

P9603277

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

76675

**A raf-gén expressziójának modulálására alkalmas
antiszensz oligonukleotidok és eljárások**

Kivonat

A találmány tárgyát a természetesen előforduló, és az abnormális sejtproliferációban és tumorkialakulásban szerepet játszó celluláris gén, a raf-gén expressziójának modulálására alkalmas antiszensz oligonukleotidok és eljárások képezik.

A találmány szerinti eljárások alkalmasak sejtek hiperproliferációjának gátlására, és alkalmazhatók mind a diagnosztikában, mind pedig a terápiában. Ezenkívül a találmány szerinti megoldás alkalmas minden olyan állapot kezelésére, amely összefüggésben áll a raf-gén expressziójával.

Jellemezés: 3/10/97

Bevétel

Py6832 17

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

A⁶

Képviselő:

DANUBIA SZABADALMI ÉS VÉDJEGY IRODA Kft.

A raf-gén expressziójának modulálására alkalmas antiszensz oligonukleotidok és eljárások

A találmány tárgyát a természetesen előforduló, és az abnormális sejtproliferációban és tumorkialakulásban szerepet játszó celluláris gén, a raf-gén expressziójának modulálására alkalmas antiszensz oligonukleotidok és eljárások képezik.

A találmány szerinti eljárások alkalmasak sejtek hiperproliferációjának gátlására, és alkalmazhatók mind a diagnosztikában, mind pedig a terápiában. Ezenkívül a találmány szerinti megoldás alkalmas minden olyan állapot kezelésére, amely összefüggésben áll a raf-gén expressziójával.

A rák fő okozójának a sejt azon génjeinek megváltozását tekintjük, amelyek közvetlenül vagy közvetve kontrollálják a sejt növekedését és differenciálódását. A raf-géncsalád három konzervált gént tartalmaz, amelyet A-, B- és C-raf-nak (vagy raf-1-nek) hívunk. A raf-gének protein kinázokat kódolnak, amelyek fontos szabályzó szerepet töltenek be a szignáltranszdukció folyamatában, amely szabályozza a sejtproliferációt. Amióta ismertté vált, hogy a tüdő karcinóma sejtvonalak 60%-a rendszerint magas szinten

fejezi ki a c-raf-mRNS-t és proteint, úgy vélik, hogy a c-raf-protein expressziója szerepet játszik az abnormális sejtproliferációban. Rapp és mtsai: "The Oncogene Handbook", szerk.: E. P. Reddy, A. M. Skalka és T. Curran, Elsevier Science Publishers, New York, 213-253 (1988).

Az oligonukleotidokat rendellenes állapotok kezelésének terápiás részeként alkalmazták állatokban és emberekben. Például ezen a területen dolgozó kutatók azonosítottak antiszensz, triplex és más oligonukleotidokat, amelyek képesek voltak modulálni az olyan gének expresszióját, amelyek a vírusos, gombás és metabolikus betegségekkel álltak összefüggésben.

Például az 1992. augusztus 4-én megadott 5135917 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalom leírása olyan antiszensz oligonukleotidokat közöl, amelyek gátolják a humán interleukin-1-receptor expresszióját. Az 5098890 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalom, melyet 1992. március 24-én adtak meg Gewirtz és mtsai. neve alatt, az antiszensz oligonukleotidok c-myb-onkogénhez való komplementeritására vonatkozik és az antiszensz oligonukleotid terápiákkal bizonyos rákos állapotok esetén. Az 5087617 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalom, melyet 1992. február 11-én adtak meg, olyan eljárásokra vonatkozik, amelyekben antiszensz oligonukleotidokkal kezelnek rákos betegeket. Az 5166195 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalom - melyet 1992. november 24-én adtak meg - oligonukleotid HIV-inhibitorokra vonatkozik. Az 5004810 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalom, me-

lyet 1991. április 2-án adtak meg, olyan oligomerekre vonatkozik, amelyek képesek hibridizálódni a *herpes simplex* vírus Vmw65 mRNS-éhez és gátolják a replikációt. Az 5194428 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalom, melyet 1993. március 16-án adtak meg, olyan antiszensz oligonukleotidokra vonatkozik, amelyeknek vírusellenes aktivitása van influenzavírus ellen. A 4806463 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalom, melyet 1989. február 21-én adtak meg, antiszensz oligonukleotidokra és olyan eljárásokra vonatkozik, amelyekben azokat HTLV-III-replikáció gátlására használták. Az 5286717 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalom (Cohen és mtsai), melyet 1994. február 15-én adtak meg, kevert kapcsolódású oligonukleotid-foszforotioát egy onkogénhez való komplementeritására vonatkozik; az 5276019 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalom és az 5264423 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalom (Cohen és mtsai) szerint foszforotioát oligonukleotid analógokat használnak azért, hogy megakadályozzák idegen nukleinsavak replikációját a sejtben. Az antiszensz oligonukleotidok biztonságosan beadhatók embereknek és jelenleg számos antiszensz oligonukleotid gyógyszer klinikai kísérletei folynak, amelyek mind vírusos mind celluláris géntermékeket céloznak meg. A foszforotioát oligonukleotidokról (ISIS-2922) kimutatták, hogy hatékonyak *cytomegalovirus retinitis* ellen AIDS-betegekben ("Bioworld Today", 1994. április 29, 3. old.). Tehát az elmondottak alapján jól látható, hogy az oligonukleotidok hasznos terápiás eszközök lehetnek és hasznos részei lehetnek a kezelé-

si előiratoknak, amelyeket sejtek, állatok, különösen emberek kezelésére alkalmaznak.

Az antiszensz oligonukleotidok gének expressziójára kifejtett gátló hatása hatásos eszköznek bizonyult a raf-gének szerepének megértésében. Egy antiszensz oligonukleotid komplementaritása a humán c-raf-gén első hat kódonjához hasznos volt arra a célra, hogy demonstrálják a T-sejtek mitogén-válaszát az interleukin-2-re (IL-2), amelyhez c-raf is szükséges. Olyan sejteket kezeltek az oligonukleotiddal, amelyek majdnem teljes c-raf-protein hiányt mutattak és az IL-2-re adott proliferatív válasz alapvető hiányát. Riedel és mtsai: Eur. J. Immunol. 23, 3146-3150 (1993). Rapp és mtsai. expressziós vektorokat közöltek, amelyek egy raf-gént tartalmaztak egy antiszensz orientációban a promótertől 3-irányban, és egy eljárást a raf-expressziójának gátlására úgy, hogy kifejeztek egy antiszensz Raf-gént vagy egy mutáns Raf-gént a sejtben (WO93/04170 sz. közzétételi irat). Egy antiszensz oligodezoxiribonukleotidot, amely komplementer volt az egér c-raf 1-6 kódonjához, használtak ahhoz, hogy megszüntessék az inzulin stimulációját a DNS szintézisre a H4IIE-jelű patkányhepatóma-sejtvonalban [Tornkvist és mtsai: J. Biol. Chem., 269, 13919-13921 (1994)]. A WO93/06248 sz. szabadalmi közzétételi irat eljárásokat ismertet egy egyén azonosítására, akiben megnövekedett a rák kifejlődésének kockázata, valamint eljárásokat olyan rákban szenvedő betegek prognózisára és megfelelő kezelésére, akikben a rák kiala-

kulásának oka a c-raf-gén egy szakaszának amplifikációja, és analizálták a gént, hogy van-e mutáció.

Denner és mtsai. antiszensz oligonukleotidokat közölnek, amelyek a raf-génhez hibridizálódnak, és eljárásokat azok használatára (WO94/15645). Emberi és patkány raf-szekvenciákhoz hibridizálódó oligonukleotidokat is közölnek.

Iversen és mtsai. olyan heterotípusos antiszensz, a raf-génnel komplementer oligonukleotidokat közölnek, amelyek képesek megölni a raf-aktivált ráksejteket. Számos oligonukleotid szekvenciát közölnek, amelyek egyike sem antiszensz oligonukleotid szekvencia.

Még mindig megmaradt a régóta érzett igény tökéletesített készítményekre és olyan eljárásokra, amelyek gátolják a raf-gén expresszióját.

A találmány tárgyát olyan oligonukleotidok képezik, amelyek a humán raf-gén nukleinsavaihoz képesek hibridizálódni és képesek meggátolni a raf-gén expresszióját. A találmány tárgyát képezik továbbá olyan kiméra oligonukleotidok, amelyek a humán raf-ot kódoló nukleinsavakhoz képesek hibridizálódni. A találmány szerinti oligonukleotidok meggyőződésünk szerint hasznosak mind diagnosztikai mind terápiás célra, és különösen hasznosak a jelen találmány szerinti eljárásokban.

A találmány olyan eljárásokat is felölel, amelyek meggátolják a humán raf kifejeződését, különösen a raf abnormalis kifejeződését. Ezek az eljárások meggyőződésünk szerint hasznosak mind terápiásan mind diagnosztikailag,

mint raf-expresszió és a hiperproliferáció összefüggésének következménye. Ezek az eljárások hasznosak mint eszközök is, például a raf-expresszió szerepének detektálására és meghatározására különböző sejtfunciókban és fiziológiás folyamatokban és a raf-expresszióval összefüggő állapot diagnosztizálásában.

A találmány felölel továbbá olyan eljárásokat, amelyek gátolják a sejt hiperproliferációját a találmány szerinti oligonukleotidok alkalmazásával. Ezek az eljárások meggyőződésünk szerint hasznosak például a raf-fal összefüggő sejthiperproliferáció diagnosztizálásában. A találmány tárgyát képezik továbbá olyan eljárások is, amelyek az abnormálisan proliferatív állapotot kezelik. Ezek az eljárások a találmány szerinti oligonukleotidokat alkalmazzák. Ezek az eljárások meggyőződésünk szerint hasznosak mind terápiásan mind a klinikai kutatás számára mind diagnosztikai eszközként.

Az 1. ábra görbéje az ISIS-5132 hatását mutatja (1.A ábra) és egy ISIS-10353 kevert ("scrambled") kontroll oligonukleotid hatását (1.B ábra) az A549 tüdőtumorexenograftok növekedésére meztelen egerekben. Az ISIS-5132 csökkentette a tumor méretét minden dózisában (0.006 mg/kg, 0.06 mg/kg, 0.6 mg/kg és 6.0 mg/kg), a dózis függvényében mérve. A kevert raf-oligonukleotidnak, ISIS-10353, nem volt hatása az egyik dózisban sem (1.B ábra).

A malignus tumor lépésről lépésre, progresszív változások sorozataként fejlődik ki, amely a ráksejtekre jellemző növekedési kontroll elvesztéséhez vezet, pl. folyama-

tos szabályozatlan proliferáció, a környező szövetek megtámadásának képessége, és különböző szervek metasztatizálási képessége. Alaposan kontrollált *in vitro* tanulmányok segítettek definiálni azokat a faktorokat, amelyek jellemzik a normál és a neopláziás sejteket, és elvezettek azoknak a specifikus fehérjéknek az azonosításához, amelyek kontrollálják a sejt növekedését és differenciálódását. A raf-gének annak a géncsaládnak a tagjai, amelyek a megfelelő fehérjéket kódolják: A-, B- és C-raf. A raf-gének nagymértékben konzervált szerin-treonin-specifikus protein kinázokat kódolnak. Ezek az enzimek másféleképpen fejeződnek ki; a c-raf, a legalaposabban jellemzett fehérje, minden vizsgált szervben és sejtvonalban kifejeződik. Az A-raf az urogenitális, a B-raf az agyi szövetekben fejeződik ki. A c-raf protein kináz aktivitását és a szubcelluláris eloszlását mitogének szabályozzák foszforilációval. A különböző növekedési faktorokról, beleértve az epidermális növekedési faktort, inzulint, granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktort, interleukin-2-t, interleukin-3-at és az eritropoietint, kimutatták, hogy indukálják a c-raf foszforilációját. Tehát a c-rafról azt gondolják, hogy alapvető szerepet játszik a normális sejtek szignáltranszdukciós folyamataiban, összekapcsolva egy számos növekedési faktort hatását, amely végeredményben sejtproliferációt eredményez.

Bizonyos abnormális proliferatív állapotokról azt gondolják, hogy összefüggésben áll a raf-expresszióval, és így fogékonyak a raf-expresszió gátlására. Az abnormálisan

magas raf-proteinkifejeződés szintén együtt jár a transzformációval és az abnormális sejtproliferációval. Ezekről az abnormális proliferatív állapotokról azt gondolják, hogy fogékonyak a raf-expresszió gátlására. Az abnormális proliferatív állapotokra például szolgálnak a hiperproliferatív rendellenességek, mint a rákos megbetegedések, tumorok, hiperpláziák, pulmonáris fibrózisok, angiogenezisek, pszoriázisok, ateroszklerózisok és a simaizom sejtproliferációk a véredényekben, úgy mint az angiopláziát követő sztenózis vagy resztenózis. A celluláris jeltovábbítási folyamatok, amelynek a raf is része, összefüggésben vannak azokkal a gyulladásos rendellenességekkel, amelyeket a T-sejt proliferációja jellemez (T-sejt aktiváció és növekedés), úgy mint például az átültetett szövet kivetése, endotoxin sokk és a glomeruláris nefritis.

