

ÖZET

BEYİN KAYNAKLI NÖROTROFİK FAKTÖR (BKNF) İLE İLİŞKİLİ HASTALIKLARIN DOĞAL ANTİSENS TRANSKRİPTİNİN BKNF'YE İNHİBİSYONU İLE MUAMELESİ

5

Mevcut buluş, Beyin kaynaklı nörotrofik faktörün (BKNF) ekspresyonunu ve/ veya fonksiyonunu özellikle de Beyin kaynaklı nörotrofik faktörün (BKNF) doğal antisens polinükleotitlerini hedefleyerek modüle eden antisens oligonükleotitlerle ilgilidir.

10

Buluş ayrıca bu antisens oligonükleotitlerinin tanımlanması ve bunların BKNF ekspresyonu ile bağlantılı hastalıkların ve bozuklukların mualemesinde kullanımları ile ilgilidir.

İSTEMLER

1. Terapötik bir bileşik olarak kullanılmak üzere bir Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BKNF) doğal antisens transkriptini hedefleyen bir antisens oligonükleotiti olup, özelliği; burada
5 oligonükleotitin Beyin kaynaklı nörotrofik faktörün (BKNF) ekspresyonunu arttırması, burada doğal antisens transkriptinin, DİZİ KİM. NO: 50-55'e sahip oligonükleotitlerin hariç tutulması koşulu ile DİZİ KİM. NO: 3-8'in herhangi birinde belirtilen nükleik asit dizisine sahip olmasıdır.

10

2. Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BKNF) ile ilişkili hastalık veya bozukluğun önlenmesinde veya mualemesinde kullanılmak üzere bir Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BKNF) doğal antisens transkriptini hedefleyen bir antisens oligonükleotit olup,
15 özelliği; burada adı geçen oligonükleotitin, Beyin kaynaklı nörotrofik faktörün (BKNF) ekspresyonunu arttırması, burada hastalık veya bozukluğun nöro-otolojik hastalık veya bozukluk, işitme kaybı, Rett sendromu, Alzheimer hastalığı, şizofreni, Huntington hastalığı, omurilik zedelenmesi, depresyon, bilişsel
20 bozukluk, bipolar bozukluk, WAGR sendromu ve obeziteden oluşan gruptan seçiliyor olması, burada doğal antisens transkriptin DİZİ KİM. NO: 50-55'e sahip oligonükleotitlerin hariç tutulması koşulu ile DİZİ KİM. NO: 3-8'in herhangi birinde belirtilen nükleik asit dizisine sahip olmasıdır.

25

3. Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BKNF) ile ilişkili bir hastalık veya bozukluğun önlenmesi veya mualemesi için olan bir ilacın imalatında bir Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BKNF) doğal antisens transkriptini hedefleyen bir antisens oligonükleotitin
30 kullanımı olup, özelliği; burada adı geçen oligonükleotitin, Beyin kaynaklı nörotrofik faktörün (BKNF) ekspresyonunu arttırması,

burada hastalık veya rahatsızlığın nöro-otolojik hastalık veya bozukluk, işitme kaybı, Rett sendromu, Alzheimer hastalığı, şizofreni, Huntington hastalığı, omurilik zedelenmesi, depresyon, bilişsel bozukluk, bipolar bozukluk, WAGR sendromu ve obeziteden oluşan gruptan seçiliyor olması, burada doğal antisens transkriptin DİZİ KİM. NO: 50-55'e sahip oligonükleotitlerin hariç tutulması koşulu ile DİZİ KİM. NO: 3-8'in herhangi birinde belirtilen nükleik asit dizisine sahip olmasıdır.

4. Hasta hücrelerinde veya dokularında Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BKNF) ekspresyonunu artırmak için bir *in vitro* yöntem olup, özelliği; söz konusu hücrelerin veya dokuların bir Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BKNF) doğal antisens transkriptini hedefleyen bir antisens oligonükleotit ile temas ettirmeyi; böylece Beyin kaynaklı nörotrofik faktörün (BKNF) ekspresyonunu arttırmayı içermesi, burada doğal antisens transkriptin DİZİ KİM. NO: 50-55'e sahip oligonükleotitlerin hariç tutulması koşulu ile DİZİ KİM. NO: 3-8'in herhangi birinde belirtilen nükleik asit dizisine sahip olmasıdır.

5. İstem 1 veya İstem 2'ye göre kullanım için antisens oligonükleotit veya İstem 3'e göre kullanım veya İstem 4'e göre bir yöntem olup, özelliği; burada antisens oligonükleotitinin tek iplikli olmasıdır.

6. İstem 1 veya İstem 2'ye göre kullanım için antisens oligonükleotit veya İstem 3'e göre kullanım veya İstem 4'e göre bir yöntem olup, özelliği; burada antisens oligonükleotitinin bir siRNA bileşiği olmasıdır.

7. İstemler 1, 2, 5 veya 6'dan herhangi birine göre kullanım için antisens oligonükleotit veya İstem 3, 5 veya 6'dan herhangi birine

göre kullanım veya İstem 4 ila 6'dan herhangi birine göre bir yöntem olup, özelliği; burada antisens oligonükleotitinin DİZİ KİM. NO: 16, 17, 19, 23, 24, 27, 29 ve 30'dan birini içeriyor olmasıdır.

5 **8.** İstemler 1, 2 veya 5 ila 7'den herhangi birine göre kullanım için antisens oligonükleotit veya İstem 3 veya 5 ila 7'den herhangi birine göre kullanım veya İstem 4 ila 7'den herhangi birine göre bir yöntem olup, özelliği; burada bir Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BKNF) ekspresyonunun en az %10 arttırılıyor olmasıdır.

10

9. İstem 1, 2 veya 5 ila 8'den herhangi birine göre kullanım için antisens oligonükleotit veya İstem 3 veya 5 ila 8'den herhangi birine göre kullanım veya İstem 4 ila 8'den herhangi birine göre bir yöntem olup, özelliği; burada antisens oligonükleotitin ayrıca
15 aşağıdakileri içeren bir veya daha fazla modifikasyon içeriyor olmasıdır:

a. aşağıdakilerden seçilen en az bir modifiye edilmiş, nükleositler arası bağ: bir fosforotioat, alkilfosfonat, fosforoditiyoat, alkilfosfonotiyoat, fosforamidat, karbamat,
20 karbonat, fosfat triester, asetamidat, karboksimetil ester ve bunların kombinasyonları;

b. aşağıdakilerden seçilen en az bir modifiye edilmiş nükleotid: bir peptit nükleik asit (PNA), bir kilitli nükleik asit (LNA), bir arabino-nükleik asit, bir analog, bir türev
25 ve bunların kombinasyonları; veya

c. aşağıdakilerden seçilen en az bir modifiye edilmiş şeker parçası: bir 2'-O-metoksietil modifiye edilmiş şeker parçası, bir 2'-metoksi modifiye edilmiş şeker parçası, bir 2'-floro modifiye edilmiş şeker parçası, bir 2'-O-alkil modifiye
30 edilmiş şeker parçası, bir bisiklik şeker parçası ve bunların kombinasyonları.

10. Bir antisens oligonükleotit olup, özelliği; istemler 1 ila 9'dan herhangi birinde tanımlanan bir antisens oligonükleotitin özelliklerine sahip olmasıdır.

11. İstem 10'a göre antisens oligonükleotiti olup, özelliği; burada antisens oligonükleotitin uzunluğunun 10 ila 30 nükleotid arasında olmasıdır.

12. İstem 10 veya İstem 11'e göre antisens oligonükleotit olup, özelliği; burada antisens oligonükleotitin, DİZİ KİM. NO: 3-8'den seçilen bir diziye sahip bir Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BKNF) doğal antisens transkriptinin bir tamamlayıcısı ile en az %90'lık dizi özdeşliğine sahip olmasıdır.

13. Farmasötik bir bileşim olup, özelliği; İstemler 10 ila 12'den herhangi birine göre en az bir antisens oligonükleotiti ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir eksipiyanı içeriyor olmasıdır.

TARİFNAME

BEYİN KAYNAKLI NÖROTROFİK FAKTÖR (BKNF) İLE İLİŞKİLİ HASTALIKLARIN DOĞAL ANTİSENS TRANSKRİPTİNİN BKNF'YE İNHİBİSYONU İLE MUAMELESİ

5 Tanım

BULUŞ ALANI

Açıklamanın örnekleri, BKNF ve ilgili moleküllerin ekspresyonunu ve/veya fonksiyonunu modüle eden
10 oligonükleotitleri içerir.

