesség, hogy az oligonukleotidokon belül változtatni lehet a foszforotioát és/vagy foszforoditioát internukleotid kötések, a dezoxiribonukleozidok, valamint a ribonukleozidok vagy 2'-szubsztituált ribonukleozidok számát, lehetővé teszi a kutató számára, hogy vizsgálni tudja ezen változtatható sajátságok befolyását az oligonukleotidok jelentős sajátságainak vonatkozásában, úgy, mint nukleázrezisztencia, duplex-stabilitás és RN-áz-H-aktiválási képesség. Az oligonukleotidok méretének változtathatósága még egy paraméter vizsgálatát lehetővé teszi. Az elmondottakon túl a kisebb oligonukleotidok (például dimerek) felhasználhatók nagyobb oligonukleotidok építőköveiként. A fentiekben ismertetett valamennyi lehetséges megvalósítási mód hasznos az említett paraméterek vizsgálata szempontjából.

A találmány egy másik fontos szempontja szerint a találmány tárgyát képezik olyan hibrid oligonukleotidok, melyek hatékonyan gátolják vírusok, vagy patogén organizmusok szaporodását vagy bizonyos celluláris gének expresszióját. Az ilyen gátló hatások nyilvánvalóan rendkívül fontosak lehetnek egy egész sor betegség kezelése szempontjából. A találmány jelen szempontja szerinti oligonukleotidok minden sajátosságuk vonatkozásában megegyeznek a korábban ismertetett találmány szerinti oligonukleotidokkal, azzal az eltéréssel, hogy szekvenciájuk nem tetszőleges, hanem valamely vírusból, patogén organizmusból vagy celluláris génből származó nukleinsav-szekvenciával komplementer. A találmány jelen szempontja szerinti oligonukleotidok előnyösen kb. 6 és kb. 50 nukleotid közötti hosszúságúak. A leírásban használt értelemben a "valamely nukleinsav-szekvenciával komplementer oligonukleotid-szekvencia" kifejezés olyan oligonukleotid-szekvenciát (2 és kb. 50 közötti hosszúságút) jelent, amely fiziológias körülmények között képes az adott nukleinsav-szekvenciához hibridizálódni, például Watson-Crick-féle bázispárosodási reakciók útján (oligonukleotid és egyszálú nukleinsav közötti kölcsönhatás) vagy Hoggsteen-féle bázispárosodási reakciók útján (oligonukleotid és kettősszálú nukleinsav közötti kölcsönhatás) vagy bármely más módon. Az ilyen hibridizáció megtörténtét fiziológias körülmények között gyakorlati módon detektáljuk, azaz kimutatjuk a célnukleinsav-szekvencia funkcionális zavarait.

Az a nukleinsav-szekvencia, melynek valamely találmány szerinti oligonukleotid a komplementere különböző lehet attól függően, hogy milyen ágens gátlását kívánjuk elérni. Sok esetben a kiválasztott nukleinsav-szekvencia valamely vírus eredetű nukleinsav-szekvencia. Az antiszensz oligonukleotidok alkalmazása különféle vírusok szaporodásának gátlására a technika állása szerint közismert és az ilyen alkalmazások áttekinthetők

Agrawal közelmúltban publikált összefoglaló munkájában [Tibtech 10, 152 (1992)]. Számos vírus vonatkozásában leírtak olyan szekvenciákat, melyek hatásosan alkalmazható antiszensz oligonukleotidokkal komplementerek. Leírtak ilyen szekvenciákat például az 1-es típusú humán immun defficiencia-vírus (HIV-1; 4 806 663 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás, melyben található teljes feltárás a technika állásához tartozó kitanítás részeként tekintendő), a herpesz-simplex-vírus (4 689 3320 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás, melyben található teljes feltárást a technika álláshoz tartozó kitanítás részeként kell tekintetni), az influenza-vírus (5 XXX XXX számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés; bejelentés száma: 07/516,275, megadták: 1992. június 30-án; melyben található teljes feltárás a technika állásához tartozó kitanítás részeként tekinteni), valamint a humán papilloma-vírus vonatkozásában [Storey és mtsai.: Nucleic Acids Res. 19, 4109 (1991)]. A találmány szerinti oligonukleotidok szekvenciája a felsorolt szekvenciák bármelyikének lehet komplementere, de lehet bármely más vírusból származó szekvenciával is komplementer. Az alább felsorolt vírusok is tartalmazznak olyan ismert szekvenciákat, melyekkel szemben hatékony antiszensz oligonukleotidokat lehet előállítani: a száj- és körömfájás vírusa [Robertson és mtsai.: J. Virology 54, 651 (1985); Harris és mtsai.: J. Virology 36, 659 (1980)], a sárgaláz vírusa [Rice és mtsai.: Science 229, 726 (1985)], a Varicella-Zoster-vírus [Davison and Scott: J. Gen. Virology 67, 2279 (1986)], és az uborka mozaik-vírus [Richards és mtsai.: Virology 89, 395 (1978)].