Úgy találtuk, hogy a raf-gén expressziójának eliminálása vagy csökkentése megállíthatja vagy visszafordíthatja az abnormális sejtproliferációt. Ezt akkor is így találtuk, amikor a raf-expresszió abnormális magas volt. Ez egy óriási igény attól a szóban forgó készítménytől, amelyik képes modulálni a raf-gén expresszióját. Nagy az igény olyan eljárásokra, amelyek detektálják a raf-gént a sejtekben, szövetekben és állatokban. Szintén van igény olyan eljárásokra, amelyek diagnosztizálják és kezelik az abnormális proliferatív állapotokkal összefüggő abnormális raf-gén expressziót. Ezenkívül kitek és reagensek szükségesek a raf-gén detektálására és tanulmányozására. "Abnormális"

raf-gén expresszióértjük a továbbiakban azt a jelenséget, amikor a raf-proteinnek abnormálisan magas az expressziós szintje, vagy bármilyen szintű raf-expressziót egy abnormálisan proliferatív állapotban.

A találmány olyan oligonukleotidokat alkalmaz, amelyek a raf-gént kódoló nukleinsavakhoz képesek hibridizálódni. Ezt a hasonlóságot az oligonukleotid és a megcélzott komplementer nukleinsav között, amelyhez hibridizál, általánosan úgy hívják, hogy "antiszensz". Egy oligonukleotid "hibridizálódó képessége" a kiválasztott nukleinsav-célpont felé, a találmány szerinti szövegösszefüggésben egy többlépéses folyamat. A folyamat rendszerint annak a nukleinsavszekvenciának az azonosításával kezdődik, amelynek a funkciója modulálva lesz. Ez a nukleinsav lehet például egy celluláris gén (vagy a génből készült mRNS), amelynek az expressziója összefüggésben van a kérdéses beteg állapottal, vagy egy fertőző ágensből származó idegen nukleinsav. A találmányban a megcélzott nukleinsav a raf-ot kódoló nukleinsav; más szavakkal kifejezve a raf-gén vagy a raf-génből kifejezett mRNS. A hibridizálódási folyamat magában foglalja a nukleinsavszekvencia valamilyen csoportjának vagy csoportjainak meghatározását az oligonukleotid-kölcsönhatás számára, amelynek létrejötte eredményezi a kívánt hatást, a génextpresszió modulálását. Ha egyszer a célcsoportot vagy -csoportokat azonosítottuk, a kiválasztott oligonukleotidok, amelyek megfelelően komplementerek a célnukleinsavval stb., megfelelően jól hibri-

dizálódnak, megfelelő specifitással, megadva a kívánt modulációt.

A találmány szerinti szövegösszefüggésben a "moduláció" jelenthet inhibíciót vagy stimulációt. Jelenleg a moduláció előnyös formája a raf-gén expressziójának inhibíciója. Ez a moduláció mérhető a tudományban ismert rutin-eljárásokkal, például a mRNS expresszió Northern-blotolásával vagy a protein expresszió Western-blotolásával, ahogyan a jelen bejelentés példái tanítják. A sejtproliferációra vagy a tumornövekedésre kifejtett hatások szintén mérhetőek, ahogyan a jelen bejelentés példái tanítják. A "hibridizáció" a jelen találmány szerinti szövegösszefüggésben hidrogénhid kötések kialakulását jelenti, amelyet Watson-Crick-féle bázispároknak is ismerünk, és amelyek a komplementer bázisok között létesülnek, rendszerint a szemben lévő nukleinsav láncok között vagy egy nukleinsav lánc két része között. A guanin és a citozin példa a komplementer bázisokra, amelyekről ismert, hogy három hidrogénhid kötést létesítenek egymás között. Az adenin és a timin is példa a komplementer bázisokra, amelyek két hidrogénhid kötést létesítenek egymás között. A "specifikusan hibridizálódó" és a "komplementer" kifejezés a komplementaritásnak azt az elegendő szintjét jeleneti, amelyben a DNS és a cél-RNS között stabil és specifikus kötés létesül. Érthető, hogy egy oligonukleotidnak nem kell 100%-ban komplementernek lennie a célnukleinsav-szekvenciával, amelyhez specifikusan hibridizál. Egy oligonukleotid specifikus hibridizálódásra képes, ha az oligonukleotid kötődése a célhoz

megzavarja a célmolekula normális működését úgy, hogy az a használhatóságát elveszti, és megvan a komplementaritásnak egy olyan elegendő foka, ami kizárja az oligonukleotid nem-specifikus kötődését a céltől különböző szekvenciákhoz olyan a körülmények között, amelynél a specifikus kötésnek kell létrejönnie, pl. fiziológias körülmények között az *in vivo* vizsgálati eljárásokban vagy a terápiás kezeléseknél, vagy az *in vitro* vizsgálati eljárások esetében olyan körülmények, amelyek között azt végezték.

A találmány előnyös megvalósítási módjaiban olyan oligonukleotidokat használunk, amelyek c-raf-ot és A-raf-ot kódoló mRNS-hez képesek hibridizálódni. A találmánynak megfelelően a tudományban átlagosan jártas személyek megérthetik, hogy a mRNS nemcsak azt a kódoló szakaszt tartalmazza, amely egy fehérje kódolásához szükséges információt hordozza a hárombetűs genetikai kód segítségével, hanem az 5'-végi nem-transzlálódó szakaszt, a 3'-végi nem-transzlálódó szakaszt, az 5'-végi "cap"-szakaszt, intronszakaszokat, és intron/exon vagy "splicing" kapcsolódással keletkezett ribonukleotidokat. Tehát az oligonukleotidokat a találmánynak megfelelően úgy lehet leírni, hogy egészen vagy részben ezekhez a nem-kódoló ribonukleotid-szakaszokhoz képesek hibridizálódni, valamint a kódoló nukleotidokhoz szakaszhoz képesek hibridizálódni. Az előnyös megvalósítási módokban az oligonukleotid a transzlációs iniciációs helyhez (AUG-kód) vagy a humán c-raf-mRNS 5' - vagy 3' -végi nem-transzlálódó szakaszához hibridizálódik. A messenger RNS funkciói kapcsolatban állnak

minden alapvető életfolyamattal, úgymint az RNS transzlokációja a fehérjetranszláció helyéhez, aktuálisan a fehérjetranszláció az RNS-ből, az RNS splicing folyamata és érése, sőt független katalitikus aktivitása is lehet. Az ilyen beavatkozások együttes hatása az RNS funkciójába eredményezi a raf-protein expressziójának módosítását.

A találmány szerinti oligonukleotidok modulálják a raf-gén expresszióját. Ezek az oligonukleotidok a raf-ot kódoló nukleinsavakhoz képesek hibridizálódni. A c-raf és az A-raf modulációjára alkalmas oligonukleotidok és eljárások a találmány előnyös megvalósítási módjai; mégis a raf-expressziójának más módokon való modulálására alkalmas készítményeket és eljárásokat szintén hasznosnak találjuk és ezek is tárgyai a jelen találmánynak. Ahogyan már korábban definiáltuk, a "moduláció" vagy inhibíciót vagy stimulációt jelent. Az raf-gén expressziójának inhibíciója a találmány szerinti előnyös megvalósítási módja a modulációnak.

A találmány szövegösszefüggésében az "oligonukleotid" kifejezés nukleotidok vagy nukleozidok oligomerjeit vagy polimerjeit jelenti, amelyek természetesen előforduló bázisokat, cukrokat és cukrok közötti kötések (váz) tartalmaz. Az "oligonukleotid" kifejezésen érthetünk olyan oligomereket is, amelyek természetesen nem előforduló monomereket tartalmaznak, vagy ilyen részei vannak, és a funkciójuk hasonló. Ilyen módosított vagy szubsztituált oligonukleotidok gyakran kedvezőbbek a natív formáknál az olyan tulajdonságaik miatt, mint például a

sejtbe való fokozottabb bejutásuk vagy nukleázokkal szembe-
ni megnövekedett stabilitásuk.

A találmány bizonyos oligonukleotidokat preferál, a kiméra oligonukleotidokat. A "kiméra oligonukleotidok" vagy "kimérák" a találmány szerinti szövegösszefüggésben olyan oligonukleotidok, amelyek két vagy több kémiaailag jól elkülöníthető szakaszt tartalmaznak, és mindegyik szakasz legalább egy nukleotidból épül fel. Ezekre az oligonukleotidokra jellemző, hogy legalább egy szakasz módosított nukleotidot tartalmaznak, amely egy vagy több hasznos tulajdonsággal ruházza fel (mint például megnövekedett nukleázrezisztencia, a sejtbe való fokozottabb bejutás, megnövekedett kötési affinitás az RNS célhoz) és tartalmaznak egy másik szakaszt, amely szubsztrátja az RNáz-H hasításnak. Az egyik előnyös megvalósítási módon egy kiméra oligonukleotid tartalmaz legalább egy módosított részt, amelynek megnövekedett célpontkötő affinitása van, és rendszerint egy másik részt, amelyik az RNáz-H szubsztrátjaként viselkedik. Egy oligonukleotid affinitását a célja felé (ebben az esetben a raf-ot kódoló nukleinsav felé) rutin-szerűen úgy határozzuk meg, megmérjük egy oligonukleotid/célpont pár T_m -jét, amely az a hőmérséklet, amelynél az oligonukleotid és a célpont disszociál; a disszociációt spektrofotometriásan detektáltuk. Minél magasabb a T_m , annál nagyobb az oligonukleotid affinitása a célhoz. Egy még előnyösebb megvalósítási módon, az oligonukleotidnak az a szakasza, amelyik úgy van módosítva, hogy a raf-mRNS kötési affinitása megnövekedjen, legalább

egy módosított nukleotidot tartalmaz a cukor 2' - pozíciójában, leginkább 2' -O-alkil vagy 2' -fluoro-módosított nukleotidot. Ezt a módosítást rutinszerűen építettük be az oligonukleotidba és ezek az oligonukleotidok magasabb T_m -et mutattak (azaz nagyobb célkötési affinitást), mint a 2' -dezioligonukleotidok az adott célponthoz. Ezen megnövekedett affinitás hatása jelentősen megnöveli az antiszensz oligonukleotid gátló hatását a raf-gén expressziójára. Az RNáz-H egy celluláris endonukleáz, amely az RNS:DNS duplex RNS láncát hasítja; ennek az enzimnek az aktiválása tehát az RNS célpont lehasadását eredményezi, és így képes jelentősen megnövelni az antiszensz inhibíció hatásosságát. Az RNS célpont lehasadása rutinszerűen demonstrálható gélelektroforézissel. Egy másik előnyös megvalósítási módon, a kiméra oligonukleotid a megnövekedett nukleáz rezisztencia irányában volt módosítva. A sejt különböző exo- és endonukleázokat tartalmaz, amelyek képesek degradálni a nukleinsavakat. Számos nukleotid és nukleozid módosításról mutatták be, hogy az oligonukleotidokat rezisztensebbeké teszi a nukleáz emésztéssel szemben, mint a natív oligonukleotidok. A nukleáz rezisztencia rutinszerűen mérhető úgy, hogy az oligonukleotidot inkubáljuk sejtextraktummal vagy izolált nukleáz oldattal és megmérjük a megmaradt intakt oligonukleotid mennyiségét, rendszerint gélelektroforézissel. Azok az oligonukleotidok, amelyeket módosítottak a megnövelt nukleáz rezisztencia érdekében, hosszabb ideig képesek intaktak maradni, mint a módosítatlan oligonukleotidok. Sokféle oligonukleotid módosítás lé-

tezik, amely megnöveli vagy létrehozza a nukleáz rezisztenciát. A találmány szerint jelenleg a legkedvezőbbek azok az oligonukleotidok, amelyek legalább egy foszforotioát csoportot tartalmaznak. Néhány esetben az az oligonukleotid módosítás, amelyik megnöveli a célpontkötő affinitást, függetlenül képes megnövelni a nukleáz rezisztenciát is.