BULUŞUN ARKAPLANI

DNA-RNA ve RNA-RNA hibridizasyonu, DNA replikasyonu, transkripsiyonu ve translasyonunu içeren nükleik asit
15 fonksiyonunun birçok yönü için önemlidir. Hibridizasyon ayrıca, belirli bir nükleik asidi saptayan ya da ekspresyonunu değiştiren çeşitli teknolojiler için de merkezidir. Örneğin, antisens nükleotitleri, hedef RNA'ya hibridize ederek gen ekspresyonunu bozar, böylece RNA birleştirme, transkripsiyon,
20 translasyon ve replikasyonu ile etkileşime girer. Antisens DNA'sı, DNA-RNA hibritlerinin, çoğu hücre tipinde bulunan bir aktivite olan ribonükleaz H'nin sindirilmesi için bir substrat görevi gördüğü ilave bir özelliğe sahiptir. Antisens molekülleri, oligodeoksinükleotitler (ODN'ler) için olduğu gibi, hücreler
25 halinde verilebilir veya RNA molekülleri olarak endojen genlerden eksprese edilebilir. FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu) yakın zamanda antisensin terapötik fayda sağladığını gösteren bir antisens ilacı olan VITRAVENE™ 'yi (sitomegalovirüs retinitinin mualemesi için) onayladı.

30

WO 2010/093904 ve onun ABD muadili US/ 2011/ 0319475, burada belirtilen oligonükleotitler kullanılarak modülasyon için bir

hedef olarak BKNF'yi içerir. Doğal antisens hedefleri ve bu gibi hedefleri tamamlayan ve BKNF ile ilgili hastalıkların ve durumların mualemesi ile ilişkili araştırmalarda kullanılmak veya hastalığı mualeme etmek için BKNF protein ekspresyonunu 5 modüle eden yeni geliştirilmiş oligonükleotidlere yönelik sürekli bir gelişime ihtiyaç vardır.

BULUŞUN ÖZETİ

Mevcut buluş istemlerle tanımlanmıştır. Buluşu oluşturan 10 mevcut açıklamanın bu yönleri / örnekleri, istemler tarafından tanımlanmaktadır.

Bu Özet, açıklamanın niteliğini ve içeriğini kısaca belirtmek için açıklamanın bir özetini sunmak amacıyla sağlanmıştır. 15 İstemlerin kapsamını veya anlamını yorumlamak veya sınırlandırmak için kullanılmayacağı anlayışıyla sunulmuştur.

Bir örnekte, açıklama, doğal antisens transkriptinin eyleminin, doğal antisens transkriptin herhangi bir bölgesine hedeflenen 20 antisens oligonükleotit (ler) kullanılarak, memeli organizmalarında karşılık gelen BKNF sens geninin yukarı-regülasyonu ile sonuçlanarak inhibe edilmesine yönelik yöntemler sağlar. Burada, burada açıklanan doğal antisens transkriptlerin inhibisyonunun, mevcut açıklamanın kapsamında olduğu düşünülen 25 siRNA, ribozimler ve küçük moleküller ile gerçekleştirilebileceği de düşünülmektedir.

Bir örnek, in vivo veya in vitro olarak hasta hücreleri veya dokuları, söz konusu biyolojik sistemin veya söz konusu 30 hücrelerin veya dokuların, yaklaşık 5 ila yaklaşık 30 nükleotid uzunluğunda bir antisens oligonükleotit ile temas ettirilmesini içeren, burada adı geçen oligonükleotitin, DİZİ KİM NO: 3'ün 1 ila 1279 veya DİZİ KİM NO: 4'ün 1 ila 1478 veya DİZİ KİM NO: 5'in 1 ila 1437 veya DİZİ KİM NO: 6'nın 1 ila 2322 veya DİZİ KİM

NO: 7'nin 1 ila 2036 veya DİZİ KİM NO: 8'in 1 ila 2364 veya DİZİ KİM NO: 9'un 1 ila 3136 veya DİZİ KİM NO: 10'un 1 ila 906 veya DİZİ KİM NO: 11'in 1 ila 992 arasındaki nükleotitler arasında 5 ila 30 ardışık nükleotit içeren bir polinükleotitin ters komplementine en az %50 dizi özdeşliğine sahip olduğu, böylece, DİZİ KİM NO 50-55'e sahip oligonükleotitlerin hariç tutulmasıyla, söz konusu hasta hücreleri veya dokuları in vivo veya in vitro içeren söz konusu biyolojik sistemdeki BKNF polinükleotidinin fonksiyonunu ve/ veya ekspresyonunu modüle ettiği, bunlar dahil ancak bunlarla sınırlı olmayan biyolojik sistemlerde bir BKNF polinükleotidinin fonksiyonunu ve/ veya ekspresyonunu modüle etmek için bir yöntem sağlar.

Bir örnekte, yukarıda belirtilen bir oligonükleotit bir biyolojik sistemde mevcut olan BKNF polinükleotitlerinin doğal bir antisens dizisini, örneğin DİZİ KİM NO: 3 ila 11'de belirtilen nükleotitleri ve bunlara ait varyantları, alelleri, homologları, mutantları, türevleri, fragmanları ve tamamlayıcı dizileri hedefler. Bu tür antisens oligonükleotitlerin örnekleri DİZİ KİM NO: 12 ila 49 olarak verilmiştir.

Bir başka örnekte, açıklama, biyolojik bir sistemdeki bir BKNF polinükleotidinin fonksiyonunu veya ekspresyonunu modüle etmek için bahsedilen biyolojik sistemi, DİZİ KİM NO: 3'ün 1 ila 1279 veya DİZİ KİM NO: 4'ün 1 ila 1478 veya DİZİ KİM NO: 5'in 1 ila 1437 veya DİZİ KİM NO: 6'nın 1 ila 2322 veya DİZİ KİM NO: 7'nin 1 ila 2036 veya DİZİ KİM NO: 8'in 1 ila 2364 veya DİZİ KİM NO: 9'un 1 ila 3136 veya DİZİ KİM NO: 10'un 1 ila 906 veya DİZİ KİM NO: 11'in 1 ila 992 nükleotitleri arasından 5 ila 30 ardışık nükleotit içeren BKNF polinükleotidinin doğal bir antisens transkriptini hedefleyen en az bir antisens oligonükleotit ile temas ettirmeyi, böylece söz konusu biyolojik sistemdeki BKNF polinükleotidinin fonksiyonunu ve/ veya ekspresyonunu modüle etmeyi içeren bir yöntemi içerir.

Bir başka örnekte, açıklama, biyolojik bir sistemdeki bir BKNF polinükleotidinin fonksiyonunu veya ekspresyonunu modüle etmek için bahsedilen biyolojik sistemin DİZİ KİM NO: 3'ün 1 ila 1279 veya DİZİ KİM NO: 4'ün 1 ila 1478 veya DİZİ KİM NO: 5'in 1 ila 1437 veya DİZİ KİM NO: 6'nın 1 ila 2322 veya DİZİ KİM NO: 7'nin 1 ila 2036 veya DİZİ KİM NO: 8'in 1 ila 2364 veya DİZİ KİM NO: 9'un 1 ila 3136 veya DİZİ KİM NO: 10'un 1 ila 906 veya DİZİ KİM NO: 11'in 1 ila 992 nükleotitleri arasından 5 ila 30 ardışık nükleotit içeren BKNF polinükleotidinin bir doğal antisens transkriptinin bir bölgesini hedefleyen en az bir antisens oligonükleotit ile temas ettirilmesini, böylece söz konusu biyolojik sistemdeki BKNF polinükleotidinin fonksiyonunu ve/veya ekspresyonunu modüle etmeyi içeren bir yöntemi içerir.

Bir örnekte, açıklama, biyolojik bir sistemde DİZİ KİM NO:1 ve 2'ye sahip bir BKNF polinükleotidinin fonksiyonunu ve/veya ekspresyonunu arttırmak için bahsedilen biyolojik sistemin, DİZİ KİM NO: 3'ün 1 ila 1279 veya DİZİ KİM NO: 4'ün 1 ila 1478 veya DİZİ KİM NO: 5'in 1 ila 1437 veya DİZİ KİM NO: 6'nın 1 ila 2322 veya DİZİ KİM NO: 7'nin 1 ila 2036 veya DİZİ KİM NO: 8'in 1 ila 2364 veya DİZİ KİM NO: 9'un 1 ila 3136 veya DİZİ KİM NO: 10'un 1 ila 906 veya DİZİ KİM NO: 11'in 1 ila 992 nükleotitleri arasından 5 ila 30 ardışık nükleotit içeren, söz konusu BKNF polinükleotidinin doğal bir antisens transkriptini hedefleyen en az bir antisens oligonükleotit ile temas ettirilmesini, böylece söz konusu BKNF polinükleotidinin veya bunun ekspresyon ürününün fonksiyonunu ve/veya ekspresyonunu arttırmayı içeren bir yöntem içerir.

Bir başka örnekte, açıklama, biyolojik bir sistemde DİZİ KİM NO:1 ve 2'ye sahip bir BKNF polinükleotidinin fonksiyonunu ve/veya ekspresyonunu arttırmak için söz konusu biyolojik sistemin, söz konusu BKNF polinükleotidinin doğal bir antisens transkriptini hedefleyen en az bir antisens oligonükleotit ile temas ettirilmesini, böylece, doğal antisens transkriptlerinin

DİZİ KİM. NO: 3 ila 11'den seçildiği durumda, adı geçen BKNF polinükleotidinin veya bunun ekspresyon ürününün fonksiyonunu ve/ veya ekspresyonunu arttırmayı içeren bir yöntemi içerir.