Az elmondottakon túl a találmány szerinti oligonukleotidok szekvenciája lehet valamely patogén organizmus szekvenciájának komplementere. Sok patogén organizmus tartalmaz ismert nukleinsav-szekvencia részleteket, ezek közé tartozik a maláriát okozó *Plasmodium falciparum* és sok patogén

baktérium is. A találmány szerinti oligonukleotidok szekvenciája lehet bármely említett patogén organizmusból származó nukleinsav-szekvencia komplementere. Az alábbiakban felsorolunk olyan patogén eukarióta szervezeteket, melyek tartalmazznak olyan ismert nukleinsav-szekvencia-részleteket, melyek ellen hatékony antiszensz oligonukleotidokat lehet előállítani: *Trypanosoma brucei gambiense* és *Leishmania* [Campbell és mtsai.: Nature 311, 350 (1984)], *Fasciola hepatica* [Zurita és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 2340 (1987)]. Gombaellenes antiszensz oligonukleotidokat készíthetünk például oly módon, hogy szekvenciájuk komplementer legyen például valamely kitin szintetáz génből származó célszekvenciával, valamint antibakteriális oligonukleotidokat készíthetünk oly módon, hogy szekvenciájuk komplementer legyen például valamely alanin racemáz génből származó szekvenciariészlettel.

A találmány egy másik megvalósítási módja szerinti oligonukleotidok szekvenciája komplementer lehet valamely cellurális gén vagy gén transzkriptum szekvenciájával, amely gén rendellenes expressziója vagy génterméke betegséghez vezet. Számos ilyen cellurális gént leírtak már, például: a prion-proteint [Stahl and Prusiner, FASEB J. 5, 2799 (1991)], az Alzheimer-kórral asszociált amiloidszerű proteint (5 015 570 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás, amelyben foglalt teljes feltárást a technika állásához tartozó kitanítás részeként kell tekinteni), valamint számos jól ismert onkogént és protoonkogént, mint például a *c-myb*-, *c-myc*-, *c-abl*-, valamint az *n-ras*-géneket. Az elmondottakon túl az olyan oligonukleotidok, melyek olyan strukturális fehérjék vagy enzimek szintézisét gátolják, melyek nagyrészt vagy kizárólag a spermatogenezissel, a spermiumok mobilitásával, a spermiumok petesejthez történő kötődésével vagy egyéb spermiumok életképességével összefüggő biokémiai folyamatokban ját-

szanak szerepet alkalmazhatók férfi fogamzásgátlóként. Hasonlóképpen női fogamzásgátlóként alkalmazhatók olyan oligonukleotidok, melyek az ovulációban, a megtermékenyülésben, a pete beágyazódásában vagy az említett folyamatokat befolyásoló hormonok bioszintézisében szerepet játszó fehérjéket vagy enzimeket gátolnak. A magas vérnyomás befolyásolható olyan oligodezoxinukleotidokkal, amelyek az angiotenzin konvertáló enzim vagy a renin/angiotenzin-rendszerben szerepet játszó egyéb enzim aktivitását gátolják; a vérlemezkék aggregációja szabályozható olyan enzimek gátlásával, melyek szükségesek a thromboxane-A₂ szintéziséhez, amely vegyület szerepet játszik a miokardiális és cerebrális keringési rendellenességek, például infarktuszok, arterioszklerózis, embólia és trombózis kialakulásában; a koleszterin lerakódása az artériák falán gátolható a zsírsavval acilezett koenzim-A szintézisének szuppressziójával: a koleszterol acil transzferáz gátlása útján, arterioszklerózis esetén; a kolin-foszfotranszferáz szintézisének gátlása hipolipidémia esetén lehet hatásos.

Számos olyan idegi rendellenesség létezik, melyek esetén az antiszensz oligonukleotiddal kiváltott hibridizációs gátlást felhasználhatjuk a betegség káros hatásainak csökkentésére vagy megszüntetésére. Példaként megemlíthetjük a Parkinson-kór esetén a monoamin oxidáz szintézisének gátlását; depresszió kezelésére a katekol o-metil-transzferáz gátlását; valamint skizofrénia kezelésére az indol N-metil-transzferáz gátlását.

Az arachidonsav-kaszád - mely reakcióút a prosztaglandinok és leukotriének szintéziséhez vezet - bizonyos kiválasztott enzimeinek gátlása hasznos lehet a vérlemezke-aggregáció szabályozásában, valamint az allergia, gyulladások, fájdalmak és asztma kezelésében.

A többszörös gyógyszerrezisztenciát (*multi drug resistance*) okozó mdr-génről termelődő fehérje - melynek aktivitása egy egész sor rákellenes

hatóanyaggal szemben rezisztenciát idéz elő és így módon a hatékony kemo-
terápiás kezelések egyik legnagyobb akadálya - expressziójának gátlása a
rákos megbetegedések kezelésében rendkívül előnyös tényező lehet.

A találmány szerinti oligonukleotidok szekvenciája komplementer le-
het valamely említett génből származó szekvenciával. A találmány szerinti
oligonukleotidok szekvenciája lehet továbbá komplementer bármely olyan
celluláris génből vagy géntraszkriptumból származó szekvenciával, amely
gén abnormális expressziója vagy génterméke megbetegedést idéz elő.

Az 5 107 065 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás-
ban - melyben található teljes feltárást a technika állásához tartozó kitanítás
részeként kell tekinteni - a gén-expresszió növényi sejtekben történő
antiszensz-szabályozására találhatunk példákat.