A találmány szerinti előnyös oligonukleotidok tartalmazhatnak foszforotioátokat, foszfotriésztereket, metilfoszfonátokat, rövid láncú alkil- vagy ciklo-alkil-kötéseket a cukrok között, vagy rövid láncú heteroatomos vagy heterociklusos kötéseket ("váz") a cukrok között. A legpreferáltabbak a foszforotioátok, és azok is $\text{CH}_2\text{-NH-O-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-O-CH}_2$ [metilén(metilimino)- vagy MMI-vázként ismert], $\text{CH}_2\text{-O-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-}$, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-}$ és $\text{O-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-vázak}$ (ahol a foszfodiészter O-P-O-CH_3). Szintén előnyösek a morfolino-vázat tartalmazó oligonukleotidok (Summerton, J.E. és Weller, D.D., amerikai egyesült államokbeli szabadalom száma: 5034506). Más előnyös megvalósítási mód esetén, mint a protein-nukleinsav vagy a peptid-nukleinsav (PNA) váz, ahol az oligonukleotid foszfodiészter-váza helyettesítve lehet poliamid vázzal, a bázisok közvetlenül vagy közvetve a poliamid váz aza-nitrogénatomjaihoz kapcsolódnak [P.E. Nielsen, M. Egholm, R.H. Berg, O. Buchardt, Science 254, 1497 (1991)]. Más előnyös oligonukleotidok tartalmazhatnak alkil- és halogén-szubsztituált cukorcsoportokat, melyek a 2'-pozícióban az alábbi szubsztituensek valamelyikét tartalmazzák: OH- , SH- , $\text{SCH}_3\text{-}$, F- , OCN- , $\text{OCH}_3\text{OCH}_3\text{-}$, $\text{OCH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3\text{-}$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2\text{-}$ vagy

O(CH₂)_nCH₃-csoport, ahol az n 1-től 10-ig terjedő szám lehet; kis szénatomszámú (C₁-C₁₀) alkil-, szubsztituált kis szénatomszámú alkil-, alkil-aril- vagy aril-alkil-csoport; Cl-atom; Br-atom; CN-csoport; CF₃-csoport; OCF₃-csoport; O-, S- vagy N-alkil-csoport; O-, S- vagy N-alkenil-csoport; SOCH₃-csoport; SO₂CH₃-csoport; ONO₂-csoport; NO₂-csoport; N₃-csoport; NH₂-csoport, heterociklo-alkil-csoport; heterociklo-alkaril-csoport; amino-alkil-amino-csoport; polialkil-amino-csoport; szubsztituált szilil-csoport; RNS-t hasító csoport; koleszteril-csoport; konjugátum; riporter molekula; interkalátor; olyan csoport, amely javítja az oligonukleotid farmakokinetikai tulajdonságait; vagy olyan csoport, amely javítja az oligonukleotid farmakodinamikai tulajdonságait és más hasonló tulajdonsággal rendelkező szubsztituensek. Az oligonukleotidoknak lehet cukor-mimetikum csoportja, mint például ciklo-butyl-csoport a pento-furanozil-csoport helyett. Más előnyös megvalósítási módok tartalmazhatnak legalább egy módosított bázist vagy "univerzális bázist", úgy mint az inozin.

A találmány szerint előnyös oligonukleotidok körülbelül 8-tól 50 nukleotid hosszúságúak. A találmány szerinti szövegösszefüggésben ez felöleli azokat az előbbieken ismertetett természetesen nem előforduló oligonukleotidokat, amelyek 8 - 50 monomert tartalmaznak.

A találmány szerint használatos oligonukleotidokat kényelmesen és rutinszerűen a szilárd fázisú szintézis jól ismert technikájával állítottuk elő. Az ilyen szintézishez szükséges berendezéseket számos cég árul, többek között az

Applied Biosystems. Bármilyen más eszköz is igénybe vehető ezekhez a szintézisekhez; az oligonukleotidok tényleges szintézisét jól ismerik a ezen a területen rutinszerűen dolgozó szakemberek. Jól ismertek hasonló technikák más oligonukleotidok előállítására is, például foszforotioátok és alkilált nukleotidszármazékok előállítására. A kereskedelmi forgalomban beszerezhető a módosított amidok és az ellenőrzött pórusméretű üveg (*controlled-pore glass, CPG*) termékek, például a biotin-, fluoreszcein-, akridin- vagy pszoralén-módosított amiditok és/vagy CPG-termékek (beszerezhető: Glen Research, Sterling VA) alkalmazási eljárásai is jól ismertek fluoreszcensen jelölt, biotinilált vagy más módon módosított oligonukleotidok előállítására, például koleszterin-módosított oligonukleotidok előállítására.

Azt találtuk, hogy bizonyos oligonukleotidok, amelyek a c-raf-mRNS részeihez képesek hibridizálódni, különösen hasznosak a raf-expresszió gátlására és a sejtek hiperproliferációjába való beavatkozásra. Azok az eljárások, amelyek antiszensz oligonukleotidokkal gátolják a c-raf-expressziót, alkalmasak a sejt hiperproliferációjának megakadályozására is. A találmány szerinti eljárásokban a szövetek vagy sejtek érintkezésbe kerülnek az oligonukleotidokkal. A találmány szerinti szövegösszefüggésben, ha egy oligonukleotid vagy oligonukleotidok "érintkeznek" a szövetekkel és a sejtekkel, azt jelenti, hogy az oligonukleotido(ka)t, rendszerint egy folyékony hordozóban, a sejtszuspenzióhoz vagy szövetmintához adjuk,

vagy *in vitro*, vagy *ex vivo*, vagy az oligonukleotido(ka)t beadjuk egy állat sejtjeihez vagy szöveteihez.

Terápiás célra, a sejtek hiperproliferációjának gátlására és az abnormális proliferatív állapot kezelésére alkalmas eljárásokat ismertetünk. A terápiás készítmény készírelése és az azt követő beadás a tudomány által ismert módokon történik. Általában terápiás célból, az olyan páciensnek, akiről azt gyanítjuk, hogy szüksége van ilyen kezelésre, a találmány szerint adunk oligonukleotidot, általában gyógyászatilag elfogadható hordozóval, az adagolás mennyisége és ideje változhat az adott betegség természetének és súlyosságának megfelelően, és a páciens általános állapotának megfelelően. A találmány szerinti gyógyászati készítmények számos módon beadhatók, attól függően, hogy helyi vagy szisztematikus kezelés szükséges, és a kezelendő területtől függően. A beadás lehet helyi (ophtalmikus, vaginális, rektális, intranazális), orális vagy parenterális, például intravénás csepp, intravénás injekció vagy szubkután, intraperitoneális vagy intramuszkuláris injekció.

A helyi bejuttatás készírelései lehetnek kenőcsök, borogató vizek, krémek, gélek, cseppek, kúpok, sprék, folyadékok és púderek. A szokásos gyógyszerészeti hordozók szükségesek és kívántak, vizes, por vagy olajszerű hordozók, töltőanyagok és ehhez hasonlóak. Bevont kondomok, kesztyűk és ehhez hasonlóak is hasznosak.

Az orális beadásra használt készítmények lehetnek porok vagy granulátumok, vizes szuszpenziók és oldatok vagy

nem-vizes közegek, kapszulák, zacskók vagy tabletták. Töltőanyagok, ízanyagok, hígítók, emulgeátorok, diszperziós segédanyagok és kötőanyagok lehetnek kívánatosak.

A parenterális beadás készítményei lehetnek steril vizes oldatok, amelyek puffereket, hígítókat és más alkalmas adalékanyagot is tartalmazhatnak.

Ezekben a gyógyszerészeti hordozóanyagokon kívül kationos lipideket is tartalmazhat a készítmény azért, hogy elősegítsék az oligonukleotid felvételét. Egy ilyen vegyület, amelyik segíti a felvételt, a lipofektin (BRL, Bethesda MD).

A dózis függ a kezelt állapot súlyosságától és érzékenységtől, a kezelési kúra tarthat néhány naptól néhány hónapig, ameddig a kúra hatásos lesz vagy a beteges állapot csökkenését elérte. A dózis optimális beosztása kiszámolható úgy, hogy megmérjük a gyógyszer felhalmozódását a szervezetben. Átlagos képességű emberek könnyedén meg tudják határozni az optimális dózist, az adagolási módszert és az ismétlési rátát. Az optimális dózis különbözhet az egyes oligonukleotidok relatív hatékonysága szerint és az 50%-ban hatásos koncentráció általában kiszámolható az *in vitro* és az *in vivo* állatkísérletek alapján. Például, ha adott a vegyület relatív molekulatömege (az oligonukleotid szekvenciából és a kémiai szerkezetből számítható) és az effektív dózis, mint például az 50%-os gátlási koncentráció (kísérletileg határozható meg), akkor a dózis mg/kg-ban rutinszerűen kiszámítható.

A találmány szerinti eljárások alkalmas még szövetek vagy más minták abnormális proliferatív állapotának diagnosztizálására is olyan páciensek esetében, akiknél fennáll a gyanú hiperproliferatív betegségekre, úgy mint rák, pszoriázis, véredény resztenózis vagy atheroszklerózis. Az oligonukleotidok találmány szerinti azt a képességét használhatjuk ezen állapotok diagnosztizálására, hogy képesek meggátolni a sejtproliferációt. Számos vizsgálati eljárást írtak le a jelen találmány felhasználásával, amelyek általánosan tartalmazzák azt, hogy egy szövetminta érintkezésbe kerül a találmány szerinti oligonukleotiddal, ahol a megválasztott körülmények lehetővé teszik az inhibíció detektálását és rendszerint kvantitatív mérését is. Ehhez hasonlóan a találmány felhasználható arra a célra is, hogy megkülönböztessük a raf-fal kapcsolatban álló tumorokat az egyéb okokra visszavezethető tumoroktól, a hatásos kezelési előírat megtervezése érdekében.

A találmány szerinti oligonukleotidok kutatási célra is használhatók. Így az oligonukleotidok specifikus hibridizációja felhasználható vizsgálati eljárásokban, tisztításokban, a sejt termékeinek preparálásánál és más eljárásokban, amelyeket a tudományban általánosan jártas szakemberek nagyra becsülnek.

A találmány szerinti oligonukleotidok a raf-expresszió detektálásában és diagnózisában is használhatók. Például radioaktívan ^{32}P -vel jelzett oligonukleotidok készíthetők az 5'-végen polinukleotid kinázzal. Sambroock és mtsai: "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", Cold

Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 2, 10.59. old. A radioaktívan jelölt oligonukleotidokat azután inkubáljuk azokkal a szövet vagy sejtmintákkal, amelyekben gyanítjuk a raf-expressziót, és a mintát mossuk a nem kötődött oligonukleotidok eltávolítása érdekében. A mintában maradt radioaktivitás a kötődött oligonukleotidokat jelzi (amely pedig a raf jelenlétét jelzi) és megmérhető szcintillációs számlálóval vagy más rutin mérési eszközzel. A radioaktívan jelzett oligót szövetek autoradiografiájához is használhatjuk, hogy meghatározzuk a raf-expresszió lokalizációját, eloszlását és mennyiségét kutatási, diagnosztikai vagy terápiás célból. Ezekben a kutatásokban a szövet részeit radioaktívan jelzett oligonukleotiddal kezeljük és mossuk a fentiek szerint, azután fényérzékeny emulziót exponálunk vele, az autoradiográfia rutineljárásai szerint. Az előhívás után az emulzióból ezüstszemcsék fognak kiválni a rafot expresszáló régióknál. Az ezüstszemcsék mennyiségi meghatározása lehetővé teszi a raf-expresszió mértékének meghatározását.

Analóg vizsgálati eljárások fejleszthetők ki a raf-expresszió fluoreszcens detektálására a találmány szerinti oligonukleotidok felhasználásával, amelyekhez fluoreszcein vagy más fluoreszcens csoport van konjugálva a radioaktív jelölés helyett. Az ilyen konjugátumok rutinszerűen elkészíthetők szilárd fázisú szintézissel fluoreszcensen jelölt amiditok vagy CPG felhasználásával (pl. fluoreszcein-jelölt amiditok és CPG beszerezhetők a Glen Research cégtől

(Sterling VA, lásd "1993 Catalog of Products for DNA Research", Glen Research, Sterling VA, 21. old.).

Ezen vizsgálati eljárások bármelyik formáját ismeri a tudomány. Képzett szakemberek könnyedén alkalmazzák ezeket az ismert eljárásokat a raf-expresszió detektálására a találmány kitanítása szerint, új és hasznos eszközöket adva a raf-expresszió detektálására.

A c-raf-expresszió inhíbeálása oligonukleotiddal

Az 1. táblázatban bemutatott oligonukleotidok a Genbank "HUMRAFR" c-raf-szekvenciájának (Genbank jegyzék x03484) felhasználásával terveztük és szintetizáltuk, a c-raf-mRNS expresszió inhíbeálásának tesztelését T24 hólyagsejt karcinóma sejteken végeztük Northern-blot segítségével. Az összes oligonukleotidnak foszforotioát váza van.