- 5 Bir başka örnekte, açıklama, biyolojik bir sistemde DİZİ KİM. NO:1 ve 2'ye sahip bir BKNF polinükleotidinin fonksiyonunu ve/ veya ekspresyonunu arttırmak için söz konusu biyolojik sistemin, bahsedilen BKNF polinükleotitinin doğal bir antisens transkriptini hedefleyen en az bir antisens oligonükleotit ile
- 10 temas ettirilmesini, böylece, söz konusu BKNF polinükleotidinin veya bunun ekspresyon ürününün fonksiyonunu ve/ veya ekspresyonunu arttırmayı içeren bir yöntemi içerir, burada doğal antisens transkriptler DİZİ KİM. NO: 3 ila 11 arasından seçilir ve burada antisens oligonükleotitler DİZİ KİM. NO: 12 ila 49'un
- 15 en az birinden seçilir.

Bir örnekte, bir bileşim, sens ve/ veya antisens BKNF polinükleotitlerine bağlanan bir veya daha fazla antisens oligonükleotit içerir.

- 20 Bir örnekte, oligonükleotitler bir veya daha fazla modifiye edilmiş veya ornatılmış nükleotit içerir.

Bir örnekte, oligonükleotitler bir veya daha fazla modifiye edilmiş bağ içerir.

25

Yine başka bir örnekte, modifiye edilmiş nükleotitler, fosforotiyoat, metilfosfonat, peptit nükleik asitleri, 2'-O-metil, floro- veya karbon, metilen veya diğer kilitli nükleik asit (LNA) moleküllerini içeren modifiye bazları içerir.

- 30 Tercihen, modifiye edilmiş nükleotitler, α -L-LNA dahil olmak üzere kilitli nükleik asit molekülleridir.

Bir örnekte, oligonükleotitler bir hastaya deri altı, kas içi, damar içi veya periton içi olarak uygulanır.

Bir örnekte, oligonükleotitler bir farmasötik bileşimde uygulanır. Bir mualeme rejimi, antisens bileşiklerinin en az bir kez hastaya uygulanmasını içerir; bununla birlikte, bu mualeme bir süre boyunca çoklu dozlar içerecek şekilde modifiye edilebilir. Mualeme bir veya daha fazla başka tipte mualeme ile birleştirilebilir.

Bir örnekte, oligonükleotitler bir lipozom içinde kapsülленir veya bir taşıyıcı moleküle (örn., Kolesterol, TAT peptid) bağlanır.

Bir örnekte, mevcut açıklama, bir BKNF polinükleotidinin ekspresyonunu modüle etmek için doğal antisens transkriptlerini (NAT) hedefleyen oligonükleotitler olarak DİZİ KİM. NO: 50-55'in kullanımını içerir, burada adı geçen doğal antisens transkriptleri, DİZİ KİM. NO: 3 ila 11'den oluşan gruptan seçilir. Bir başka örnekte, mevcut açıklama, bir BKNF polinükleotidinin ekspresyonunu modüle etmek için doğal antisens transkriptlerini (NAT) hedefleyen oligonükleotitler olarak DİZİ KİM. NO: 50-55'in kullanımını içerir, burada adı geçen doğal antisens transkriptleri, DİZİ KİM. NO: 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 ve 11'den oluşan gruptan seçilir.

Diğer yönler *altta* açıklanmıştır.

ÇİZİMLERİN KISA AÇIKLAMASI

Şekil 1a-e, sens mRNA ve proteinin antisens aracılı düzenlemesini göstermektedir. Şekil 1a, BKNF-AS transkriptinin örtüşmeyen bölgelerine hedeflenen üç siRNA oligonükleotiti ile birkaç insan ve fare hücre hattının transfeksiyonundan sonra, BKNF transkriptinin demonte olmasının ve yukarı regülasyonunun meydana geldiğini göstermektedir. Şekil 1b, hem BKNF hem de BKNF-AS transkriptlerinin endojen ekspresyonunda BKNF-AS hedefli

siRNA'nın uygulanmasından sonra süreç çalışması verilerini göstermektedir. Veriler, BKNF-AS'nin, bir zaman dilimi boyunca aşağı regüle edildiğini ve daha sonra BKNF ekspresyonunun yukarı regüle edildiğini ve geri döndürülebilir olduğunu göstermektedir.

5 Şekil 1c, ELISA ile ölçülen BKNF proteininin, BKNF-AS transkriptini hedefleyen iki siRNA ile anlamlı bir şekilde arttığını, ancak karıştırılmış siRNA'lar veya hedeflenmeyen bir kontrol siRNA ile artmadığını göstermektedir. Şekil 1d, ELISA ve/veya western blotlama kullanılarak, çeşitli siRNA'ların uygulanmasını takiben BKNF'nin protein seviyelerini göstermektedir. Şekil 1e, hazırlık kontrolü ile karşılaştırıldığında oligonükleotitin (10^{-12} ila 10^{-6} M) artan konsantrasyonlarına kıyasla BKNF'nin kat değişim yüzdesini göstermektedir.

15 Şekil 2, Bknf yukarı regülasyonunun nöronal büyümeyi arttırdığını göstermektedir.

Şekil 3, Bknf-AS'nin in vivo Bknf mRNA ve proteinini regüle ettiğini göstermektedir.

20 Şekil 4, in vivo olarak Bknf-AS'nin bloke edilmesinin nöronal hayatta kalma ve proliferasyonda bir artışa neden olduğunu göstermektedir.

Şekil 5 BKNF mRNA yukarı regülasyonuna sebep olan BKNF-AS demontesini göstermektedir.

25 Şekil 6, Bknf ekspresyonunun Posttranskripsiyonel regülasyonunu göstermektedir.

Şekil 7, insan BKNF-AS transkriptinin hBKNFAntagoNAT ile inhibisyonunu göstermektedir.

Şekil 8, AntagoNATler tarafından N2a hücrelerindeki fare Bknf-AS transkripsiyonunun inhibisyonunu göstermektedir.

30 Şekil 9, BKNF-AS demontesinin, ne TrkB seviyesini ne de BKNF komşu genlerin (Let7C ve KIF18A) her iki yönde de değiştirmedeğini göstermektedir: LIN7C ve KIF18A, sırasıyla BKNF'nin 3' aşağı akış yönünde ve 5' yukarı akış yönünde bulunan genlerdir.

Dizi Listesi Tanımı: DİZİ KİM. NO: 1: Homo sapiens Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BKNF), transkript varyantı 3, mRNA. (NCBI Erişim No.: NM_170735); DİZİ KİM. NO: 2: Ev Faresi beyin kaynaklı nörotrofik faktör (Bknf), transkript varyantı 1, mRNA
5 (NCBI Erişim No .: NM_007540); DİZİ KİM. NO: 3: Doğal BKNF antisens dizisi (transkript varyantı BT1A; NR_033313.1); DİZİ KİM. NO: 4: Doğal BKNF antisens dizisi (transkript varyantı BT2A; NR_033314.1); DİZİ KİM. NO: 5: Doğal BKNF antisens dizisi (transkript varyantı BT1B; NR_033315.1); DİZİ KİM. NO: 6: Doğal
10 BKNF antisens dizisi (transkript varyantı BT2B; NR_002832.2); DİZİ KİM. NO: 7: Doğal BKNF antisens dizisi (transkript varyantı BT1C; NR_033312.1); DİZİ KİM. NO: 8: Doğal BKNF antisens dizisi (BKNF-AS varyantı); DİZİ KİM. NO: 9: Doğal BKNF antisens dizisi; DİZİ KİM. NO: 10: Fare doğal BKNF antisens dizisi (Fare BKNF-AS
15 varyantı 1); DİZİ KİM. NO: 11: Fare doğal BKNF antisens dizisi (Fare BKNF-AS varyantı 2); DİZİ KİM. NO: 12 ila 55: Antisens oligonükleotitler; DİZİ KİM. NO: 56 ila 59: sırasıyla 12 ila 15 antisens oligonükleotitlerinin ters tamamlayıcısı; DİZİ KİM. NO: 60 ila 64: sırasıyla antisens oligonükleotitleri 42 ila 46'nın
20 ters tamamlayıcısı; DİZİ KİM. NO: 65 ve 66: Deney dizileri. LNA (2'-O, 4'-C metilen kilitli nükleik asit): + A* veya + T* veya + C* veya + G*; 2'OM (2'-O-metil): mU* veya mA* veya mC* veya mG*; PS (fosfotiyolat): T* veya A* veya G* veya c*; RNA: rU veya rA veya rG veya rC.

25 BULUŞUN AYRINTILI AÇIKLAMASI

Açıklamanın çeşitli yönleri, örnekleme için örnek uygulamalara referansla aşağıda tarif edilmiştir. Açıklamanın tam olarak anlaşılmasını sağlamak için çok sayıda belirli detayın,
30 ilişkinin ve yöntemin ortaya konulduğu anlaşılmalıdır. Bununla birlikte, ilgili teknolojiye sıradan uzmanlığa sahip biri, açıklamanın, bir veya daha fazla spesifik ayrıntı olmadan veya başka yöntemlerle uygulanabileceğini kolayca anlayacaktır. Mevcut açıklama, bazı eylemlerin farklı düzenlerde ve/veya

diğer eylemlerle veya olaylarla birlikte gerçekleşebileceğinden, eylemlerin veya olayların sıralanmasıyla sınırlı değildir. Ayrıca, gösterilen tüm eylemlerin veya olayların, mevcut açıklamaya göre bir metodolojiyi uygulaması gerekmez.