A találmány tárgyát képezik továbbá terápiás célra alkalmas
oligonukleotidokat tartalmazó gyógyászati készítmények, melyek hatásosak
vírusfertőzések kezelésében, egyéb patogén fertőzések kezelésében, vala-
mint olyan betegségek kezelésében, melyek abnormális génexpresszió vagy
abnormális géntermékek expressziója folytán keletkeztek. Az ilyen talál-
mány szerinti gyógyászati készítmények az előbbieken említett találmány
szerinti oligonukleotidokat tartalmazzák gyógyászatilag elfogadható hordo-
zóban.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás valamely vírus vagy
patogén organizmus génexpressziójának gátlására vagy valamely celluláris
gén expressziójának gátlására, amely szerint a vírus által vagy a patogén or-
ganizmus által fertőzött sejteket találmány szerinti oligonukleotidokkal
érintkeztetjük az első két esetben, a harmadik esetben pedig a sejteket válo-
gatás nélkül találmány szerinti oligonukleotidokkal érintkeztetjük. Az emlí-

tett találmány szerinti eljárás alkalmas a génexpresszió, valamint kiválasztott gének működésének tanulmányozására.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás valamely beteg ember vagy állat kezelésére, amely betegség vírus vagy egyéb patogén organizmus okozta fertőzés következménye, vagy valamely cellurális gén abnormális expressziójának vagy abnormális termékének a következménye. Az eljárás szerint a beteg embernek vagy állatnak a találmány szerinti oligonukleotidokat tartalmazó gyógyászati készítményt adunk be. A gyógyászati készítmény beadásának módja előnyösen többek között orális, intranazális, rektális és helyi adagolás. Az említett találmány szerinti kezelési eljárásokban az oligonukleotidokat más terápiás hatóanyagokkal együttesen is alkalmazhatjuk, mint például AZT-vel együtt, AIDS esetén.

A találmány szerinti kezelési eljárással egy egész sor virális megbetegedés kezelhető, mint például az AIDS, ARC, orális vagy genitális herpesz, papilloma-vírusok okozta szemölcsök, influenza, száj- és körömfájás, sárgaláz, csirkehimlő, övsömör, HTLV-leukémia, valamint hepatitisz. A találmány szerinti eljárással kezelhető gombák okozta megbetegedések között megemlíthetjük a candidiasist, a histomplasmosist, a cryptococcosist, a blastomycosist, az aspergillosist, a sporotrichosist, a chromomycosist, a dermatophytosist és a coccidioidomycosist. A találmány szerinti eljárás alkalmas rickettsiás megbetegedések (például tífusz, sziklás hegységi kiütéses láz), valamint a *Chlamydia trachomatis* vagy *Lymphogranuloma venerum* által okozott nemi úton terjedő megbetegedések kezelésére is. A találmány szerinti eljárás alkalmas különböző paraziták okozta megbetegedések, mint például az amebiasis, a Chagas-kór, a toxoplasmosis, a pneumocystosis, a giardiasis, a cryptosporidiosis, a trichomoniasis, és a *Pneumocystis carini* okozta tüdőgyulladás kezelésére. A találmány szerinti eljárás alkalmas to-

vábbá férgek (bél férgek) okozta megbetegedések, mint például az ascariasis, a filariasis, a trichinosis, a schistosomiasis, valamint nematoda vagy cestoda fertőzések kezelésére is. A találmány szerinti eljárás alkalmas malária kezelésére is, függetlenül attól, hogy a maláriát *P. falciparum*, *P. vivax* vagy *P. malariae* okozza-e.

Valamennyi fent említett fertőző megbetegedés kezelhető a találmány szerinti kezelési eljárással, mivel a felsorolt betegségek kórokozói minden esetben ismertek és ezért lehetséges előállítani olyan találmány szerinti oligonukleotidokat, melyek szekvenciája komplementer valamely, a fertőző ágens szaporodása szempontjából esszenciális nukleinsav szekvenciával, mint például valamely esszenciális génből származó szekvenciával.

A találmány szerinti eljárással kezelhető egyéb megbetegedések között megemlíthetjük azokat a megbetegedéseket, melyeket valamely cellurális gén abnormális expressziója vagy génterméke okoz. Az ilyen megbetegedések kezelhetők valamely találmány szerinti oligonukleotid beadása útján, amint azt a leírás korábbi részeiben már ismertettük.

A találmány szerinti oligonukleotidokat megszintetizálhatjuk a technika állása szerint közismert eljárások alkalmazásával. A találmány szerinti oligonukleotidok előnyösen megszintetizálhatók a H-foszfónát-eljárás alkalmazásával, melynek leírását megtalálhatjuk az 5 XXX XXX számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban (bejelentés száma: 07/334,679; megadva: 1992. március 10.), amelyben foglalt teljes feltárást a technika állásához tartozó kitanítás részeként kell tekinteni, valamint Agrawal és Tang közleményében [Tetrahedron Lett. 31, 7541 (1990)]. A találmány szerinti oligonukleotidokat még ellenállóbbakká tehetjük a nukleolitikus degradációval szemben, amennyiben azokat az 5'- és/vagy 3'-végükön ún. "sapka"-struktúrákkal látjuk el. Az alábbiakban ismertetésre ke-

rülő kísérleti példákkal a találmány szerinti megoldást kívánjuk tovább szemléltetni, anélkül azonban, hogy igényünket az ismertetettekre korlátoznánk.