1. táblázat

Humán c-raf-kináz antiszensz oligonukleotidok

| ISIS-# | szekvencia (5'→3') | célpont | szekv.az.sz. |
|--------|----------------------|---------|--------------|
| 5000 | TGAAGGTGAGCTGGAGCCAT | Coding | 1 |
| 5074 | GCTCCATTGATGCAGCTTAA | AUG | 2 |
| 5075 | CCCTGTATGTGCTCCATTGA | AUG | 3 |
| 5076 | GGTGCAAAGTCAACTAGAAG | STOP | 4 |
| 5097 | ATTCTTAAACCTGAGGGAGC | 5' UTR | 5 |
| 5098 | GATGCAGCTTAAACAATTCT | 5' UTR | 6 |
| 5131 | CAGCACTGCAAATGGCTTCC | 3' UTR | 7 |
| 5132 | TCCCGCCTGTGACATGCATT | 3' UTR | 8 |
| 5133 | GCCGAGTGCCTTGCCTGGAA | 3' UTR | 9 |
| 5148 | AGAGATGCAGCTGGAGCCAT | Coding | 10 |
| 5149 | AGGTGAAGGCCTGGAGCCAT | Coding | 11 |
| 6721 | GTCTGGCGCTGCACCACTCT | 3' UTR | 12 |
| 6722 | CTGATTTCCAAAATCCCATG | 3' UTR | 13 |
| 6731 | CTGGGCTGTTTGGTGCCTTA | 3' UTR | 14 |
| 6723 | TCAGGGCTGGACTGCCTGCT | 3' UTR | 15 |
| 7825 | GGTGAGGGAGCGGGAGGCGG | 5' UTR | 16 |
| 7826 | CGCTCCTCCTCCCCGCGCG | 5' UTR | 17 |
| 7827 | TTCGGCGGCAGCTTCTCGCC | 5' UTR | 18 |
| 7828 | GCCGCCCAACGTCCTGTCTG | 5' UTR | 19 |
| 7848 | TCCTCCTCCCCGCGGCGGGT | 5' UTR | 20 |
| 7849 | CTCGCCGCTCCTCCTCCCC | 5' UTR | 21 |
| 7847 | CTGGCTTCTCCTCCTCCCCT | 3' UTR | 22 |
| 8034 | CGGGAGGCGGTACATTCTGG | 5' UTR | 23 |
| 8094 | TCTGGCGCTGCACCACTCTC | 3' UTR | 24 |

Az első tesztelés során az oligonukleotidokat 100 nM vagy 200 nM koncentrációban használva, az 5074, 5075, 5132, 8034, 7826, 7827 és a 7828 sz. oligonukleotidok legalább 50%-ban gátolták a c-raf-mRNS-t és ezek az oligonukleotidok váltak az előnyös megvalósítási mód eszkö-zévé. Az 5132 és a 7826. sz. oligonukleotidok (szekvencia azonosítási szám: 8 és 17) 90%-nál nagyobb inhibíciót mu-tattak és ezek még előnyösebbek lettek. A további tesztelé-sek során a 6721, 7848 és a 8094 sz. oligonukleotidok a c-raf-mRNS szintjét 50%-nál nagyobb mértékben csökkentették.

Ezek az oligonukleotidok szintén az előnyös megvalósítási mód részei lettek. Ezek közül a 7847 sz. oligonukleotid (szekvencia azonosítási száma: 22) nagyobb, mint 90% inhibíciót mutatott és még előnyösebb lett.

Az ISIS-5132 specifikitása a raf-ra

Az ISIS-5132 specifikitását a raf-mRNS-re Northern-blot módszerrel mutattuk be, amelyben az oligonukleotid inhibíciós képességét teszteltük Ha-ras-mRNS-re és c-raf-mRNS-re T24-sejtekben. A Ha-ras egy celluláris onkogén, amely szerepet játszik a transzformációban és a tumor kialakulásában. Az ISIS-5132-ről kimutattuk, hogy a c-raf-mRNS-t szinte teljesen eltüntette, a Ha-ras mRNS szintjére nem volt hatással.

2'-módosított oligonukleotidok

A fenti oligonukleotidok közül bizonyosakat vagy foszfodiészter (P=O) vagy foszforotioát (P=S) vázzal szintetizáltunk, és egységesen voltak szubsztituálva a cukor 2'-pozíciójában vagy 2'-O-metil-, 2'-O-propil- vagy 2'-fluoro-csoporttal. Az oligonukleotidokat a 2. táblázatban mutatjuk be.



2. táblázat

A cukorrész 2'-pozíciójában egységesen módosított c-raf-
oligonukleotidok

ISIS-# szekvencia (5'→3') hely módosítás szekv.az.sz.

| | | | | |
|------|----------------------|-------|---------|----|
| 6712 | TCCCGCCTGTGACATGCATT | 3'UTR | OMe/P=S | 8 |
| 8033 | CGGGAGGCGGTACATTCGG | 5'UTR | OMe/P=S | 23 |
| 7829 | GGTGAGGGAGCGGGAGGCGG | 5'UTR | OMe/P=S | 16 |
| 7830 | CGCTCCTCCTCCCCGCGGCG | 5'UTR | OMe/P=S | 17 |
| 7831 | TTCGGCGGCAGCTTCTCGCC | 5'UTR | OMe/P=S | 18 |
| 7832 | GCCGCCCAACGTCTGTCTCG | 5'UTR | OMe/P=S | 19 |
| 7833 | ATTCTTAAACCTGAGGGAGC | 5'UTR | OMe/P=S | 5 |
| 7834 | GATGCAGCTTAAACAATTCT | 5'UTR | OMe/P=S | 6 |
| 7835 | GCTCCATTGATGCAGCTTAA | AUG | OMe/P=S | 2 |
| 7836 | CCCTGTATGTGCTCCATTGA | AUG | OMe/P=S | 3 |
| 8035 | CGGGAGGCGGTACATTCGG | 5'UTR | OPr/P=0 | 23 |
| 7837 | GGTGAGGGAGCGGGAGGCGG | 5'UTR | OPr/P=0 | 16 |
| 7838 | CGCTCCTCCTCCCCGCGGCG | 5'UTR | OPr/P=0 | 17 |
| 7839 | TTCGGCGGCAGCTTCTCGCC | 5'UTR | OPr/P=0 | 18 |
| 7840 | GCCGCCCAACGTCTGTCTCG | 5'UTR | OPr/P=0 | 19 |
| 7841 | ATTCTTAAACCTGAGGGAGC | 5'UTR | OPr/P=0 | 5 |
| 7842 | GATGCAGCTTAAACAATTCT | 5'UTR | OPr/P=0 | 6 |
| 7843 | GCTCCATTGATGCAGCTTAA | AUG | OPr/P=0 | 2 |
| 7844 | CCCTGTATGTGCTCCATTGA | AUG | OPr/P=0 | 3 |
| 9355 | CGGGAGGCGGTACATTCGG | 5'UTR | 2'F/P=S | 23 |

A 2. táblázatban található oligonukleotidokat, amelyek egységesen 2'-O-metil módosítással és foszforotioát vázzal rendelkeznek, c-raf-protein expressziójának inhibíciós gátlására teszteltük T24-sejtekben, és Western-blot módszerrel határoztuk azokat meg. A 8033, 7834 és a 7835 sz. oligonukleotid mutatta a legjobb inhibíciót és ezeket részesítettük előnyben. Ezek közül a 8033 és a 7834. számúak voltak a legelőnyösebbek.

Kiméra oligonukleotidok

Kiméra oligonukleotidokat preparáltunk, amelyek szekvencia azonosítási száma 8 volt. Ezeknek az oligonukleotidoknak egy 6, 8 vagy 10 dezoxiribonukleotidból álló központi "gap" régiója volt, amelyet oldalról 2' -O-metil módosított nukleotidok két régiója vett körül. A vázuk egységesen foszforotioát volt. Northern-blot analízisben mindhárom oligonukleotid (ISIS-6720, 6-dezoxi-"gap", ISIS-6717 8-dezoxi-"gap", ISIS-6729, 10-dezoxi-"gap") 70%-nál nagyobb gátlást mutatott a c-raf-mRNS expressziójára a T24-sejtekben. Ezek az oligonukleotidok voltak a preferáltak. A 8-deoxi-"gap" minta (6717) nagyobb, mint 90% inhibíciót mutatott és még előnyösebb volt.

További kiméra oligonukleotidokat szintetizáltunk, amelyeknek egy vagy több 2' -O-metil-módosított régiója volt és egységes foszforotioát vázuk. Ezeket a 3. táblázatban mutatjuk be. Mindegyikük foszforotioát; a vastagbetűs részek jelzik a 2' -O-metil-módosított régiókat.

3. táblázat

Kiméra 2' -O-metil P=S c-raf-oligonukleotidok

| ISIS-# | szekvencia | célpont | szekv.az.sz. |
|--------|-----------------------------|---------|--------------|
| 7848 | TCCTCCTCCCCGCGGCGGGT | 5' UTR | 20 |
| 7852 | TCCTCCTCCCCGCGGCGGGT | 5' UTR | 20 |
| 7849 | CTCGCCCGCTCCTCCTCCCC | 5' UTR | 21 |
| 7851 | CTCGCCCGCTCCTCCTCCCC | 5' UTR | 21 |
| 7856 | TTCTCGCCCGCTCCTCCTCC | 5' UTR | 25 |
| 7855 | TTCTCGCCCGCTCCTCCTCC | 5' UTR | 25 |
| 7854 | TTCTCCTCCTCCCCTGGCAG | 3' UTR | 26 |
| 7847 | CTGGCTTCTCCTCCTCCCCT | 3' UTR | 22 |
| 7850 | CTGGCTTCTCCTCCTCCCCT | 3' UTR | 22 |
| 7853 | CCTGCTGGCTTCTCCTCCTC | 3' UTR | 27 |

Amikor a c-raf-mRNS-t inhibeáló képességüket teszteltük Northern-blot analízis segítségével, az ISIS-7848, 7849, 7851, 7856, 7855, 7854, 7847 és 7853 nagyobb, mint 70% inhibíciót adott és így preferáltak lettek. Ezek közül a -7851, -7855, -7847 és -7853 nagyobb, mint 90% inhibíciót mutattak és még előnyösebbek lettek.

További 2'-módosított kiméra oligonukleotidokat preparáltunk és teszteltünk. Ezeket a 4. táblázatban mutatjuk be. Mindegyikük foszforotioát; a vastagbetűs részek jelzik a 2'-O-metil módosított régiókat.

4. táblázat

Kiméra-2'-módosított P=S-c-raf-oligonukleotidok

| ISIS-# | szekvencia | célpont | módosítás | szekv. az.sz. |
|--------|-----------------------------|---------|-----------|---------------|
| 6720 | TCCCGCCTGTGACATGCATT | 3'UTR | 2'-O-Me | 8 |
| 6717 | TCCCGCCTGTGACATGCATT | 3'UTR | 2'-O-Me | 8 |
| 6729 | TCCCGCCTGTGACATGCATT | 3'UTR | 2'-O-Me | 8 |
| 8097 | TCTGGCGCTGCACCACTCTC | 3'UTR | 2'-O-Me | 8 |
| 9270 | TCCCGCCTGTGACATGCATT | 3'UTR | 2'-O-Pro | 24 |
| 9058 | TCCCGCCTGTGACATGCATT | 3'UTR | 2'-F | 8 |
| 9057 | TCTGGCGCTGCACCACTCTC | 3'UTR | 2'-F | 24 |

Ezek közül a 6720, 6717, 6729, 9270 és a 9058 sz. oligonukleotidok voltak előnyösek. A 6717, 6729, 9270 és a 9058 számúak még előnyösebbek voltak.

Két kiméra oligonukleotidot szintetizáltunk, amelyeknek 2'-O-propil cukor módosításuk és kiméra P=O/P=S vázuk volt. Ezeket az 5. táblázatban mutatjuk be, ahol a dőlt



betűs részek jelzik azokat a régiókat, amelyek mind 2' -
módosításuk mind foszfodiészter vázuk van.

5. táblázat

Kiméra 2' -módosított P=S/P=O c-raf-oligonukleotidok

| ISIS-# | szekvencia | célpont | módosítás | szekv. az.sz. |
|--------|----------------------|---------|-----------|------------------|
| 9271 | TCCCGCCTGTGACATGCATT | 3'UTR | 2'-O-Pro | 8 |
| 8096 | TCTGGCGCTGCACCACTCTC | 3'UTR | 2'-O-Pro | 24 |

Ráksejt-proliferációjó gátlása

Az ISIS-5132 foszforotioát-oligonukleotidról kimu-
tattuk, hogy gátolja a T24 rákos hólyagsejt
proliferációját. A sejteket különböző koncentrációju
oligonukleotiddal kezeltük lipofektinnel együtt (ez egy ka-
tionos lipid, amely megnöveli az oligonukleotid felvétel-
ét). A sejtproliferáció dózis-függő gátlását demonstráltuk,
ahogyan a 6. táblázatban látható, ahol a "semmi" jelzi a
kezeletlen kontrollt (oligonukleotid nélkül) és a
"kontroll" jelzi a negatív kontroll oligonukleotiddal való
kezelést. Az eredmények százalékos inhibícióban vannak meg-
adva a kezeletlen kontrollhoz hasonlítva.

6. táblázat

A T24-sejt proliferációjának inhibíciója ISIS-5132-vel

| | oligo-konc. | semmi | kontroll | 5132 |
|----|-------------|-------|----------|------|
| | 50 nM | 0 | +9% | 23% |
| 30 | 100 nM | 0 | +4% | 24% |
| | 250 nM | 0 | 10% | 74% |
| | 500 nM | 0 | 18% | 82% |

Az ISIS-5132 hatása a T24 humán hólyag karcinóma tumorra

Szubkután humán T24-hólyagkarcinóma-xenograftokat hoztunk létre meztelen egerekben, ISIS-5132-vel és egy más jellegű kontroll foszforotioáttal kezeltünk intraperitoneálisan beadva hetente háromszor 25 mg/kg dózisban. Ebben az előzetes kísérletben az ISIS-5132 35%-kal gátolta a tumor növekedését tizenegy nap múlva a kontrollhoz képest. Az oligonukleotiddal kezelt tumorok kisebbek maradtak, mint a kontroll tumorok a kísérlet folyamán.