5

Burada açıklanan tüm genler, gen isimleri ve gen ürünleri, burada açıklanan bileşimlerin ve yöntemlerin geçerli olduğu herhangi bir türden homologlara karşılık gelmektedir. Dolayısıyla, terimler, insanlar ve farelerden gelen genleri ve
10 gen ürünlerini içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Belirli bir türden bir gen veya gen ürünü açıklandığında, bu açıklamanın sadece örnek olması amaçlanmıştır ve görüldüğü bağlam açıkça belirtmedikçe bir sınırlama olarak yorumlanmamalıdır. Bu nedenle, örneğin, bazı durumlarda memeli nükleik asit ve amino asit
15 dizileri ile ilgili olan burada açıklanan genlerin diğer memeliler, balıklar, amfibiler, sürüngenler ve kuşlar dahil ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere diğer hayvanlardan homolog ve/veya ortolog genlerini ve gen ürünlerini kapsaması amaçlanmıştır. Bir örnekte, genler veya nükleik asit dizileri
20 insandır.

Tanımlar

Burada kullanılan terminoloji sadece belirli örnekleri tanımlamak içindir ve açıklamanın sınırlandırılması amaçlanmamıştır. Burada kullanıldığı şekliyle, "bir" ve "bu"
25 tekil formları, bağlam açıkça aksini göstermedikçe çoğul formları da kapsamaktadır. Ayrıca, "dahil", "içerir", "sahip", "vardır", "ile" veya bunların varyasyonlarının kapsamı detaylı tarif ve/veya istemlerde kullanılır, bu tür terimlerin "içeren" terimine benzer bir şekilde dahil edici olması amaçlanır.

30

"Yaklaşık" veya "takribi" terimi, teknikte sıradan deneyime sahip bir kişinin belirlediği belirli bir değer için kabul edilebilir bir hata aralığı anlamına gelir; bu, kısmen değer

nasıl ölçüldüğüne veya belirlendiğine, yani ölçüm sisteminin kısıtlamalarına bağlı olacaktır. Örneğin, "yaklaşık" ifadesi, teknikteki uygulamaya göre 1 veya 1'den daha fazla standart sapma dahilinde olabilir. Alternatif olarak, "yaklaşık", % 20'ye kadar, tercihen %10'a kadar, daha tercihen % 5'e kadar ve daha tercihen verilen değerin yine %1'ine kadar bir değer anlamına gelebilmektedir. Alternatif olarak, özellikle biyolojik sistemlere veya işlemlere ilişkin olarak, terim, bir değerin, tercihen 5 kat ve daha tercihen 2 katlık bir büyüklük sırası dahilinde anlamına gelebilir. Uygulamada ve istemlerde belirli değerlerin tarif edildiği yerlerde, aksi belirtilmedikçe, belirli bir değer için kabul edilebilir bir hata aralığında "yaklaşık" anlamının kabul edilmesi gerekir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "mRNA" terimi, hedeflenmiş bir genin bilinen mRNA transkript(ler)i ve izah edilebilen başka transkriptler anlamına gelir.

"Antisens oligonükleotitleri" veya "antisens bileşiği" ile, başka bir RNA'ya veya DNA'ya (hedef RNA, DNA) bağlanan bir RNA veya DNA molekülü kastedilmektedir. Örneğin, bir RNA oligonükleotiti ise, RNA-RNA etkileşimleri vasıtasıyla başka bir RNA hedefine bağlanır ve hedef RNA'nın aktivitesini değiştirir. Bir antisens oligonükleotit, belirli bir polinükleotitin ekspresyonunu ve/veya fonksiyonunu yukarı veya aşağı regüle edebilir. Tanım, terapötik, tanısal veya başka bir bakış açısından faydalı olan herhangi bir yabancı RNA veya DNA molekülünü kapsamaktadır. Bu tür moleküller, örneğin, antisens RNA veya DNA molekülleri, interferans RNA (RNAi), mikro RNA, sahte RNA molekülleri, siRNA, enzimatik RNA, terapötik düzenleme RNA ve agonist ve antagonist RNA, antisens oligomerik bileşikler, antisens oligonükleotitler, harici kılavuz dizisi (EGS) oligonükleotitleri, hedef nükleik asidin en azından bir kısmına hibritlenen alternatif ekleyiciler, primerler, problemler ve diğer oligomerik bileşikler kapsar. Bu şekilde, bu bileşikler, tek

iplikli, çift iplikli, kısmen tek iplikli veya dairesel oligomerik bileşikler formunda eklenebilir.

Bu açıklama bağlamında, "oligonükleotit" terimi, bir oligomer
5 veya ribonükleik asit (RNA) veya deoksiribonükleik asit (DNA)
veya bunların mimetiklerinin polimerini ifade eder.
"Oligonükleotit" terimi ayrıca, deoksiribonükleositler,
ribonükleositler, bunların ornatılmış ve alfa-anomerik formları,
peptit nükleik asitleri (PNA), kilitli nükleik asitleri (LNA),
10 fosforotioat, metilfosfonat ve benzerleri dahil olmak üzere
doğal ve/veya modifiye edilmiş monomerlerin veya bağların
doğrusal veya dairesel oligomerlerini de içerir.
Oligonükleotitler, bir hedef polinükleotide spesifik olarak,
Watson-Crick tipi baz eşleştirmesi, Hoogsteen veya ters
15 Hoogsteen baz eşleştirmesi türleri veya benzerleri gibi düzenli
bir monomer-monomer etkileşimi modeli ile bağlanabilir.

Oligonükleotit "kimerik" olabilir, yani farklı bölgelerden
oluşur. Bu açıklama bağlamında "kimerik" bileşikler, iki veya
20 daha fazla kimyasal bölge, örneğin DNA bölgesi (bölgeleri), RNA
bölgesi (bölgeleri), PNA bölgesi (bölgeleri) vb. içeren
oligonükleotitlerdir. Her kimyasal bölge, bir oligonükleotit
bileşiği durumunda en az bir monomer biriminden, yani bir
nükleotitten oluşur. Bu oligonükleotitler tipik olarak,
25 oligonükleotitin bir ya da daha fazla arzu edilen özelliği
sergilemesi için modifiye edildiği en az bir bölge içerir.
Oligonükleotitin arzu edilen özellikleri arasında, ancak sınırlı
olmamakla birlikte, nükleaz bozunumuna karşı arttırılmış direnç,
arttırılmış hücre alımı ve/veya hedef nükleik asit için
30 arttırılmış bağlanma afinitesi bulunur. Oligonükleotitin farklı
bölgeleri bu nedenle farklı özelliklere sahip olabilir. Mevcut
açıklamanın kimerik oligonükleotitleri, yukarıda tarif edildiği
gibi iki veya daha fazla oligonükleotit, modifiye edilmiş
oligonükleotit, oligonükleosit ve/veya oligonükleotit
35 analoglarının karışık yapıları olarak oluşturulabilir.

Oligonükleotit "kayıt" a bağlanabilen bölgelerden, yani monomerler doğal DNA'da olduğu gibi ardışık olarak bağlandığında veya aralayıcılarla bağlandığında oluşturulabilir.

5 Aralayıcıların bölgeler arasında bir kovalent "köprü" oluşturması ve tercih edilen durumlarda yaklaşık 100 karbon atomunu aşmayan bir uzunluğa sahip olması amaçlanmıştır. Aralayıcılar farklı işlevler taşıyabilir, örneğin, pozitif veya negatif yüke sahip olması, özel nükleik asit bağlama
10 özelliklerini (ara parçalar, oluk bağlayıcılar, toksinler, flüoroforlar vb.) taşıması, lipofilik olması, örneğin alfa-helisleri indükleyen alanin içeren peptidler gibi özel ikincil yapıları indüklüyor olması gibi.

15 Burada kullanılan "BKNF" ve "Beyin kaynaklı nörotrofik faktör", tüm aile üyelerini, mutantları, alelleri, fragmanları, türleri, kodlayan ve kodlayıcı olmayan dizileri, sens ve antisens polinükleotit ipliklerini, vb. içerir.

20 Burada kullanılan "Beyin kaynaklı nörotrofik faktör", "Beyin-kaynaklı nörotrofik faktör" ve BKNF sözcükleri, literatürde aynı kabul edilir ve mevcut başvuruda birbirinin yerine kullanılır.

Burada kullanılan "oligonükleotit spesifik" veya "hedefleyen
25 oligonükleotit" terimi, (i) hedeflenen genin bir kısmı ile stabil bir kompleks oluşturabilir veya (ii) hedeflenen genin bir mRNA transkriptinin bir kısmı ile stabil bir dupleks oluşturabilir bir diziye sahip olan bir oligonükleotide karşılık gelir. Komplekslerin ve duplekslerin stabilitesi, teorik
30 hesaplamalar ve/veya in vitro deneylerle belirlenebilir. Hibridizasyon komplekslerinin ve duplekslerinin stabilitesini belirlemek için Örnek deneyler, aşağıdaki Örneklerde açıklanmaktadır.