1. példa

Hibrid foszforotioát oligonukleotidok szintézise

A hibrid foszforotioát oligonukleotidokat CPG-n szintetizáltuk, 5-6 μ mól-os méretben automatikus szintetizátoron (Millipore, 8700-as model, Milford, MA). Az 5 XXX XXX számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban (bejelentés száma: 07/344 679; megadva: 1992. március 19-én) feltárt H-foszfónátos módszer alkalmazásával. A dezoxinukleozid-H-foszfónátokat a Millipore-tól (Milford, MA) szereztük be. A 2'-OMe-ribonukleotid-H-foszfónátokat közismert eljárások alapján szintetizáltuk. A 2'-OMe-nukleotidokat tartalmazó oligonukleotid részleteket oly módon építettük össze, hogy a megfelelő ciklusban a 2'-OMe-ribonukleotid-H-foszfónátokat alkalmaztunk. Hasonlóképpen a dezoxiribonukleozidokat tartalmazó oligonukleotid részleteket oly módon építettük össze, hogy a megfelelő ciklusban dezoxinukleozid-H-foszfónátokat alkalmaztunk. Az összeépítés után a CPG-kötött oligonukleotid-H-foszfónátokat kénnel oxidáltuk és így módon alakítottuk ki a foszforotioát kötéseket. Az oligonukleotidokról ezután 40 °C-on, 48 órán keresztül, koncentrált NH_4OH -val végzett kezeléssel eltávolítottuk a védőcsoportokat.

A nyers oligonukleotidokat (közelítőleg egy A_{260} -egységnyit) kisnyomású reverz fázisú kromatográfiával analizáltuk, C_{18} -reverz fázisú kromatográfiás tölteten. A DMT-csoportot 80 %-os vizes ecetsavval történő kezeléssel távolítottuk el, ezután az oligonukleotidokat desztillált vízzel szemben dializáltuk, majd liofilizáltuk.

A szintetizált oligonukleotidokat az alábbi 2. táblázatban mutatjuk be.

2. táblázat

A szintetizált hibrid foszforotioát*-oligonukleotidok összefoglalása

Az oligonukleotid jele	Az oligonukleotid szerkezete
A	⁵ ACACCCAATTCTGAAAATGG ³
B	ACACCCAATTCUGAAAUGG
C	<u>ACACCCAATTCTGAAAUGG</u>
D	<u>ACACCCAATTCUGAAAUGG</u>
E	<u>ACACCCAUA</u> UTCTGAAAATGG
F	<u>ACACCCAUAUCUG'AAAUGG</u>

Az aláhúzott szekvenciárészletek 2'-OMe ribonukleozidokat tartalmaznak.

* Az A-G oligonukleotidok valamennyi internukleotid kötése foszforotioát kötés.

2. példa

A hibrid foszforotioát-oligonukleotidok relatív nukleáz rezisztenciája

A különböző hibrid foszforotioát oligonukleotidokat relatív nukleáz rezisztanciájuk vizsgálatának céljából kigyóméreg foszfodiészterázzal (SVPD-vel) kezeltük. Az A-, C- és F-jelű oligonukleotidokból 0,2-0,2 A₂₆₀-egységnyi 550 µl pufferben feloldottunk (40 mmól/l NH₄CO₃, pH = 0,4, 20 mmól/l MgCL₂) és az oldathoz ... egység SVPD-t adtunk. A reakcióelegyet ezután 37°C-on 420 percig inkubáltuk, majd 0, 200 és 420 perc elteltével 165 µl alikvotokat vettünk, melyeket ioncserélő HPLC-vel analizáltunk. A kapott eredményeket az 1. ábrán mutatjuk be. Az F-jelű oligonukleotid foszfodiészteráz-emésztéssel szemben rendkívül rezisztensnek bizonyult, ezzel szemben az A-jelű oligonukleotid csaknem teljesen megemésztődött, a C-oligonukleotid pedig kb. 50 %-ban emésztődött meg (lásd az ábra A-

részét). Egy foszfodiészter-oligonukleotid az előző esetben alkalmazott SVDP-mennyiség 1/10-ével emésztve 1 perc alatt kb. 80 %-ban lebomlott.

Az ismertetett eredmények arra utalnak, hogy a 2-OMe-ribonukleozidok jelenléte a foszforotioát-oligonukleotidok egzonukleolitikus emésztéssel szembeni rezisztenciáját fokozza, és az is látható, hogy ez a fokozott rezisztencia annál nagyobb, minél nagyobb arányban tartalmaz az adott nukleotid 2'-OMe-ribonukleotidokat. Mivel ismeretesek a ribonukleotidok, egyéb 2'-szubsztituált ribonukleotidok, valamint a 2'-OMe-ribonukleotidok hasonló sajátságai és viselkedése, az ismertetett eredmények alapján az is feltételezhető, hogy hasonló nukleáz rezisztencia növekedést tapasztalnánk azon hibrid foszforotioát és/vagy foszforoditioát oligonukleotidok esetén, melyek ribonukleotidokat, 2'-szubsztituált ribonukleotidokat vagy ribonukleotidok és 2'-szubsztituált ribonukleotidok elegyét tartalmazzák.