Az ISIS-5132 hatása MDA-MB-231 humán mell-karcinóma tumorokra

Szubkután humán MDA-MB-231 mell-karcinóma-xenograftokat hoztunk létre meztelen egerekben, ISIS-5132-vel és egy más jellegű kontroll foszforotioáttal kezeltük intravénásan beadva naponta egyszer 0.6 mg/kg vagy 6.0 mg/kg dózisban. Az ISIS-5132 megközelítőleg 80%-ban gátolta a tumor növekedését a kontrollhoz hasonlítva.

Az ISIS-5132 szintén hatásos volt, amikor intraperitoneálisan adtuk be az MDA-MB-231-xenograftokhoz a meztelen egerekbe. Az oligonukleotidot naponta egyszer adtuk be 0.6 mg/kg vagy 6.0 mg/kg dózisban. A 27. napra (a kísérlet végére) a tumor térfogata 57%-kal (0.6 mg/kg dózis esetén) vagy 64%-kal (6.0 mg/kg esetén) csökkent a kontrollhoz hasonlítva.

Az ISIS-5132 hatása a c-raf-RNS szintjére MDA-MB231-tumorkokban

Az RNS-t izoláltuk az MDA-MB231-tumor-xenograftokból és Northern-blot analízist hajtottunk végre, hogy kiértékeljük az oligonukleotid hatását a raf-RNS szintjére. Az ISIS-5132 67%-kal csökkentette a raf-RNS szintjét 27 nap után, amikor azt intravénásan adtuk be, és 39%-kal, amikor azt intraperitoneálisan adtuk be (mindkettőt 6 mg/kg dózisban).

Az ISIS-5132 hatása a Colo-205 humán vastagbél-karcinóma tumorokra

Szubkután humán Colo-205-karcinóma-xenograftokat hoztunk létre meztelen egerekben, ISIS-5132-vel és egy más jellegű kontroll foszforotioáttal kezeltük intravénásan beadva naponta egyszer 6.0 mg/kg dózist. Ebben a kísérletben az ISIS-5132 több, mint 40%-kal gátolta a tumor növekedését 25 nap múlva a kontrollhoz hasonlítva.

Az ISIS-5132 hatása A549 humán tüdő-adenokarcinóma tumorokra

Szubkután humán A549-tüdőadenokarcinóma-xenograftokat hoztunk létre hím Balb/c meztelen egerekben, ISIS-5132-vel és egy kontroll foszforotioáttal kezeltük intravénás injekció formájában beadva naponta 0.006-tól 6.0 mg/kg dózistartományban. Az ISIS-5132 csökkentette a tumor méretét minden dózisban, dózistól függő módon, ahogyan az 1.A ábrán mutatjuk be. Egy kevert ("scrambled") raf-oligonukleotidnak, az ISIS-10353-nak nem volt hatása egyik dózisban sem (1/B. ábra).

Az ISIS-5132 hatása a c-raf-RNS szintjére az A549 tumorsejtekben

Az RNS-t az A549-tumor-xenograftokból izoláltuk és Northern-blot analízist végeztünk, hogy kiértékeljük az oligonukleotid hatását a raf-RNS szintjére. Az ISIS-5132 progresszíven csökkentette a raf-RNS szintjét az oligókezelés megkezdése utáni 8. órától. Amikor a kísérletet a 13. nap befejeztük, az RNS-szint még csökkent és megközelítőleg elérte a kontroll 15%-át.

A 2'-O-metil, részben módosítatlan gerincű ("gapped") oligonukleotid, hatása az A549 tüdőxenograft-tumorokra

Az ISIS-6717-et - egy 2'-O-metil, módosítatlan gerincű oligonukleotidot - hasonlítottunk az ISIS-5132-höz (4. táblázat) az A549 tumor-xenograft növekedését gátló képessége alapján. 0.006, 0.06, 0.6 és 6.0 mg/kg intravénásan

adott dózisok alapján a két oligonukleotid látszólag nem volt megkülönböztethető a tumornövekedésre kifejtett hatásuk alapján. Ezért az ISIS-6717 a találmány kedvező megvalósítási módja.

Az A-raf-fal reagáló antiszensz oligonukleotidok

Úgy gondoljuk, hogy bizonyos oligonukleotidok, amelyek az A-raf-mRNS-hez képesek hibridizálódni és amelyek gátolják az A-raf-expressziót, hasznosak a sejt hiperproliferációjába való beavatkozáshoz. Az A-raf-expresszió inhibíciójának módszereit ilyesféle antiszensz oligonukleotidokkal éppúgy hasznosnak gondoljuk a sejt hiperproliferációjába való beavatkozáshoz.

A 7. táblázatban bemutatott foszforotioát dezoxioligonukleotidokat a Genbank A-raf-"HUMARAFIR" (Genbank jegyzék x04790) alapján terveztük és szintetizáltuk.

7. táblázat

A human A-raf-hoz hibridizálódni képes oligonukleotidok

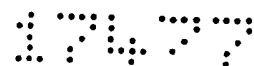
| ISIS-# | szekvencia | terület | szekv.az.sz. |
|---------------|----------------------------|----------------|---------------------|
| 9060 | GTC AAG ATG GGC TGA GGT GG | 5' UTR | 28 |
| 9061 | CCA TCC CGG ACA GTC ACC AC | Coding | 29 |
| 9062 | ATG AGC TCC TCG CCA TCC AG | Coding | 30 |
| 9063 | AAT GCT GST GGA ACT TGT AG | Coding | 31 |
| 9064 | CCG GTA CCC CAG GTT CTT CA | Coding | 32 |
| 9065 | CTG GGC AGT CTG CCG GGC CA | Coding | 33 |
| 9066 | CAC CTC AGC TGC CAT CCA CA | Coding | 34 |
| 9067 | GAG ATT TTG CTG AGG TCC GG | Coding | 35 |
| 9068 | GCA CTC CGC TCA ATC TTG GG | Coding | 36 |
| 9069 | CTA AGG CAC AAG GCG GGC TG | Stop | 37 |
| 9070 | ACG AAC ATT GAT TGG CTG GT | 3' UTR | 38 |
| 9071 | GTA TCC CCA AAG CCA AGA GG | 3' UTR | 39 |
| 10228 | CAT CAG GGC AGA GAC GAA CA | 3' UTR | 40 |

Az ISIS-9061, ISIS-9069 és az ISIS-10228 sz. oligonukleotidok hatását az A-raf-mRNS szintjére A549, T24 és NHDF sejtekben Northern-blot analízissel értékeltük ki. Mindhárom oligonukleotid csökkentette az A-raf-RNS szintjét dózis-függő módon mindhárom sejttypusban, nagyobb, mint 50% inhibícióval 500 nM dózisban alkalmazva mindegyik sejtben. A legnagyobb inhibíciót (88%) az ISIS-9061 és 9069 érte el T24-sejtekben. Az említett három oligonukleotid (ISIS-9061, 9069 és 10228) kedvező, az ISIS-9069 és 9061 még kedvezőbb megvalósítási mód.

Patkány és egér c-raf-oligonukleotidok azonosítása

Sok olyan eset, amelyet meggyőződésünk szerint a raf kináz befolyásol, nem alkalmazható az embereken végzett kísérletekre. Például az átültetett szövet kivetődése egy olyan eset, amely valószínűleg ellensúlyozható a raf-expresszióval; de ezt világosan inkább csak állatkísérletekben alapján szabad értékelni, nem az átültetéssel kezelt humán páciensekben. Egy másik ilyen példa a resztenózis. Ez az eset állati modelleken tesztelhető, itt patkány és egér modelleket használtunk.

Olyan oligonukleotid szekvenciák voltak azonosítva, amelyek a c-raf-expressziót inhibeálták patkány és egérsejtekben. A patkány és az egér c-raf-gének egyes szakaszai nagymértékű homológiát mutatnak; egy sorozat olyan oligonukleotidot terveztünk és szintetizáltunk, amelyeknek mind a patkány mind az egér c-raf-mRNS-e célja volt, a humán c-raf-hoz hibridizálódni képes oligonukleotidok elem-



zéséből nyert információk alapján. Ezen oligonukleotidok aktivitását egér-bEND- és patkány-A-10-sejtekben teszteltük Northern-blot módszer segítségével. Az oligonukleotidokat (mind foszforotioátok) a 8. táblázatban mutatjuk be.

8. táblázat

Egér és patkány c-raf-hoz hibridizálódni képes oligonukleotidok

| ISIS-# | célpont | szekvencia | szekv.az.sz. |
|--------|---------|----------------------|--------------|
| 10705 | Coding | GGAACATCTGGAATTTGGTC | 41 |
| 10706 | Coding | GATTCACTGTGACTTCGAAT | 42 |
| 10707 | 3' UTR | GCTTCCATTTCCAGGGCAGG | 43 |
| 10708 | 3' UTR | AAGAAGGCAATATGAAGTTA | 44 |
| 10709 | 3' UTR | GTGGTGCCTGCTGACTCTTC | 45 |
| 10710 | 3' UTR | CTGGTGGCCTAAGAACAGCT | 46 |
| 10711 | AUG | GTATGTGCTCCATTGATGCA | 47 |
| 10712 | AUG | TCCCTGTATGTGCTCCATTG | 48 |
| 11060 | 5' UTR | ATACTTATACCTGAGGGAGC | 49 |
| 11061 | 5' UTR | ATGCATTCTGCCCCAAGGA | 50 |
| 11062 | 3' UTR | GACTTGTATACCTCTGGAGC | 51 |
| 11063 | 3' UTR | ACTGGCACTGCACCACTGTC | 52 |
| 11064 | 3' UTR | AAGTTCTGTAGTACCAAAGC | 53 |
| 11065 | 3' UTR | CTCCTGGAAGACAGATTCAG | 54 |

Az ISIS-11061 és 10707 sz. oligonukleotid esetében azt találtuk, hogy nagyobb, mint 90%-ban inhibeálják a c-raf-mRNS szintet egér bEND-sejtekben 400 nM dózis esetén. Ez a két oligonukleotid látszólag teljesen gátolta a raf-RNS-szintet patkány A-10 sejtekben 200 nM koncentrációban. Az ISIS-10707 50%-os gátlási koncentrációja 170 nM volt egér-bEND-sejtekben és 85 nM volt patkány-A-10-sejtekben. Az ISIS-11061 50%-os gátlási koncentrációja 85 nM volt egér-bEND-sejtekben és 30 nM patkány-A-10-sejtekben.

Az ISIS-11061 hatása az endogén raf-expresszióra egerekben

Egerekbe intraperitoneálisan oltottunk ISIS-11061-gyel (50 mg/kg) vagy kontroll oligonukleotiddal vagy sóoldat kontrollal naponta egyszer három napig. Az állatokat leöltük és a szervek mRNS expresszióját Northern-blot módszerrel analizáltuk. Az ISIS-11061 csökkentette a c-raf-mRNS szintet a májban körülbelül 70%-kal. A kontroll oligonukleotidnak nem volt hatása a c-raf-expresszióra. Az ISIS-11061 specifikus volt a c-raf-ra; az A-raf- és a G3PDH-RNS-szint változatlan volt az oligonukleotid kezelésre.

A c-raf-ra irányuló antiszensz oligonukleotidok megnövelik az túlélő képességet egér szívatültetés esetén

Abból a célból, hogy meghatározzuk az ISIS-11061 c-raf-antiszensz oligonukleotid terápiás hatását más szervezetből átültetett szövet vagy szerv kilökődésének meggátolására, az oligonukleotidok aktivitásának tesztelésére

vaszkularizált heterotóp szívátültetési egérmódellet használtunk. A szíveket C57BI10 egerekből ültettük át C3H egerek hasüregébe elsődleges vaszkularizált átültetésként, amelyet lényegében Isobe és mtsai. írtak le, *Circulation* 84, 1246-1255 (1991). Az oligonukleotidokat folyamatos intravénás adagolással juttattuk be 7 napon keresztül Alzet-féle pumpával. A kezeletlen egerek átültetés utáni átlagos túlélési ideje $7,83 \pm 0,75$ nap volt (7, 7, 8, 8, 8, 9 nap). Az ISIS-11061-el 20 mg/kg vagy 40 mg/kg dózissal 7 napig kezelt egerek az átültetést legalább 11 nappal élték túl (11, 11, 12 nap a 20 mg/kg dózis esetén és >11, >11, >11 nap a 40 mg/kg dózis esetén).

Egy próbakísérletet végeztünk patkányokban úgy, hogy a szíveket Lewis-féle patkányokból ültettük át ACI-patkányok hasüregébe. A patkányok ISIS-11061-et kaptak 20 mg/kg dózisban 7 napig Alzet-féle pumpával. Az átültetés utáni átlagos túlélési idő a kezeletlen patkányok esetén $8,86 \pm 0,69$ nap volt (8, 8, 9, 9, 9, 9, 10 nap). Az oligonukleotiddal kezelt patkányok átültetés utáni túlélési ideje $15,3 \pm 1,15$ nap volt (14, 16, 16 nap).