Burada kullanıldığı şekliyle "hedef nükleik asit" terimi, bu
35 DNA'dan kopyalanan DNA, RNA (premRNA ve mRNA'yı içerir) ve ayrıca

bu tür RNA, kodlayan, kodlayıcı olmayan diziler, sens veya antisens polinükleotidlerden türetilen cDNA'yı kapsar. Bir oligomerik bileşiğin hedef nükleik asit ile spesifik hibridizasyonu, nükleik asidin normal fonksiyonu ile etkileşime girer. Bir hedef nükleik asidin fonksiyonlarının özellikle buna hibritlenen bu bileşimlerle bu modülasyonu, genellikle "antisens" olarak adlandırılır. Müdahale edilecek DNA'nın işlevleri, örneğin, replikasyon ve transkripsiyonu içerir. Müdahale edilecek RNA'nın fonksiyonları, örneğin, RNA'nın protein translasyonu, RNA'dan proteinin translasyonu, bir veya daha fazla mRNA türü üretmek için RNA'nın eklenmesi ve RNA'ya bağlanabilen veya RNA tarafından kolaylaştırılabilen katalitik aktivite gibi tüm son derece önemli fonksiyonları içerir. Hedef nükleik asit fonksiyonu ile böyle bir etkileşimin genel etkisi, kodlanmış bir ürünün veya oligonükleotitlerin ekspresyonunun modülasyonudur.

RNA interferansı "RNAi", "hedef" nükleik asit dizilerine, diziye özgü homolojiye sahip çift iplikli RNA (dsRNA) molekülleri tarafından aracılık edilir. Mevcut açıklamanın belirli örneklerinde, araçlar, 5-25 nükleotit "küçük interferanslı" RNA dupleksleridir (siRNA'lar). siRNA'lar, dsRNA'nın Dicer olarak bilinen bir RNaz enzimi ile işlenmesinden elde edilir. siRNA dupleks ürünleri, RISC (RNA Uyarımlı Susturucu Kompleks) olarak adlandırılan bir multi-protein siRNA kompleksine eklenir. Herhangi bir özel teori ile sınırlanmak istenmemekle birlikte, bir RISC'nin, bir hedef nükleik aside (uygun şekilde mRNA) yönlendirildiğine inanılmaktadır, burada, siRNA duplexi, bir katalitik tarzda bölünmeye aracılık etmek için diziye özel bir şekilde etkileşmektedir. Mevcut açıklamaya uygun olarak kullanılabilen küçük interferanslı RNA'lar, teknikte iyi bilinen ve sıradan kabiliyeti olan zanaatkara aşına olacak olan prosedürlere göre sentezlenebilir ve kullanılabilir. Mevcut açıklamanın yöntemlerinde kullanım için küçük interferanslı RNA'lar uygun olarak yaklaşık 1 ila yaklaşık 50

nükleotit (nt) içerir. Sınırlayıcı olmayan aşamaların örneklerinde, siRNA'lar yaklaşık 5 ila yaklaşık 40 nt, yaklaşık 5 ila yaklaşık 30 nt, yaklaşık 10 ila yaklaşık 30 nt, yaklaşık 15 ila yaklaşık 25 nt veya yaklaşık 20 ila 25 nükleotit içerebilir.

Uygun oligonükleotitlerin seçimi, nükleik asit dizilerini otomatik olarak hizalayan ve kimlik veya homoloji bölgelerini gösteren bilgisayar programları kullanılarak kolaylaştırılır. Bu tür programlar, örneğin GenBank gibi veritabanlarını araştırmak veya PCR ürünlerini sıralamak suretiyle elde edilen nükleik asit dizilerini karşılaştırmak için kullanılır. Bir dizi türden nükleik asit dizilerinin karşılaştırılması, türler arasında uygun bir kimlik derecesi sergileyen nükleik asit dizilerinin seçilmesine izin verir. Dizilemeyen genler durumunda, hedef türler ve diğer türlerdeki genler arasındaki özdeşlik derecesinin belirlenmesini sağlamak için Southern blot yapılır. Teknikte iyi bilindiği gibi, değişik derecelerdeki sıklıkta Southern blot yöntemleri gerçekleştirerek, yaklaşık bir kimlik ölçüsü elde etmek mümkündür. Bu prosedürler, kontrol edilecek bir denekte hedef nükleik asit dizilerine yüksek bir tamamlayıcılık derecesi ve diğer türlerde karşılık gelen nükleik asit dizilerine daha düşük bir tamamlayıcılık derecesi sergileyen oligonükleotitlerin seçilmesine izin verir. Teknikte uzman bir kişi, mevcut açıklamada kullanım için uygun gen bölgelerinin seçilmesinde kayda değer bir genişlik olduğunu fark edecektir.

"Enzimatik RNA" ile enzimatik aktiviteye sahip bir RNA molekülü kastedilmektedir. (Cech, (1988) "J. American, Med. Assoc." 260, 3030-3035). Enzimatik nükleik asitler (ribozimler), bir hedef RNA'ya ilk bağlanma ile etki eder. Bu bağlanma, hedef RNA'yı parçalamak üzere hareket eden molekülün bir enzimatik kısmına yakın bir yerde tutulan bir enzimatik nükleik asidin hedef bağlama kısmı boyunca gerçekleşir. Bu nedenle, enzimatik nükleik

asit, ilk olarak, bir hedef RNA'yı tanır ve baz eşleme yoluyla bağlanır ve bir kez doğru yere bağlandığında, hedef RNA'yı kesmek için enzimatik olarak hareket eder.

5 "Sahte RNA", bir ligand için doğal bağlanma alanını taklit eden bir RNA molekülü anlamına gelir. Bu nedenle, sahte RNA, belirli bir ligandın bağlanması için doğal bağlama hedefi ile rekabet eder. Örneğin, HIV trans-aktivasyon tepkisinin (TAR) RNA'nın aşırı ekspresyonunun "sahte" olarak etki gösterebildiği
10 ve HIV tat proteinini etkili bir şekilde bağlayabildiği ve böylece HIV RNA'sında kodlanan TAR dizilerine bağlanmasının önlendiği gösterilmiştir. Bunun belirli bir örnek olması gerekir. Teknikte uzman kişiler bunun bir örnek olduğunu ve diğer aşamaların teknikte genel olarak bilinen teknikleri kullanarak
15 kolaylıkla üretilebildiğini fark edeceklerdir.

Burada kullanıldığı şekliyle "monomerler" terimi tipik olarak fosfodiester bağları veya bunların analogları ile bağlanan monomerlerin, birkaç monomerik üniteden, örneğin yaklaşık 3-4
20 ila yaklaşık yüzlerce monomer birimden büyüklükte değişen oligonükleotitleri oluşturduğunu gösterir. Fosfodiester bağlantılarının analogları aşağıdakileri içerir: aşağıda daha ayrıntılı olarak tarif edildiği üzere fosforotioat, fosforoditioat, metilfosfinatlar, fosforoselenoat, fosforamidat
25 ve benzerleri.

"Nükleotid" terimi doğal olarak meydana gelen nükleotitlerin yanı sıra doğal olmayan yollarla meydana gelen nükleotitleri de kapsar. Daha önce "doğal olmayan yollarla meydana gelen" olarak
30 kabul edilen çeşitli nükleotitlerin, daha sonra doğada bulunmuş olduğu teknikte uzman kişilerce açıkça anlaşılmalıdır. Dolayısıyla "nükleotitler" sadece bilinen purin ve pirimidin heterosiklikleri içeren molekülleri değil, aynı zamanda heterosiklik analogları ve tautomerlerini de içerir. Diğer
35 nükleotit tiplerinin tanımlayıcı örnekleri, adenin, guanin,

timin, sitozin, urasil, pürin, ksantin, diaminopurin, 8-okso-N6-metiladenin, 7-deazaxanthine, 7-deazaguanin, N4, N4-etanositosin, N6, N6-etano-2,6-diaminopurin, 5-metilsitozin, 5-(C3-C6) -alkinilsitozin, 5-florourasil, 5-bromourasil, psödoizositosin, 2-hidroksi-5-metil-4-triazolopiridin, izositozin, izoguanin, inosin ve Benner ve arkadaşları, ABD Patenti No. 5,432,272'de tarif edilen "doğal olmayan yollarla meydana gelen" nükleotitler içeren nükleotitlerdir. "Nükleotit" terimi, bu örneklerin her birini ve bunların analoglarını ve tautomerlerini kapsayacak şekilde tasarlanmıştır. Özellikle ilginç nükleotidler, insanlarda terapötik ve diagnostik uygulama ile ilişkili olarak doğal olarak oluşan nükleotitler olarak kabul edilen adenin, guanin, timin, sitozin ve urasil içerenlerdir. Nükleotidler, örneğin Kornberg ve Baker, DNA Replikasyonu, 2. Baskıda (Freeman, San Francisco, 1992) tarif edildiği gibi doğal 2'-deoksi ve 2'-hidroksil şekerlerin yanı sıra bunların analoglarını içerir.