3. példa

A hibrid foszforotioát oligonukleotidok relatív duplex-stabilitása

Vizsgáltuk az A-F-jelű oligonukleotidok komplementer oligodezoxinukleotidokkal, valamint komplementer oligoribonukleotidokkal alkotott duplexeinek relatív stabilitását. Valamennyi vizsgált oligonukleotidot egymástól elkülönítve összekevertünk ekvivalens mennyiségű (0,2 A_{260} -egység) megfelelő komplementer oligonukleotiddal a következő összetételű pufferben: 150 mmól/l NaCl, 10 mmól/l Na_2PO_4 , 1 mmól/l EDTA, pH = 7. A reakcióelegyeket ezután 5 percig 85 °C-on tartottuk, majd 30 °C-ra hűtöttük. A hőmérsékletet ezután 30 °C-ról 80 °C-ra emeltük 1 °C/perc sebességgel és a mért A_{260} -értékeket a hőmérséklet függvényében ábrázoltuk. A kapott eredményeket az alábbi 3. táblázatban mutatjuk be.

3. táblázat

A kialakított duplexek olvadáspontja

Oligonukleotid jele	DNS-DNS Duplex		DNS-RNS Duplex		T _m (RNS) Duplex-T _m (RNS) Duplex (°C)	DNS-RNS-Duplex w/Magnézium	
	T _m DNS °C	Különbség az A- oli- gonukleotid T _m -értéké- hez viszo- nyítva (°C)	T _m (RNS) (°C)	Különbség az A- oli- gonukleotid T _m -értéké- hez viszo- nyítva (°C)		T _m (RNS) (Mg; °C)	Különbség az A- oli- gonukleotid T _m -értéké- hez viszo- nyítva (°C)
A	51,1	0	43,4	0	-7,7	48,1	0
B	48,3	-2,8	50,9	7,5	2,6	58,4	10,3
C	49,9	-1,2	48,9	5,5	-1,0	54,2	6,1
D	45,1	-6,0	50,9	7,5	5,8	56,1	8,0
E	47,2	-3,9	51,1	7,7	3,9	56,5	8,4
F	47,6	-3,5	61,1	17,7	13,5	69,1	21,0

A bemutatott eredményekből látható, hogy amennyiben a komplementer oligonukleotid oligoribonukleotid, a 2'-OMe-ribonukleotidok jelenléte fokozza a duplex-stabilitást, és a duplex-stabilitás annál nagyobb, minél nagyobb a jelenlévő 2'-OMe-ribonukleotidok aránya. Ezek a megfigyelések minden bizonnyal hasonlóképpen érvényesek olyan hibrid foszforotioát és/vagy foszforoditioát oligonukleotidokra is, melyek ribonukleotidokat, 2'-szubsztituált ribonukleotidokat vagy ribonukleotidok és 2'-szubsztituált ribonukleotidok elegyét tartalmaznak. Elmondhatjuk tehát, hogy a találmány szerinti hibrid foszforotioát és/vagy foszforoditioát oligonukleotidok a virális RNS-t vagy vírust, valamint a pagotén organizmusból vagy valamely sejtől származó mRNS-t nagyobb affinitással kötik, mint az általánosan alkalmazott foszforotioát oligodezoxinukleotidok.

4. példa

RN-áz-H aktiválása hibrid foszforotioát oligonukleotidokkal

Vizsgáltuk különböző foszforotioát oligonukleotidok és hibrid foszforotioát oligonukleotidok RN-áz-H aktiváló sajátosságait. Kontrollként az A-oligonukleotidot (lásd 2. táblázat) alkalmaztuk, amelyről ismert volt, hogy aktiválja az RN-áz-H-t. Az F-oligonukleotidot (egy 2'-OMe-foszforotioát oligonukleotid analóg), valamint a hibrid C-, B-, és E-oligonukleotidokat vizsgáltuk RN-áz-H aktiváló képesség szempontjából.

A kísérlet végrehajtása céljából szintetizáltunk egy 32-tagú komplementer oligonukleotidot (2. ábra), amit az 5'-végén kinázoltunk, majd az így kapott ^{32}P -jelzett 32-tagú RNS-oligonukleotidot (0,003 A_{260} -egység; 0,01 μg) összekevertük az oligonukleotidokkal (0,0635-0,0635 A_{260} -egység; 1,9 μg) 20 μl pufferben (0,15 mól/l NaCl, 0,01 m

MgCl₂, 0,01 m TRIS-klorid, pH = 7,9, 0,001 mól/l DTT). A kialakított reakcióelegyet hat egység RN-áz-H-val (*E. coli*), 37 °C-on inkubáltuk. A reakcióelegyekből 0, 15, 30 és 60 perc elteltével 4,5 µl-es alikvotokat vettünk, melyeket poliakrilamid-gélelektroforézissel analizáltunk.