A c-raf-ra irányuló antiszensz oligonukleotidok hatása simaizom sejtproliferációra

A simaizom sejtproliferáció az oka a véredény szűkületnek (sztenózis), például atherosclerosisban és resztenózis az angioplázia után. Kísérleteket végeztünk abból a célból, hogy meghatározzuk az ISIS-11061 hatását az A-10-patkány-simaizomsejtek proliferációjára. A sejteket

ISIS-11061 jelenlétében (plusz lipofektin) és anélkül tenyésztettük, és a sejtproliferációt megmértük 24 és 48 órával a magzati borjúsérummal történt stimulálás után. Az ISIS-11061 (500 nM) inhibeálta a szérum által stimulált sejtnövekedést dózis-függő módon, a maximális inhibíció 46%-os és 75%-os volt 24 és 48 óra után. Az 50%-os gátlási koncentráció 200 nM volt erre a vegyületre. Egy más jellegű kontroll oligonukleotidnak nem volt hatása 500 nM dóziséig.

A c-raf-hoz hibridizálódni képes antiszensz oligonukleotidok hatása a resztenózisra patkányokban

Az angioplaziás resztenózis modelljeként egy patkány arteria carotis sérüléssel modellet alkalmaztunk, amit a c-myc-onkogénhez hibridizálódni képes antiszensz oligonukleotid resztenózisra kifejtett hatásának elemzésére használtunk. Bennett és mtsai: J. Clin. Invest. 93, 820-828 (1994). Ezt a modellet használtuk a patkány c-raf-hoz hibridizálódni képes antiszensz oligonukleotidok (különösen az ISIS-11061) resztenózisra kifejtett hatásának elemzéséhez. Az arteria carotis sérülését egy ballonkatéterrel hoztuk létre, majd oligonukleotidokat adtunk vagy intravénás injekcióval, vagy folyamatos intravénás adagolással Alzet-féle pumpa segítségével, vagy az arteria carotisba közvetlenül juttatva "pluronic" gélmátrix alkalmazásával, ahogyan Bennett és mtsai. leírják. Felgyógyulás után a patkányokat elpusztítottuk, az arteria carotisokat mikroszkóppal megvizsgáltuk, és a kezelés hatását lumenális metszetekben határoztuk meg.

A találmányt a továbbiakban példákkal illusztráljuk, amely illusztrációkkal azonban nem kívánjuk az igényelt oltalmi kört a találmány előnyös megvalósítási módjaira korlátozni.

1. példa

Az oligonukleotidok szintézise és jellemzése

A módosíthatlan DNS oligonukleotidokat automata DNS szintetizátorban szintetizáltuk (Applied Biosystems 380B model) a standard foszforamidit-kémiát használva, az oxidációt jóddal végeztük. A β -cianoetil-diizopropil-foszforamiditot az Applied Biosystems cégtől vásároltuk (Foster City, CA). A foszforotioát oligonukleotidok preparálásánál a standard oxidációs tartályt helyettesítettük H-1,2-benzoditiol-3-on-1,1-dioxid 0.2 M acetonitriles oldatával a foszfit-kötések lépésenkénti tiálásához. A tiálási ciklus várakozási lépését 68 másodpercre növeltük majd azt a "capping" lépés követte. A 2'-O-metil-foszforotioát-oligonukleotidokat 2'-O-metil- β -cianoetil-diizopropil-foszforamiditok felhasználásával szintetizáltuk (Chemgenes, Needham MA) és a módosíthatlan oligonukleotidoknál használt standard ciklust alkalmaztuk, kivéve a tetrazol és a bázis pulzusadagolása utáni várakozási lépést növeltük meg 360 másodpercre. A szintézis kiindulási pontjaként használt 3'-végi bázis 2'-dezoxiribonukleotid volt. A 2'-O-propil-oligonukleotidok előállításához az eljárást kissé módosítottuk.

A 2'-fluoro-foszfotioát-oligonukleotidok szintéziséhez 5'-dimetoxi-tritil-3'-foszforamiditokat használtunk és úgy preparáltuk, ahogyan a 463358 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben (1990. január 11.) és az 566977 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben (1990. augusztus 13.) le van írva, amelyeknek ugyanaz a szerzője, mint a jelen találmányi leírásé, és amelyek a referenciák között szerepelnek. A 2'-fluoro-oligonukleotidokat foszforamidit kémiával preparáltuk, a standard DNS szintézis csekély módosításával: a védőcsoport eltávolítása metanolos ammóniával történt szobahőmérsékleten.

Az oligonukleotidok lehasítása a kontrollált pórusú üvegoszlopról (Applied Biosystems) és a blokkolás koncentrált ammónium hidroxiddal (55°C, 18 óráig) való eltávolítása után az oligonukleotidokat kétszeres kicsapással tisztítottuk 0.5 M NaCl-ból 2.5 térfogat etanol felesleggel. Az analitikai gélelektroforézist 20% akrilamid, 8 M karbamid, 45 mM TRIS-borát-pufferben, pH=7,0 végeztük.

A gélelektroforézises kép alapján úgy ítéltük meg, hogy az oligonukleotidok és foszfotioát analógjaik hossza nagyobb volt a teljes hossz 80%-ánál.

2. példa

A c-raf-mRNS expresszió inhíbeálásának Northern-blot analízise

A T24 humán hólyagrák-sejtvonalat az American Type Culture Collection intézettől (Rockville MD) szereztük be.

A sejteket McCoy-féle 5A-táptalajban növesztettük L-glutaminnal (Gibco BRL, Gaithersburg MD), kiegészítve 10% hőinaktivált magzati borjúsérummal és 50 U/ml penicillinnel és sztreptomocinnel. A sejteket 100 mm-es csészén szellesztettük. Amikor 70%-os konfluenciát elértek, oligonukleotiddal kezeltük azokat. A csészéket 10 ml előmelegített PBS-el és 5 ml "Opti-MEM" csökkentett sérumtartalmú táptalajjal mostuk, ez utóbbi 2.5 µl DOTMA-t tartalmazott. Ezután az oligonukleotidot lipofektinnel adtuk hozzá a kívánt koncentrációban. 4 órás inkubálás után, a táptalajt kicseréltük McCoy-féle táptalajra. A sejteket 24 - 72 órával az oligonukleotid kezelés után gyűjtöttük be és az RNS-t a standard CsC-os tisztítási módszerrel izoláltuk. Kingston, R. E., in "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. A sejtlizátum teljes RNS-tartalmát izoláltuk centrifugálással CsCl-párnán. Az RNS-mintákat elektroforézissel választottuk el 1.2%-os agaróz-formaldehid-gélben és hibridizációs membránra vittük át kapilláris diffúzió segítségével egy 12 - 24 órás időtartamban. Az RNS-t kereszt kötöttük a membránhoz UV-fény segítségével "Stratalinker" alkalmazásával (Stratagene, La Jolla, CA) és hibridizáltuk egy "random priming" eljárással ³²P-vel jelölt c-raf-DNS-próbához (ATCC-től vásároltuk) vagy G3PDH próbához mint kontroll. Az RNS mennyiségét "Phosphorimager"-rel (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) határoztuk meg.

3. példa

A c-raf-kináz fehérje specifikus gátlása T24-sejtekben

A T24-sejtek oligonukleotiddal (200 nM) és lipofektinnel voltak kezelve a T=0. és T=24. órában. Fehérjeextraktumot készítettünk a T=48. órában, elektroforézist végeztünk akrilamid gélben és Western-blot módszerrel analizáltuk c-raf (UBI, Lake Placid, NY) vagy A-raf (Transduction Laboratories, Knoxville, TN) elleni poliklonális ellenanyag segítségével. Radioaktívan jelölt második ellenanyag segítségével határoztuk meg a raf-protein mennyiségét "Phosphorimager"-el (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

4. példa

A sejtproliferáció antiszensz inhibíciója

T24-sejteket a 0. napon két óráig inkubáltunk különböző koncentrációju oligonukleotiddal és lipofektinnel (50 nM oligonukleotid 2 µg/ml lipofektin jelenlétében; 100 nM oligonukleotid és 2 µg/ml lipofektin; 250 nM oligonukleotid és 6 µg/ml lipofektin vagy 500 nM oligonukleotid és 10 µg/ml lipofektin). Az első nap a sejteket másodsorra is kezeltük a kívánt oligonukleotid koncentrációval 2 óráig. A második nap a sejteket megszámláltuk.



5. példa

Az ISIS-5132 hatása a T24 humán hólyagkarcinóma-tumor-xenograftokra meztelen egerekben

5×10^6 T24-sejtet ültettünk szubkután meztelen egerek jobb belső combjába. Az oligonukleotidokat (ISIS-5132 és egy nem rokon szerkezetű kontroll foszforotioát oligonukleotid sóoldatban szuszpendálva) 10 nappal a tumorsejt beültetése után kezdtük adagolni, naponta egyszer. Egy tiszta sóoldat kontrollt is beadtunk. Az oligonukleotidokat intravénás injekció formájában adtuk be 25 mg/kg dózisban. A tumor nagyságát mértük és a tumor térfogatát kiszámítottuk a 11., 15. és 18. napon a tumorsejt beültetése után.

6. példa

Az ISIS-5132 hatása MDA-MB-231-jelű humán mellkarcinóma-tumor-xenograftokra meztelen egerekben

5×10^6 MDA-MB-231-sejtet ültettünk szubkután meztelen egerek jobb belső combjába. Az oligonukleotidokat (ISIS-5132 és egy nem rokon szerkezetű kontroll foszforotioát oligonukleotid, sóoldatban szuszpendálva) 10 nappal a tumorsejt beültetése után kezdtük adagolni, naponta egyszer. Egy tiszta sóoldat kontrollt is beadtunk. Az oligonukleotidokat intravénás injekció formájában adtuk be 0.6 mg/kg vagy 6.0 mg/kg dózisban. A tumor nagyságát mértük és a tumor térfogatát kiszámítottuk a 10., 13., 16., 20., 23. és 27. napon a tumorsejt beültetése után.

Az oligonukleotid intraperitoneális beadásakor az oligonukleotidot naponta egyszer adtuk be a tumorsejt beültetése utáni 10. naptól kezdve. Tiszta sóoldat kontrollt is adtunk. Az oligonukleotidok intraperitoneális injekciójának dózisa 0.6 mg/kg vagy 6.0 mg/kg volt. A tumor nagyságát mértük, a térfogatát számítottuk a 10., 13., 16., 20., 23. és a 27. napon a tumorsejt beültetése után.

7. példa

Az ISIS-5132 hatása a Colo-205 humán vastagbél-karcinóma tumor-xenograftokra meztelen egerekben

5×10^6 Colo-205-sejtet ültettünk szubkután meztelen egerek jobb belső combjába. Az oligonukleotidokat (ISIS-5132 és egy más jellegű kontroll foszforotioát oligonukleotid sóoldatban szuszpendálva) 5 nappal a tumorsejt beültetése után kezdtük adagolni, naponta egyszer. Egy tiszta sóoldat kontrollt is beadtunk. Az oligonukleotidokat intravénás injekció formájában adtuk be. Az oligonukleotid dózis 6.0 mg/kg volt. A tumor nagyságát mértük és a tumor térfogatát számoltuk az 5., 8., 11., 14., 18., 22. és 25. napon a tumorsejt beültetése után.

8. példa

A raf-al összefüggő tumorok xenograftokon alapuló diagnosztikai mérési módszerei, meztelen egerekben

Raf-expresszióval által kiváltott tumorokat diagnosztizáltunk és különböztettünk meg más tumoroktól ennek a mérési módszernek a segítségével. A tumorból biopsziával

vett mintát pl. kollagenázzal kezeltük, vagy tripszinnel, vagy más standard módszerrel, hogy a tumortömeget disszociáltassuk. 5×10^6 tumorsejtet ültettünk be szubkután kettő vagy több meztelen egér belső combjába. A sóoldatban szuszpendált antiszensz oligonukleotidot (pl. ISIS-5132) adtunk be egy vagy több egérnek intraperitoneális injekció formájában hetente háromszor a tumorsejt beültetése utáni 4. nap után. Egy tiszta sóoldat kontrollt is beadtunk. Az oligonukleotid dózis 25 mg/kg volt. A tumor nagyságát mértük és a tumor térfogatát számítottuk a kezelés 11. napján. Az oligonukleotiddal kezelt egér tumor térfogatát hasonlítottuk a kontroll egéréhez. A raf-al összefüggő tumorerkekben mérhetően kisebbek voltak, mint a kontroll egérben. Az olyan tumorerkek esetében, melyeknek az eredete nem a raf-expresszióval hozható kapcsolatba, azt várjuk, hogy nem reagálnak a raf-irányuló oligonukleotidokra, tehát az oligonukleotid-kezelt és a kontroll tumor térfogata azonos volt.

9. példa

A raf-expresszió detektálása

Az oligonukleotidokat radioaktívan jelöltük a szintézis után ^{32}P -vel az 5' végen polinukleotid kinázzal. Sambrook és mtsai, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 2, 11.31 - 11.32. A radioaktívan jelölt oligonukleotidokat azokhoz a szövet vagy sejtmintákhoz juttattuk, amelyekről feltételeztük a raf-expressziót, úgymint boncolt tumor minták vagy

bőrminták, amelyekben pszoriázist gyanítottunk; ezeket olyan körülmények között végeztük, amelyben a hibridizáció megtörténhet, és a mintát mostuk a nem kötődött oligonukleotid eltávolítása céljából. A mintában maradt radioaktivitás jelzi a kötődött oligonukleotidot és mennyiségileg meghatározható szcintillációs számlálóval vagy más rutin eszközzel.