Nükleotitlere referansla "analoglar", modifiye edilmiş baz kısımlarına ve/veya modifiye edilmiş şeker kısımlarına sahip sentetik nükleotitleri içerir. (bkz. Scheit, "Nucleotide Analogs", John Wiley, New York, 1980; Freier & Altmann, (1997) "Nucl. Asit. Res.", 25 (22), 4429-4443, Toulmé, J.J., (2001) "Nature Biotechnology" 19: 17-18; Manoharan M., (1999) "Biochemica ve Biophysica Acta" 1489: 117-139; Freier SM, (1997) "Nucleic Acid Research", 25: 4429-4443, Uhlman, E., (2000) "Drug Discovery & Development", 3: 203-213, Herdewin P., (2000) "Antisense & Nucleic Acid Drug Dev.", 10: 297-310 ile genel olarak tanımlanmıştır); 2'-O, 3'-C-bağlı [3.2.0] bisikloarabinonükleositler. Bu gibi analoglar, bağlanma özelliklerini, örneğin dupleks veya tripleks stabilitesi, spesifikliği veya benzerlerini geliştirmek için tasarlanan sentetik nükleotidler içerir.

Burada kullanıldığı şekliyle "hibridizasyon", esasen tamamlayıcı oligomerik bileşiklerin çiftlerinin eşleşmesi

anlamına gelir. Bir çiftleme mekanizması, oligomerik bileşiklerin ipliklerinin tamamlayıcı nükleosidi veya nükleotit bazları (nükleotitleri) arasında Watson-Crick, Hoogsteen veya ters Hoogsteen hidrojen bağı olabilen hidrojen bağlanmasını içerir. Örneğin, adenin ve timin, hidrojen bağlarının oluşturulmasında eşleşen tamamlayıcı nükleotidlerdir. Hibridizasyon, farklı şartlar altında gerçekleşebilir.

Bileşiğin hedef nükleik aside bağlanması, bir fonksiyon ve/veya aktivitenin modülasyonuna neden olmak için hedef nükleik asidin normal fonksiyonu ile etkileşime girdiğinde, bir antisens bileşiği "spesifik olarak hibritlenebilir" dir ve spesifik bağlamanın arzu edildiği koşullar altında, yani in vivo analizler veya terapötik mualeme durumunda fizyolojik koşullar altında ve in vitro deneyler durumunda analizlerin yapıldığı koşullar altında, hedef olmayan nükleik asit dizilerine antisens bileşiğin spesifik olmayan bağlanmasını önlemek için yeterli bir tamamlayıcılık derecesi vardır.

Burada kullanıldığı şekliyle "sıkı hibridizasyon koşulları" veya "sıkı koşullar" ifadesi, açıklamanın bir bileşiğinin hedef dizisine hibritleşeceği, ancak diğer dizilerin minimum sayıda olduğu koşulları ifade eder. Sıkı koşullar diziye bağımlıdır ve farklı durumlarda farklı olacaktır ve bu açıklama bağlamında, oligomerik bileşiklerin bir hedef diziye hibridize olduğu "sıkı koşullar", oligomerik bileşiklerin doğası ve bileşimi ve araştırıldıkları analizlerle belirlenir. Genel olarak, sıkı hibridizasyon koşulları, Na⁺ veya K⁺ (yani, düşük iyonik mukavemet) gibi inorganik katyonlarla, 20 °C - 25 °C'den yüksek sıcaklıklarda, T_m'nin altında oligomerik bileşik: hedef dizi kompleksi ve formamid, dimetilformamid, dimetil sülfoksit veya deterjan sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi denatüferlerin varlığında düşük konsantrasyonlarda (<0.15M) tuzlar içerir. Örneğin, hibridizasyon oranı her %1 formamid için %1.1 azalır. Yüksek sıklıkta bir hibridizasyon koşulunun bir örneği, 30

dakika boyunca 60 °C'de 0.1X sodyum klorür-sodyum sitrat tamponu (SSC)/ %0.1 (ağ/ hac) SDS'dir.

Burada kullanılan "tamamlayıcı" kelimesi, bir veya iki
5 oligomerik iplik üzerindeki iki nükleotid arasındaki kesin eşleşme kapasitesini ifade eder. Örneğin, bir antisens bileşiğinin belirli bir konumundaki bir nükleobaz, bir hedef nükleik asidin belirli bir pozisyonunda bir nükleobaz ile hidrojen bağlanmasına imkan verirse, burada bahsedilen hedef
10 nükleik asit bir DNA, RNA veya oligonükleotit molekülüdür, bu durumda oligonükleotit ve hedef nükleik asit arasındaki hidrojen bağının konumu tamamlayıcı bir konum olarak kabul edilir. Oligomerik bileşik ve diğer DNA, RNA veya oligonükleotit molekülü, her molekülde yeterli sayıda tamamlayıcı konumun
15 birbiriyle hidrojen bağlanabilen nükleotitler tarafından tutulduğu durumda birbirini tamamlar. Dolayısıyla "spesifik olarak hibritlenebilir" ve "tamamlayıcı" terimleri, oligomerik bileşik ve bir hedef nükleik asit arasında stabil ve spesifik bağlanmanın meydana gelmesi için yeterli sayıda nükleotit
20 üzerinde yeterli eşleşme veya tamamlayıcılık derecesini belirtmek için kullanılan terimlerdir.

Teknikte, bir oligomerik bileşiğin dizisinin, hedef nükleik asidinin spesifik olarak hibridize olabilmesi için %100
25 tamamlayıcı olması gerekmediği anlaşılmaktadır. Ayrıca, bir oligonükleotit, bir veya daha fazla bölüm üzerinde melezleşebilir, böylece araya giren veya bitişik bölümler, hibridizasyon olayında (örn., bir ilmek yapısı, uyumsuzluk veya firkete yapısı) yer almaz. Mevcut açıklamanın oligomerik
30 bileşikleri, hedeflendikleri hedef nükleik asit dizisi içindeki bir hedef bölgeye en az yaklaşık %70'lik, veya en az yaklaşık %75'lik veya en az yaklaşık %80'lik veya en az yaklaşık %85'lik veya en az yaklaşık %90'lık veya en az yaklaşık %95'lik veya en az yaklaşık %99'luk dizi
35 tamamlayıcılığı içerir. Örneğin, antisens bileşiğin 20

nükleotitinden 18'inin bir hedef bölgeye tamamlayıcı olduğu ve dolayısıyla spesifik olarak hibridize olacağı bir antisens bileşik, yüzde 90 tamamlayıcılık temsil edecektir. Bu örnekte, diğer tamamlayıcı olmayan nükleotitler kümelenebilir veya tamamlayıcı nükleotitlerle karıştırılabilir ve birbirleriyle veya tamamlayıcı nükleotitlerle bitişik olmaları gerekmez. Bu durumda, hedef nükleik asit ile komple tamamlayıcılık gösteren iki bölge ile çevrelenen 4 (dört) tamamlayıcı olmayan nükleotide sahip 18 nükleotit uzunluğundaki bir antisens bileşik, hedef nükleik asit ile toplam %77,8 tamamlayıcılığa sahip olacaktır ve mevcut açıklamanın kapsamı dahilinde bu oran düşecektir. Bir hedef nükleik asidin bir bölgesi ile bir antisens bileşiğinin tamamlayıcılık yüzdesi, teknikte bilinen BLAST programları (temel yerel hizalama arama araçları) ve PowerBLAST programları kullanılarak rutin olarak belirlenebilir. Homoloji, dizi özdeşliği veya tamamlayıcılık yüzdeleri, örneğin Gap programı (Wisconsin Dizi Analiz Paketi, "Unix için Versiyon 8, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.") vasıtasıyla Smith ve Waterman'ın algoritmasının ("Adv. Appl. Math.", (1981), 2 482-489) kullanıldığı varsayılan ayarlar kullanılarak belirlenebilir.

Burada kullanılan "Termal Erime Noktası (T_m)" terimi, tanımlanmış iyonik kuvvet, pH ve nükleik asit konsantrasyonu altında, hedef diziye tamamlayıcı oligonükleotitlerin % 50'sinin dengedeki hedef diziye hibritlendiği sıcaklığı belirtir. Tipik olarak, sıkı koşullar, tuz konsantrasyonunun pH 7.0 ila 8.3'te en az yaklaşık 0.01 ila 1.0 M Na iyon konsantrasyonu (veya diğer tuzlar) olduğu ve kısa oligonükleotitler (örn., 10 ila 50 nükleotit) için sıcaklığın en az yaklaşık 30 °C olduğu koşullar olacaktır. Sıkı koşullar, formamid gibi destabilize edici ajanların eklenmesiyle de elde edilebilir.

Burada kullanıldığı şekliyle "modülasyon", bir genin

ekspresyonunda bir artış (uyarılma) veya bir azalma (inhibisyon) anlamına gelir.