Az A-oligonukleotidon (A-duplexen) helyspecifikus RN-áz-H hasítást tapasztaltunk. Az F-oligonukleotidon (2'-OMe-analóg; B-duplex) nem tapasztaltunk RN-áz-H-okozta RNS-hasítást. A B-, C- és E-jelű hibrid oligonukleotidokon (sorrendben: C-, D- és E-duplexeken) helyspecifikus RN-áz-H hasítást tapasztaltunk. Az F-duplexen - amelyben egy nem párosodó bázist is tartalmazó foszforotioát oligonukleotidot vizsgáltunk - nem tapasztaltunk RNS-hasítást. A G-sávban azt láthatjuk, hogy az RNS nem hasadt el RN-áz-H jelenlétében.

5. példa

HIV-vírus gátlása hibrid foszforotioát oligonukleotidokkal

Vizsgáltuk, hogy a hibrid foszforotioát oligonukleotidok képesek-e szövettenyészetben a HIV-1-vírus szaporodását gátolni. H9-limfocitákat fertőztünk HIV-1-virionokkal ($\cong$ 0,01 - 0,1 TCID₅₀/sejt) egy órán keresztül 37 °C-on. Egy óra elteltével a nem-abszorbeálódott virionokat lemostuk és a fertőzött sejteket szétosztottuk egy 24 mélyületű lemez mélyületeibe. A fertőzött sejtekhez (törzsoldatból) megfelelő koncentrációjú oligonukleotidot adtunk úgy, hogy a 2 ml-nyi tápközegben kialakuljon a kívánt oligonukleotid végkoncentráció. A pozitív kontrol kísérletben a sejtekhez ddC-t vagy AZT-t adtunk. A sejteket ezután három napig tenyésztettük. A 3. nap elteltével a fertőzött sejtek tenyészetének felülúszóit begyűjtöttük és ELISA-eljárással p24-

expressziót mértünk bennük. Az oligonukleotidokkal kezelt és a kezeltlen (semmilyen hatóanyaggal nem kezelt) fertőzött sejtekben mért p24-expressziós szinteket összehasonlítottuk.

Valamennyi vizsgált hibrid foszforotioát oligonukleotid esetén jelentős mértékű p24-expresszió-gátlást tapasztaltunk a $\mu\text{g/ml}$ -es koncentrációtartományban, jelentős citotoxikus hatások nélkül (kísérleti adatokat nem közlünk). Ezek a kísérleti eredmények arra utalnak, hogy a 2'-OMe-ribonukleotidokat tartalmazó hibrid foszforotioát oligonukleotidok a génexpresszió hatékony inhibitorai. Feltehetőleg hasonlóan hatékonyak a ribonukleozidokat, 2'-szubsztituált ribonukleozidokat vagy ribonukleozidok és 2'-szubsztituált ribonukleozidok elegyét tartalmazó foszforotioát és/vagy foszforoditioát oligonukleotidok is.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Hibrid foszforotioát és/vagy foszforoditioát oligonukleotid, *azzal jellemezve*, hogy dezoxiribonukleozidot, ribonukleozidot vagy 2'-szubsztituált ribonukleozidot, valamint foszforotioát és/vagy foszforoditioát internukleotid kötést tartalmaz.

2. Az 1. igénypont szerinti oligonukleotid, *azzal jellemezve*, hogy dezoxiribonukleozidként egy legalább négy dezoxiribonukleozidból álló folytonos részletet tartalmaz.

3. Az 1. igénypont szerinti oligonukleotid, *azzal jellemezve*, hogy ribonukleozidként vagy 2'-szubsztituált ribonukleozidként legalább két egymás mellett elhelyezkedő ribonukleozidból és/vagy 2'-szubsztituált ribonukleozidból álló részletet tartalmaz.

4. Az 1. igénypont szerinti oligonukleotid, *azzal jellemezve*, hogy szekvenciája komplementer egy vírusból, egyéb patogén organizmusból vagy cellurális génből származó nukleinsav szekvenciával.

5. A 2. igénypont szerinti oligonukleotid, *azzal jellemezve*, hogy szekvenciája komplementer egy vírusból, egyéb patogén organizmusból vagy cellurális génből származó nukleinsav szekvenciával.

6. A 3. igénypont szerinti oligonukleotid, *azzal jellemezve*, hogy szekvenciája komplementer egy vírusból, egyéb patogén organizmusból vagy cellurális génből származó nukleinsav szekvenciával.

7. Terápiás gyógyászati készítmény, *azzal jellemezve*, hogy 4. igénypont szerinti oligonukleotidot tartalmaz gyógyászatilag elfogadható hordozóban.

8. Terápiás gyógyászati készítmény, *azzal jellemezve*, hogy 5. igénypont szerinti oligonukleotidot tartalmaz gyógyászatilag elfogadható hordozóban.

9. Terápiás gyógyászati készítmény, *azzal jellemezve*, hogy 6. igénypont szerinti oligonukleotidot tartalmaz gyógyászatilag elfogadható hordozóban.

10. Eljárás víruseredetű, egyéb patogén organizmusból származó vagy cellurális eredetű gén expressziójának gátlására, *azzal jellemezve*, hogy a vírussal, vagy egyéb patogén organizmussal fertőzött sejtet vagy azt a sejtet, amelyben a gátolni kívánt gén található, a 4. igénypont szerinti oligonukleotiddal érintkeztetjük.