A találmány szerinti radioaktív oligonukleotidokat autoradiográfiában is használtuk. A szövetdarabokat radioaktívan jelölt oligonukleotiddal kezeltük és mostuk a fentebb leírtak szerint, majd fotoemulzióra helyeztük az autoradiográfia standard eljárása szerint. Az emulzió, előhívás után, ezüstös foltokat mutatott a raf-expresszió helyeinél. A raf-expresszió mennyisége az ezüst foltok mennyiségi kiértékelésével határozható meg.

A raf-expresszió fluoreszcens detektálására hasonló mérési eljárások állnak rendelkezésre a találmány szerinti oligonukleotidok felhasználásával, amelyeket fluoreszceinnel vagy más fluoreszcens csoporttal jelöltünk. A jelölt DNS oligonukleotidokat automata DNS szintetizátorban szintetizáltuk (Applied Biosystems model 380B) a standard foszforamidit kémiát használva jódos oxidációval. A β -cianoetildiizopropil-foszforamiditokat az Applied Biosystems cégtől (Foster City, CA) vásároltuk. A fluoreszcensen jelölt amiditokat a Glen Research cégtől (Sterling, VA) vásároltuk. Az oligonukleotidok inkubációja a biológiai mintával úgy történt, ahogyan azt a radioaktívan jelölt oligonukleotidok esetében leírtuk, kivéve, hogy

szcintillációs számláló helyett fluorimétert vagy fluoreszcens mikroszkópot használtunk a fluoreszcencia detektálására, amely jelzi a raf-expressziót.

10. példa

A549-xenograftok

5×10^6 A549-sejtet ültettünk be szubkután meztelen egerek belső combjába. Az oligonukleotidokat (ISIS-5132 és egy kevert raf-kontroll foszforotioát oligonukleotid, ISIS-10353) sóoldatban szuszpendálva naponta egyszer adtuk be intravénás injekció formájában 0.006-tól 6.0 mg/kg dózistartományban. A kapott tumorokat a 9., 12., 17. és 21. napon mértük és a tumor térfogatát számoltuk.

11. példa

Az oligonukleotid hatása az endogén raf-expresszióra

Az egereket intraperitoneális injekcióval kezeltük, amelyekben az oligonukleotid dózis 50 mg/kg volt az 1., 2. és a 3. napon. A 4. napon az állatokat leöltük és a szerveket eltávolítottuk a c-raf-RNS mérése céljából, amit Northern-blot analízissel végeztünk. Az állatok négy csoportját különítettük el: 1) oligonukleotid kezelés nélkül (sóoldat); 2) negatív kontroll oligonukleotid ISIS-1082 (a herpes simplex vírus RNS-éhez képes hibridizálódni); 3) negatív kontroll oligonukleotid 4189 (az egér protein kináz c- α -RNS-éhez képes hibridizálódni); 4) ISIS-11061, rágcsáló-c-raf-RNS-hez képes hibridizálódni.

12. példa

Az átültetett szív kilökődésének modellje

A szíveket patkányok vagy egerek hasüregébe ültettük (a patkányok és az egerek más törzsekhez tartoztak, mint a donorok) mint elsődlegesen vaszkularizált átültetés, ahogyan Isobe és mtsai. leírták, *Circulation* 84, 1246-1255 (1991). Az oligonukleotidokat folyamatos intravénás adagolással juttattuk be 7 napon keresztül Alzet-féle pumpa segítségével. A átültetett szív túlélését úgy figyeltük, hogy megvan-e a második szívdobbanás a hasüregben.

13. példa

Proliferációs mérési módszer A-10 simaizom sejtek felhasználásával

A10 sejteket helyeztünk 96 lyukú tenyésztő tálcába Dulbecco-féle módosított Eagle-táptalajba (DMEM) + 10% magzati borjúsérumot és hagytuk 24 órán át, hogy kötődjenek. A sejteket nyugalomba helyeztük további 24 óráig DMEM + 0.2% dializált magzati borjúsérum hozzáadásával. A nyugalmi szakasz utolsó 4 órájában a sejteket ISIS-11061 + lipofektinnel (Gibco-BRL, Bethesda MD) kezeltük szérummentes táptalajban. A táptalajt ezután eltávolítottuk, friss táptalajra cseréltük és a sejteket 10% magzati borjúsérummal stimuláltuk. A tenyésztő tálcákat ezután inkubátorba tettük és a sejtnövekedést 24 és 48 órával a szérumstimuláció után értékeltük ki MTS formazán átalakulással (Promega sejtproliferációs kit). Egy kontroll oligonukleotidot is, az ISIS-1082-t (egy más jellegű

oligonukleotid, amely a *herpes simplex* vírus RNS-sel képes hibridizálódni) is teszteltük.

14. példa

Patkány szívartéria resztenózis modell

Ezt a modellt Bennett és mtsai. írták le, J. Clin. Invest. 93, 820-828 (1994). Intimális hiperpláziát indukáltunk a szívartéria ballonkatéteres dilatációjával patkányban. A patkányokat elaltattuk és az arteria carotis communis-on sérülést indukáltunk egy embolektómiás ballonkatéter áthúzásával, amely 20 ml sóoldattal volt feltöltve. Az oligonukleotidokat az artériafal járulékos felszínéhez juttattuk "pluronic" géloldatban. Az oligonukleotidokat 0.25% "pluronic" géloldatban oldottuk fel 4°C-on (F127, BASF Corp.) a kívánt dózisban. 100 µl géloldatot juttattunk az arteria carotis communis disztális harmadába rögtön a sérülés után. A kontroll patkányokat hasonlóan kezeltük olyan géllal, amely a kontroll oligonukleotidot tartalmazta vagy nem tartalmazott oligonukleotidot. A nyaki sebet bezártuk és az állatokat hagytuk felépülni. 14 nap múlva a patkányokat kivégeztük, elvéreztettük és a szívartériákat *in situ* fixáltuk paraformaldehides és glutáraldehides perfúzióval, kivágtuk és mikroszkópba helyeztük. Az artériák keresztmetszetét számoltuk.

A pluronic géles beadás egy alternatív változata volt, amikor a patkányoknak intravénás injekcióval vagy folyamatos intravénás infúzióval (Alzet-féle pumpával) adtuk be az oligonukleotidot.



15. példa

A c-raf-kináz ellen irányuló további oligonukleotidok

A 9. táblázatban bemutatott oligonukleotidokat a Genbank-adatbázis HUMRAFR-jelű szekvenciája (Genbank azonosító: x03484) alapján terveztük. A bemutatott szekvenciájú oligonukleotidokat megszintetizáltuk és az 1-2. példákban leírtak szerint megvizsgáltuk c-raf-mRNS-expressziót gátló hatásukat. A táblázatban bemutatott valamennyi oligonukleotid oligodezoxinukleotid, foszforotioátgerincűek, és valamennyi a humán c-raf-gén 3'-végi nem-transzlálódó régiójával képes hibridizálódni.

9. táblázat

**Humán c-raf-kináz ellen irányuló antiszensz
oligonukleotidok**

| ISIS-# | szekvencia (5'→3') | szekv.az.sz. |
|--------|----------------------|--------------|
| 11459 | TTGAGCATGGGGAATGTGGG | 55 |
| 11457 | AACATCAACATCCACTTGCG | 56 |
| 11455 | TGTAGCCAACAGCTGGGGCT | 57 |
| 11453 | CTGAGAGGGCTGAGATGCGG | 58 |
| 11451 | GCTCCTGGAAGACAAAATTC | 59 |
| 11449 | TGTGACTAGAGAAACAAGGC | 60 |
| 11447 | CAAGAAAACCTGTATTCTG | 61 |
| 11445 | TTGTCAGGTGCAATAAAAAC | 62 |
| 11443 | TTAAAATAACATAATTGAGG | 63 |

A bemutatott oligonukleotidok közül az ISIS-11459 és -11449 sorrendben 38%-ban és 31%-ban csökkentette a c-raf-mRNS-szintet a vizsgálati eljárás szerint, ezért ezek a találmány szerinti megoldás előnyös megvalósításai. Az ISIS-11451, -11445 és 11443 sorrendben 18%, 11% és 7% c-raf-expresszió-gátlást eredményezett.

SZEKVENCIALISTA

AZ 1. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: nem

AZ 1. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

TGAAGGTGAG CTGGAGCCAT

20

A 2. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 2. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GCTCCATTGA TGCAGCTTAA

20

A 3. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENZS: igen

A 3. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CCCTGTATGT GCTCCATTGA 20

A 4. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENZS: igen

A 4. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GGTGCAAAGT CAACTAGAAG 20

AZ 5. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENZS: igen

AZ 5. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

ATTCTTAAAC CTGAGGGAGC 20

A 6. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 6. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GATGCAGCTT AAACAATTCT

20

A 7. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 7. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CAGCACTGCA AATGGCTTCC

20

A 8. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 8. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

TCCCGCCTGT GACATGCATT

20

A 9. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 9. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GCCGAGTGCC TTGCCTGGAA 20

A 10. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 10. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

AGAGATGCAG CTGGAGCCAT 20

A 11. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 11. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

AGGTGAAGGC CTGGAGCCAT

20

A 12. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 12. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GTCTGGCGCT GCACCACTCT

20

A 13. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 13. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CTGATTTCCA AAATCCCATG

20

A 14. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 14. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CTGGGCTGTT TGGTGCCTTA

20

A 15. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 15. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

TCAGGGCTGG ACTGCCTGCT

20

A 16. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 16. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GGTGAGGGAG CGGGAGGCGG

20

A 17. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 17. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CGCTCCTCCT CCCC GCGGCG

20

A 18. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 18. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

ttcggcggca gcttctcgcc

20

A 19. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 19. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GCCGCCCAA CGTCCTGTCTG

20

A 20. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 20. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

TCCTCCTCCC CGCGGCGGGT 20

A 21. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 21. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CTCGCCCGCT CCTCCTCCCC 20

A 22. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 22. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CTGGCTTCTC CTCCTCCCCT

20

A 23. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 23. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CGGGAGGCGG TCACATTCGG

20

A 24. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 24. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

TCTGGCGCTG CACCACTCTC

20

A 25. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 25. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

TTCTCGCCCG CTCCTCCTCC 20

A 26. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 26. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

TTCTCCTCCT CCCCTGGCAG 20

A 27. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 27. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CCTGCTGGCT TCTCCTCCTC 20

A 28. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 28. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GTCAAGATGG GCTGAGGTGG

20

A 29. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 29. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CCATCCCGGA CAGTCACCAC

20

A 30. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 30. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

ATGAGCTCCT CGCCATCCAG

20

A 31. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 31. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

AATGCTGGTG GAACTTGTAG 20

A 32. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 32. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CCGGTACCCC AGGTTCTTCA 20

A 33. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen



A 33. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CTGGGCAGTC TGCCGGGCCA

20

A 34. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 34. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CACCTCAGCT GCCATCCACA

20

A 35. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 35. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GAGATTTTGC TGAGGTCCGG

20

A 36. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 36. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GCACTCCGCT CAATCTTGGG 20

A 37. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 37. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CTAAGGCACA AGGCGGGCTG 20

A 38. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 38. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

ACGAACATTG ATTGCTGGT 20

A 39. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 39. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GTATCCCAA AGCCAAGAGG

20

A 40. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 40. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CATCAGGGCA GAGACGAACA

20

A 41. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 41. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GGAACATCTG GAATTTGGTC

20

A 42. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 42. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GATTCACTGT GACTTCGAAT 20

A 43. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 43. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GCTTCCATTT CCAGGGCAGG 20

A 44. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen



A 44. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

AAGAAGGCAA TATGAAGTTA

20

A 45. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 45. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GTGGTGCCTG CTGACTCTTC

20

A 46. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 46. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CTGGTGGCCT AAGAACAGCT

20

A 47. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 47. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GTATGTGCTC CATTGATGCA

20

A 48. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 48. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

TCCCTGTATG TGCTCCATTG

20

A 49. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 49. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

ATACTTATAC CTGAGGGAGC

20

A 50. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 50. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

ATGCATTCTG CCCCCAAGGA

20

A 51. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 51. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GACTTGTATA CCTCTGGAGC

20

A 52. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 52. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

ACTGGCACTG CACCACTGTC

20

A 53. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 53. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

AAGTTCTGTA GTACCAAAGC

20

A 54. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

ANTISZENSZ: igen

A 54. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CTCCTGGAAG ACAGATTCAG

20

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Oligonukleotid, amely 8--50 nukleotid hosszúságú, és amely képes a humán raf-ot kódoló mRNS-hez hibridizálódni, és amely képes gátolni a raf-expressziót.

2. Az 1. igénypont szerinti oligonukleotid, amely a humán A-raf-ot vagy a humán c-raf-ot kódoló mRNS-hez képes hibridizálódni.

3. A 2. igénypont szerinti oligonukleotid, melynek szekvenciája megegyezik a 29., 37. vagy 40. azonosítószámon megadott szekvenciával.