Bir polinükleotid dizisi bağlamında kullanıldığında "varyant" terimi, yabani tip bir gen ile ilgili bir polinükleotid dizisini kapsayabilir. Bu tanım, örneğin, "alelik", "ekleme", "tür" veya "polimorfik" varyantları da içerebilir. Bir ekleme varyantı, bir referans molekülü ile önemli bir özdeşliğe sahip olabilir, ancak genellikle mRNA işlemi sırasında eksonların alternatif eklenmesine bağlı olarak daha büyük veya daha az sayıda polinükleotide sahip olacaktır. Karşılık gelen polipeptid ek fonksiyonel alanlara veya alansızlığa sahip olabilir. Tür varyantları, bir türden diğerine değişen polinükleotid dizileridir. Açıklamadaki özel kullanımın özelliği, yabani tip gen ürünlerinin varyantlarıdır. Varyantlar, nükleik asit dizisindeki en az bir mutasyondan kaynaklanabilir ve değiştirilmiş mRNA'lara veya yapısı veya işlevi değiştirilmiş veya değiştirilmemiş olabilecek polipeptitlere neden olabilir. Herhangi bir doğal veya rekombinant genin sıfır, bir veya birçok alelik formu olabilir. Varyantlara yol açan yaygın mutasyon değişiklikleri genellikle doğal silinmelere, eklemelere veya nükleotidlerin ornatıklarına atfedilir. Bu tip değişikliklerin her biri, tek başına veya diğerleriyle kombinasyon halinde, belirli bir dizide bir veya daha fazla kez meydana gelebilir.

25

Elde edilen polipeptidler genel olarak birbirlerine göre belirgin amino asit kimliğine sahip olacaktır. Bir polimorfik varyant, belirli bir türün bireyleri arasındaki belirli bir genin polinükleotit dizisindeki bir varyasyondur. Polimorfik varyantlar ayrıca "tek nükleotid polimorfizmlerini" (SNPler) veya polinükleotit dizisinin bir baz ile değiştiği tek baz mutasyonlarını da kapsayabilir. SNP'lerin mevcudiyeti, örneğin, bir hastalık durumu için bir eğilime sahip olan, yani direnç karşısında duyarlılık gösteren belirli bir popülasyonun göstergesi olabilir.

35

Türev polinükleotidler, kimyasal modifikasyona tabi tutulan nükleik asitleri, örneğin hidrojenin bir alkil, asil veya amino grubu ile yer değiştirmesini içerir. Türevler, örn., türev
5 oligonükleotitler, değiştirilmemiş şeker kısımları veya inter-
şeker bağları gibi doğal olmayan yollarla meydana gelen
kısımları içerebilir. Bunlar arasında örnek, fosforotioat ve
teknikte bilinen diğer kükürt içeren türlerdir. Türev nükleik
asitler, radyonükleotitler, enzimler, floresan maddeler,
10 kemilüminesan maddeler, kromojenik maddeler, substratlar,
kofaktörler, inhibitörler, manyetik parçacıklar ve benzerleri
dahil olmak üzere imler de içerebilir.

Bir "türev" polipeptit veya peptit, örneğin glikosilasyon,
15 pegilasyon, fosforilasyon, sülfasyon, indirgeme/ alkilasyon,
asilasyon, kimyasal bağlanma veya hafif formalin mualemesi ile
modifiye edilen bir polipeptid veya peptiddir. Bir türev ayrıca,
bir radyoizotop, floresan ve enzim imi dahil, ancak bunlarla
sınırlı olmamak üzere, doğrudan veya dolaylı olarak
20 algılanabilir bir im içerecek şekilde modifiye edilebilir.

Burada kullanıldığı şekliyle "hayvan" veya "hasta" terimi,
örneğin, insanlar, koyunlar, Kanada geyikleri, geyikler,
katırlar, vizonlar, memeliler, maymunlar, atlar, sığırlar,
25 domuzlar, keçiler, köpekler, kediler, sıçanlar, fareler, kuşlar,
tavuk, sürüngenler, balık, böcekler ve araknidler.

"Memeli", tipik olarak tıbbi bakım altındaki (örn., insanlar
ve evcil hayvanlar) sıcakkanlı memelileri kapsar. Örnekler
30 yalnızca insanın yanı sıra kedigil, köpek, at, sığır ve insanı
içerir.

"Mualeme etme" veya "mualeme", bir memelide bir hastalık
durumunun mualemesini kapsar ve şunları içerir: (a) bir memelide,
35 özellikle, bu tür bir memelinin hastalık durumuna yatkın olduğu,

ancak henüz teşhis edilmediği durumda hastalık-durumunun meydana gelmesini önlemek; (b) hastalık-durumunu engellemek, örn., gelişimini durdurmak; ve/ veya (c) hastalık-halinin giderilmesi, örn., istenen bir son noktaya ulaşılan kadar hastalık durumunun gerilemesine neden olmak. Mualeme ayrıca bir hastalığın semptomunun iyileştirilmesini (örn., ağrıyı veya rahatsızlığı azaltmayı) içerir, ki burada bu tür bir iyileşme, hastalığı doğrudan etkiliyor veya etkilemiyor olabilir (örn., sebebiyet, iletim, ekspresyon, vb.).

10

Burada kullanıldığı şekliyle, ancak bunlarla sınırlı olmamakla birlikte, "kanser" lösemiler, lenfomalar, melanomlar, karsinomlar ve sarkomlar dahil olmak üzere memelilerde bulunan tüm kanser türlerini veya neoplazmı veya kötü huylu tümörleri ifade eder. Kanser kendisini bir "tümör" veya kanserin kötü huylu hücrelerini içeren bir doku olarak gösterir. Tümörlerin örnekleri arasında, ancak bunlarla sınırlı olmamakla birlikte: fibrosarkom, miksosarkom, liposarkom, kondrosarkom, osteojenik sarkom, kordoma, anjiosarkom, endotelosarkom, lenfanjiyosarkom, lenfanjioendotelosarkom, sinovoma, mezotelyoma, Ewing tümörü, leiomyosarkom, rabdomiyosarkom, kolon karsinomu, pankreas kanseri, meme kanseri, yumurtalık kanseri, prostat kanseri, skuamöz hücreli karsinom, bazal hücreli karsinom, adenokarsinom, ter bezi karsinomu, sebase bezi karsinoması, papiller karsinom, papiller adenokarsinomlar, sistatenokarsinom, medüller karsinom, bronkojenik karsinom, renal hücreli karsinom, hepatoma, safra kanalı karsinomu, koriokarsinom, seminom, embriyonal karsinom, Wilms tümörü, serviks kanseri, testis tümörü, akciğer karsinomu, küçük hücreli akciğer karsinomu, mesane karsinomu, epitelyal karsinom, glioma, astrositom, medulloblastoma, kraniofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemanjiyoblastom, akustik nöroma, oligodendroglioma, meningioma, melanom, nöroblastoma ve retinoblastom gibi sarkomlar ve karsinomlar bulunur. Açıklanan bileşime göre mualeme edilebilen ilave kanserler, örneğin Hodgkin Hastalığı, Non-Hodgkin Lenfoma, multipl miyelom,

nöroblastoma, meme kanseri, yumurtalık kanseri, akciğer kanseri, rabdomiyosarkom, primer trombositoz, primer makroglobulinemi, küçük hücreli akciğer tümörleri, primer beyin tümörleri, mide kanseri, kolon kanseri, kötü huylu pankreatik insulanoma, kötü huylu karsinoid, idrar kesesi kanseri, mide kanseri, premalign deri lezyonları, testis kanseri, lenfomalar, tiroid kanseri, nöroblastoma, özofagus kanseri, genitoüriner kanal kanseri, kötü huylu hiperkalsemi, servikal kanser, endometrial kanser, adrenal kortikal kanser ve prostat kanserini içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir.

Burada kullanılan "nörolojik hastalık veya rahatsızlık", sinir sistemi ve/ veya görsel sistemin herhangi bir hastalığı veya bozukluğunu ifade eder. "Nörolojik hastalık veya bozukluk", merkezi sinir sistemini (beyin, beyin sapı ve serebellum), periferik sinir sistemini (kraniyal sinirler dahil) ve otonom sinir sistemini (parçaları hem merkezi hem periferik sinir sisteminde bulunur) içeren hastalıkları veya bozuklukları içerir. Bir Nörolojik hastalık veya bozukluk, bunlarla sınırlı olmamak üzere, edinilmiş epileptiform afazi; akut disemine ensefalomiyelit; adrenolökodistrofi; yaşa bağlı makula dejenerasyonu; korpus kallozumun agenezi; agnosia; Aicardi sendromu; Alexander hastalığı; Alpers hastalığı; değişen hemipleji; Alzheimer hastalığı; Vasküler demans; Amyotrofik Lateral skleroz; anensefali; Angelman sendromu; anjiomatozis; anoksi; afazi; apraksi; araknoid kistler; araknoidit; Anronl-Chiari malformasyonu; arteriyovenöz malformasyon; Asperger Sendromu; ataksi telegiektazi; Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu; otizm; otonom disfonksiyon; sırt ağrısı; Batten hastalığı; Behçet hastalığı; Bell felci; iyi huylu blefrospazm; iyi huylu odak; amyotrofi; iyi huylu intrakranial hipertansiyon; Binswanger hastalığı; blefarospazm; Bloch Sulzberger sendromu; brakial pleksus yaralanması; beyin apsesi; beyin hasarı; beyin tümörleri (glioblastoma multiforme dahil); spinal tümör; Brown-Sequard sendromu; Canavan hastalığı; Karpal tünel Sendromu;