11. Eljárás víruseredetű, egyéb patogén organizmusból származó vagy cellurális eredetű gén expressziójának gátlására, *azzal jellemezve*, hogy a vírussal, vagy egyéb patogén organizmussal fertőzött sejtet vagy azt a sejtet, amelyben a gátolni kívánt gén található, a 5. igénypont szerinti oligonukleotiddal érintkeztetjük.

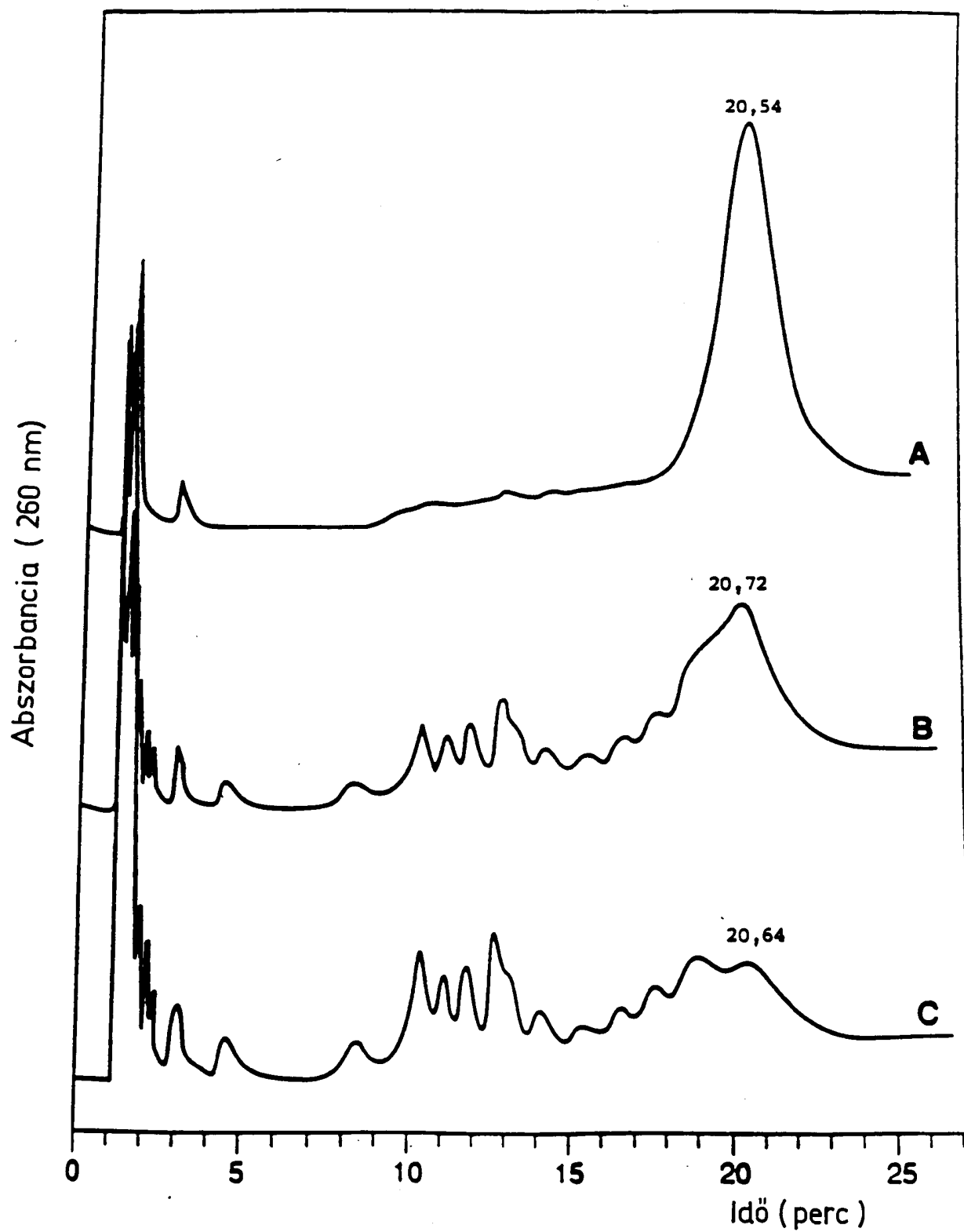
12. Eljárás víruseredetű, egyéb patogén organizmusból származó vagy cellurális eredetű gén expressziójának gátlására, *azzal jellemezve*, hogy a vírussal, vagy egyéb patogén organizmussal fertőzött sejtet vagy azt a sejtet, amelyben a gátolni kívánt gén található, a 6. igénypont szerinti oligonukleotiddal érintkeztetjük.

27 old.
3 rajz
30 old.