4. A 2. igénypont szerinti oligonukleotid, amely a humán c-raf-ot kódoló mRNS transzlációs iniciációs, 3' -végi nem-transzlálódó vagy 5' -végi nem-transzlálódó szakaszához képes hibridizálódni.

5. Az 1. igénypont szerinti oligonukleotid, amely legalább egy foszforotioát-kötést tartalmaz és/vagy az oligonukleotid legalább egy nukleotid egysége a cukorrész 2' -pozíciójában módosítva van.

6. Az 5. igénypont szerinti oligonukleotid, amelyben a cukorrész 2' -pozíciójában lévő módosítás egy 2' -O-alkil- vagy egy 2' -fluoro-módosítás.

7. Az 1. igénypont szerinti oligonukleotid, gyógyászati lag elfogadható hordozóban.

8. A 4. igénypont szerinti oligonukleotid, amely tartalmazza a 2, 6, 8, 12, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 vagy 27 azonosítószámú szekvenciákat.

9. Oligonukleotid, melynek a szekvenciája megegyezik a 8. azonosítószámon megadott szekvenciával.

10. A 9. igénypont szerinti oligonukleotid, amely legalább egy 2' -O-metil-módosítást tartalmaz.

11. Kiméra oligonukleotid, amely 8-50 nukleotid hosszúságú; a humán raf-ot kódoló mRNS-hez képes hibridizálódni; és tartalmaz egy legalább egy - célpontkötő affinitás növelése céljából módosított - nukleotidból álló első szakaszt, valamint egy második szakaszt, amely az RNáz-H szubsztrátja; és amely kiméra oligonukleotid képes gátolni a raf-expressziót.

12. A 11. igénypont szerinti oligonukleotid, amelyben a célpontkötő affinitás növelése céljából módosított nukleotid a cukorrész 2' -pozíciójában van módosítva, és/vagy az RNáz-H-szubsztrát-szakasz legalább egy 2' -dezinukleotidot tartalmaz.

13. A 12. igénypont szerinti oligonukleotid, amelyben a cukorrész 2' -pozíciójának módosítása 2' -O-alkil- vagy 2' -fluoro-módosítás, és/vagy az RNáz-H-szubsztrát-szakasz legalább egy 2' -dezinukleotidot tartalmaz.

14. A 11. igénypont szerinti oligonukleotid, amely legalább egy foszforotioát kötést tartalmaz.

15. A 11. igénypont szerinti oligonukleotid, amely a humán c-raf-ot kódoló mRNS translációs iniciációs, 3' -végi nem-transzlálódó vagy 5' -végi nem-transzlálódó szakaszához képes hibridizálódni.

16. A 11. igénypont szerinti oligonukleotid, gyógyászatiilag elfogadható hordozóban.

17. A 14. igénypont szerinti oligonukleotid, melynek szekvenciája megegyezik a 8., 21., 24., 25., 26. vagy 27. azonosítószámon bemutatott szekvenciával.

18. Kiméra oligonukleotid, melynek szekvenciája megegyezik a 8. azonosítószámon bemutatott szekvenciával, és amely tartalmaz egy legalább egy - célpontkötő affinitás növelése céljából módosított - nukleotidot tartalmazó első szakaszt, valamint egy második szakaszt, amely az RNáz-H szubsztrátja; és amely kiméra oligonukleotid képes gátolni a raf-expressziót.

19. Eljárás humán raf-expressziójának gátlására, és/vagy sejtek hiperproliferációjának gátlására, és/vagy abnormális proliferatív állapot kezelésére, *azzal jellemezve*, hogy a humán raf-ot expresszáló szöveteket vagy sejteket, és/vagy hiperproliferatív sejteket, és/vagy feltehetően abnormális proliferatív állapotra utaló tüneteket mutató egyén sejtjeit, szöveteit vagy testfolyadékait 1., 2., 3., 5. vagy 8. igénypont szerinti oligonukleotiddal érintkeztetjük.

20. A 19. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy humán raf-ot abnormálisan expresszáló szöveteket vagy sejteket érintkeztetünk az oligonukleotiddal.

21. A 19. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy oligonukleotidként kiméra-oligonukleotidot alkalmazunk.

22. A 21. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy kiméra-oligonukleotidként 8., 21., 24., 25.,

26. vagy 27. azonosítószámú szekvenciát tartalmazó oligonukleotidot alkalmazunk.

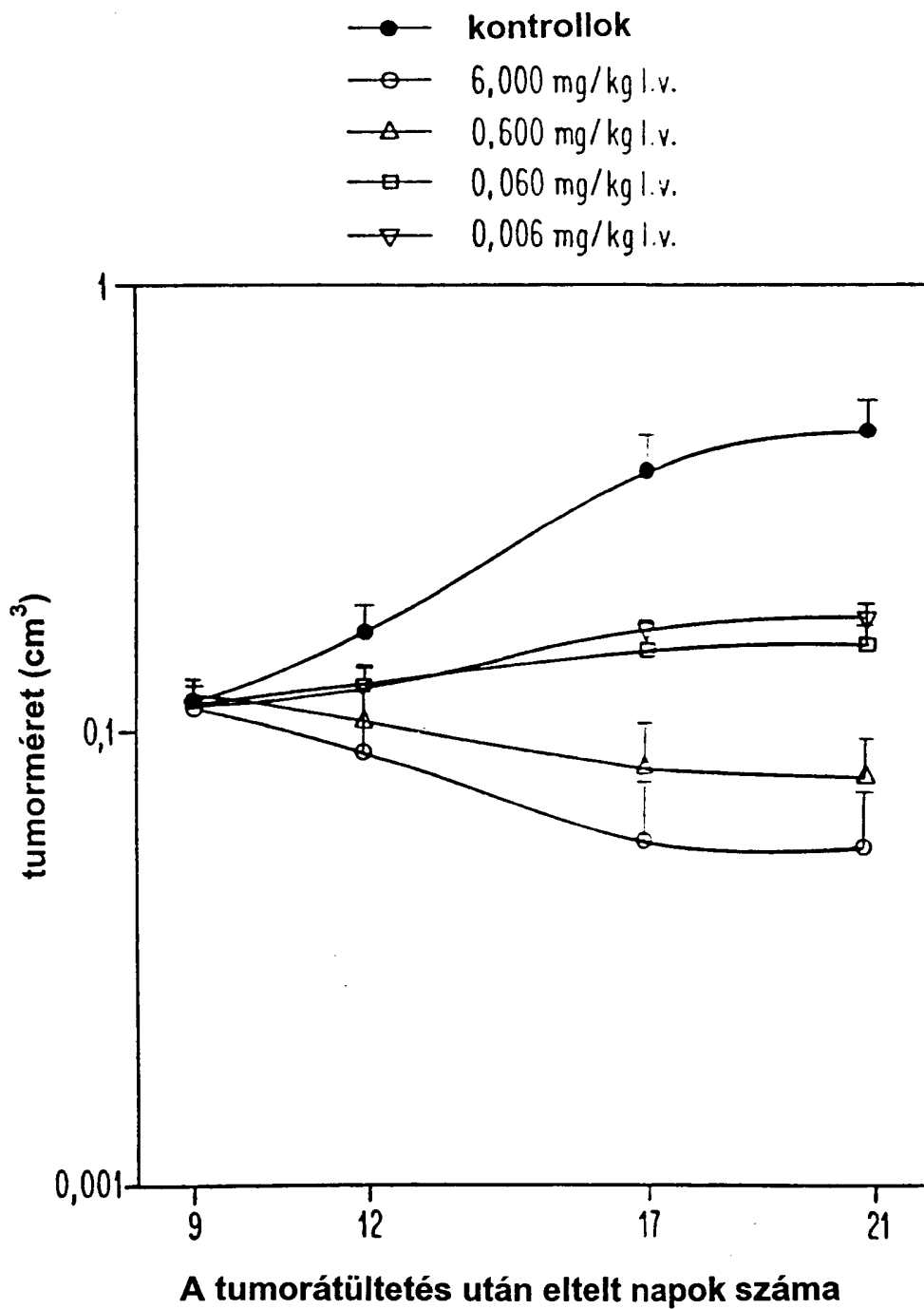
23. A 19. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy oligonukleotidként legalább egy foszforotoát-kötést tartalmazó oligonukleotidot alkalmazunk.

24. Eljárás humán raf-expressziójának gátlására, és/vagy sejtek hiperproliferációjának gátlására, és/vagy abnormális proliferatív állapot kezelésére, *azzal jellemezve*, hogy a humán raf-ot expresszáló szöveteket vagy sejteket, és/vagy hiperproliferatív sejteket, és/vagy feltehetően abnormális proliferatív állapotra utaló tüneteket mutató egyén sejtjeit, szöveteit vagy testfolyadékait 8. igénypont szerinti oligonukleotiddal érintkeztetjük.

25. A 19. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hiperproliferatív rendellenességre utaló tüneteket mutató egyén sejtjeit, szöveteit vagy testfolyadékait érintkeztetjük az oligonukleotiddal.

26. A 25. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hiperproliferatív rendellenességként rákra, resztenózisra, pszoriázisra vagy T-sejt-aktiválódással és szaporodással jellemezhető rendellenességre utaló tüneteket mutató egyén sejtjeit, szöveteit vagy testfolyadékait érintkeztetjük az oligonukleotiddal.

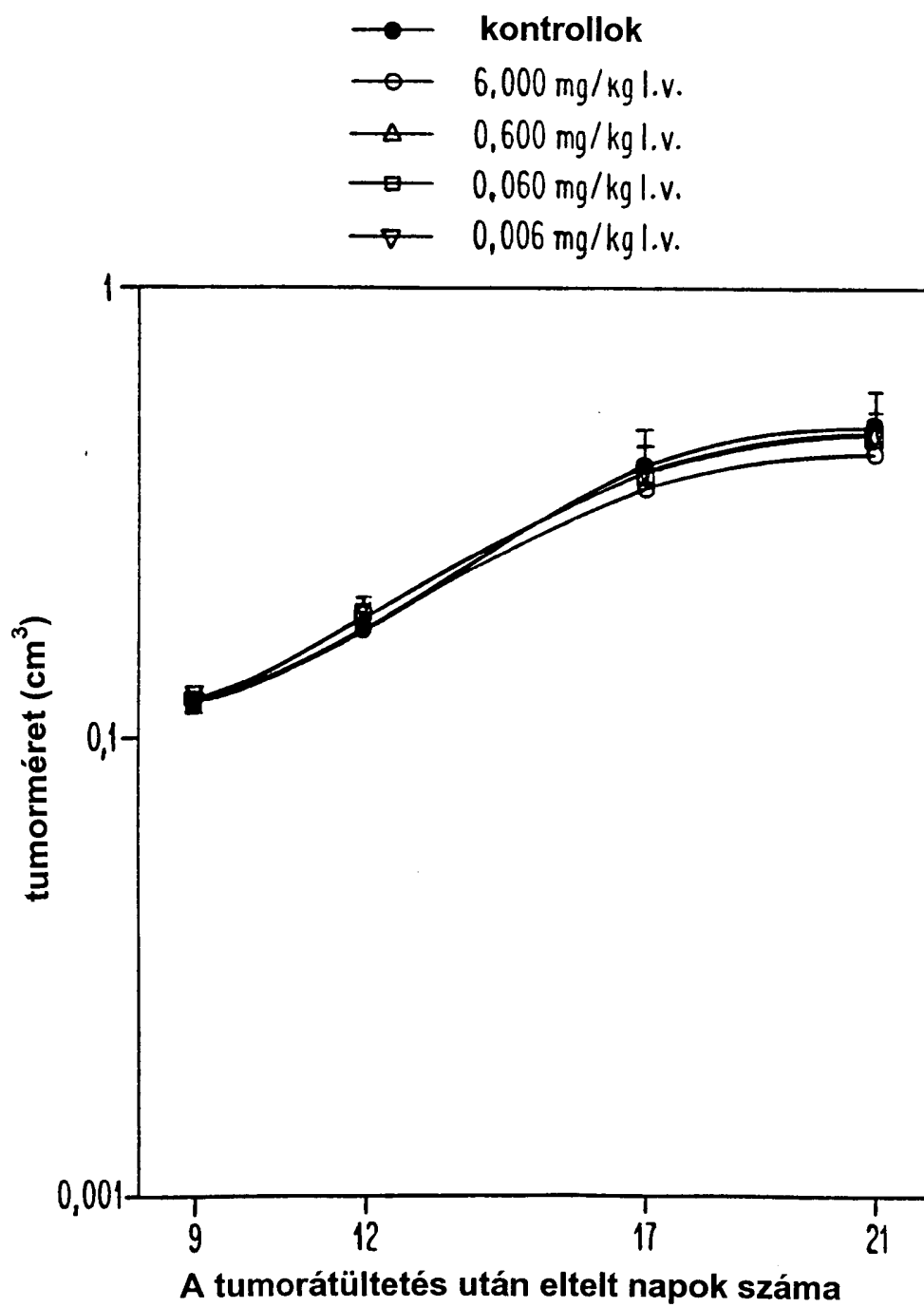
27. Az 1. vagy 14. igénypont szerinti oligonukleotid, amelynek szekvenciája megegyezik az 55. vagy 60. azonosítószámon megadott szekvenciával.



1A ábra

P96 03277

2/2



1B ábra