Jensen

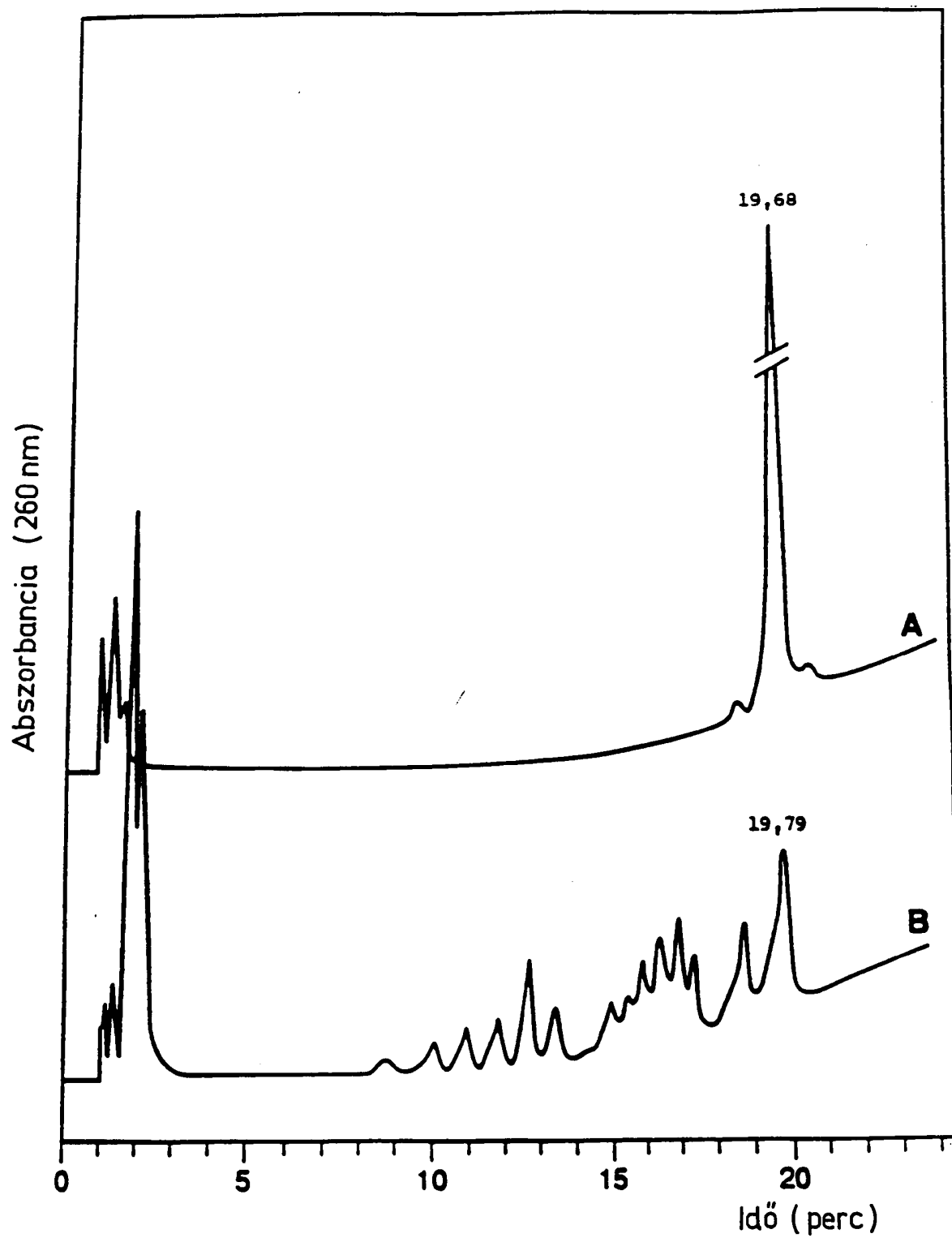
A meghatalmazott:

J. Válo



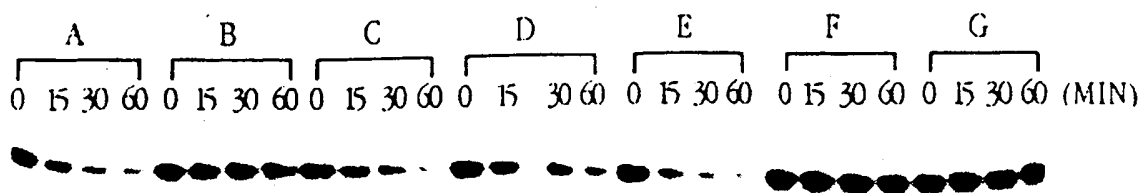
1a ábra

[Handwritten signature]



1b ábra

Joe Válos



		Oligo-nukleotid	Du-plex
RNA	3' UACAGCUGUGGGUUAAGACUUUUACCUAUUUG 5' 5' ACACCCAATTCTGAAAATGG 3'	A	1
RNA	3' UACAGCUGUGGGUUAAGACUUUUACCUAUUUG 5' 5' ACACCCA <u>AAUUCUGAAA</u> UGG 3'	F	2
RNA	3' UACAGCUGUGGGUUAAGACUUUUACCUAUUUG 5' 5' ACACCCAATTCTGAAA <u>AAUG</u> G 3'	C	3
RNA	3' UACAGCUGUGGGUUAAGACUUUUACCUAUUUG 5' 5' ACACCCAATTCTGAAA <u>AAUG</u> G 3'	B	4
RNA	3' UACAGCUGUGGGUUAAGACUUUUACCUAUUUG 5' 5' ACACCCA <u>AAU</u> TCTGAAAATGG 3'	E	5
RNA	3' UACAGCUGUGGGUUAAGACUUUUACCUAUUUG 5' 5' ACAGACTTACCTCAGATAAT 3'	MIS-MATCHED	6
RNA	3' UACAGCUGUGGGUUAAGACUUUUACCUAUUUG 5'	—	—

 = 2' -OCH₃ -RIBO UNITS