kosalji; merkezi ağrı sendromu; santral pontin miyelinoliz; sefalik bozukluk; beyin kanaması; serebral arterioskleroz; serebral atrofi; serebral gigantizm; serebral palsi; Charcot-Marie-Tooth hastalığı; kemoterapiye bağlı nöropati ve nöropatik ağrı; Chiari malformasyonu; kore hastalığı; kronik inflamatuvar demiyelinizan polinöropati; kronik ağrı; kronik bölgesel ağrı sendromu; Coffin Lowry sendromu; kalıcı vejetatif durum dahil olmak üzere koma; konjenital yüz dipleksisi; kortikosamall dejenerasyon; kraniyal arterit; kraniyosinostozis; Creutzfeldt-Jakob hastalığı; kümülatif travma bozuklukları; Cushing sendromu; sitomegalik inklüzyon vücut hastalığı; sitomegalovirüs enfeksiyonu; dans eden göz-dans eden ayak sendromu; DandyWalker sendromu; Dawson hastalığı; De Morsier sendromu; Dejerine-Klumke palsi; demans; dermatomiyosit; diyabetik nöropati; diffüz skleroz; disotonomi; disgrafi; disleksi; distoniler; erken infantil epileptik ensefalopati; boş sella sendromu; ensefalit; ensefaloseller; ensefalotrigeminal anjiomatozis; epilepsi; Erb'in felci; temel titreme; Fabry hastalığı; Fahr sendromu; bayılma; ailesel spastik felç; ateşli nöbetler; Fisher sendromu; Friedreich ataksisi; fronto-temporal demans ve diğer "tauopathies"; Gaucher hastalığı; Gerstmann sendromu; dev hücreli arterit; dev hücre inklüzyon hastalığı; globoid hücre lökodistrofisi; Guillain-Barre sendromu; HTLV-1 ilişkili miyelopati; Hallervorden-Spatz hastalığı; Kafa yaralanması; baş ağrısı; hemifasiyal spazm; kalıtsal spastik parapleji; heredopatya ataktik bir polinöritiformis; herpes zoster oticus; zona; Hirayama sendromu; HIV ile ilişkili demans ve nöropati (ayrıca AIDS'in nörolojik belirtileri); holoprozensefali; Huntington hastalığı ve diğer poliglutamin tekrar hastalıkları; hidranensefali; hidrosefali; cushing hastalığı; hipoksi; immün aracılı ensefalomiyelit; inklüzyon cisim miyoziti; incontinentia pigmenti; infantil phytanic asit depolama hastalığı; infantil refsum hastalığı; infantil spazmlar; inflamatuvar miyopati; intrakraniyal kist; intrakranial hipertansiyon; Joubert sendromu; Keams-Sayre sendromu; Kennedy hastalığı; Kinsbourne

sendromu; Klippel Feil sendromu; Krabbe hastalığı; Kugelberg-Welander hastalığı; kuru; Lafora hastalığı; Lambert-Eaton myastenik sendromu; Landau-Kleffner sendromu; lateral medüller (Wallenberg) sendromu; öğrenme engelleri; Leigh hastalığı; 5 Lennox-Gustaut sendromu; Lesch-Nyhan sendromu; lökodistrofi; Lewy vücut demansı; lizensefali; sürgüleme sendromu; Lou Gehrig hastalığı (yani, motor nöron hastalığı veya amiyotrofik lateral skleroz); lomber disk hastalığı; Lyme hastalığı--nörolojik sekel; Machado-Joseph hastalığı; macransefali; megalensefali; 10 Melkersson-Rosenthal sendromu; Menieres hastalığı; menenjit; Menkes hastalığı; metakromatik lökodistrofi; mikrosefali; migren; Miller Fisher sendromu; mini vuruş; mitokondriyal miyopatiler; Mobius sendromu; monomelik amiyotrofi; motor nöron hastalığı; Moyamoya hastalığı; mukopolisakaridozlar; multi-infarkt demans; 15 multifokal motor nöropati; multipl skleroz ve diğer demiyelinizan bozukluklar; postural hipotansiyon ile çoklu sistem atrofisi; kas distrofisi; myastenia gravis; miyelinoklastik diffüz skleroz; bebeklerin miyoklonik ensefalopatisi; miyoklonus; miyopati; miyotoni konjenital; 20 narkolepsi; nörofibromatozis; nöroleptik malign sendrom; AIDS'in nörolojik belirtileri; lupusun nörolojik sekelleri; nöromiyotoni; nöronal ceroid lipofuscinosis; nöronal göç bozuklukları; Niemann-Pick hastalığı; O'Sullivan-McLeod sendromu; oksipital nevralji; gizli spinal disrafizm dizisi; Ohtahara sendromu; 25 olivopontocerebellar atrofi; opsoklonus miyoklonus; optik nörit; ortostatik hipotansiyon; aşırı kullanım sendromu; parestezi; nörodejeneratif bir hastalık veya bozukluk (Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, Alzheimer hastalığı, amiyotrofik lateral skleroz (ALS), demans, nörodejeneratif bir hastalık veya 30 bozukluk (Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, Alzheimer hastalığı, amiyotrofik lateral skleroz (ALS), demans, multipl skleroz ve nöronal hücre ölümüyle ilişkili diğer hastalıklar ve bozukluklar); paramyotoni konjenital; paraneoplastik hastalıklar; paroksizmal ataklar; Parry Romberg sendromu; 35 Pelizaeus-Merzbacher hastalığı; periyodik felçler; periferik

nöropati; ağrılı nöropati ve nöropatik ağrı; kalıcı vejetatif durum; yaygın gelişimsel bozukluklar; photic hapşırma refleksi; fitanik asit depolama hastalığı; Pick hastalığı; sinir sıkışması; hipofiz tümörleri; polimiyozit; porencephaly; polio sonrası sendrom; postherpetik nevralji; bulaşıcı ensefalomiyelit; 5 postural hipotansiyon; Prader- Willi sendromu; primer lateral skleroz; prion hastalıkları; ilerleyici hemifasiyal atrofi; ilerleyici multifokalleukoensefalopati; ilerleyici sklerozan poliodistrofi; ilerleyici supranükleer felç; psödotümör serebri; 10 Ramsay-Hunt sendromu (tip I ve II); Rasmussen'in ensefaliti; refleks sempatik distrofi sendromu; Refsum hastalığı; tekrarlayan hareket bozuklukları; tekrarlayan stres yaralanmaları; Huzursuz bacak sendromu; retrovirüs ilişkili miyelopati; Rett sendromu; Reye Sendromu; Aziz Vitus dansı; 15 Sandhoff hastalığı; Schilder hastalığı; şizensefali; septo-optik displazi; sarsılmış bebek sendromu; zona; Utangaç Drager sendromu; Sjögren sendromu; uyku apnesi; Soto sendromu; spastisite; spina bifida; omurilik yaralanması; omurilik tümörleri; omuriliğe bağlı kas atrofisi; Stiff-Person sendromu; 20 felç; Sturge-Weber sendromu; subakut sklerozan panensefalit; subkortikal arteriyosklerotik ansefalopati; Sydenham koresi; senkop; siringomyeli; tardif diskinezi; Tay-Sachs hastalığı; temporal arterit; bağlı omurilik sendromu; Thomsen hastalığı; torasik çıkış sendromu; Tic Douloureux; Todd'un felç; Tourette 25 sendromu; geçici iskemik atak; bulaşıcı süngerimsi ensefalopatiler; transvers miyelit; travmatik beyin hasarı; titremesi; trigeminal nöralji; tropikal spastik paraparezi; tüplü skleroz; vasküler demans (çok enfarktüslü demans); temporal arterit dahil vaskülit; Von Hippel-Lindau hastalığı; 30 Wallenberg sendromu; Werdnig-Hoffman hastalığı; Batı sendromu; omurga; Williams sendromu; Wildon hastalığı; ve Zellweger sendromunu içerir.

Bir "proliferatif hastalık veya bozukluk", bunlarla sınırlı 35 olmamakla birlikte, miyeloid, lenfoid veya eritroid soylarından

veya bunların öncül hücrelerinden kaynaklanan hematopoietik kökenli hiperplastik/ neoplastik hücreleri içeren hematopoietik neoplastik hastalıkları kapsar. Bunlar, eritroblastik lösemi, akut promyeloid lösemi (APML), kronik miyelojenöz lösemi (KML),
5 ancak bunlarla sınırlı olmamakla beraber B-kökenli ALL ve T-kökenli ALL, kronik lenfositik lösemi (KLL), prolenfositik lösemi (PLL), tüylü hücreli lösemi (HLL) ve Waldenstrom makroglobulinemisini (WM) içeren akut lenfoblastik lösemi (ALL) içeren lenfoid maligniteleri içerir, ancak bunlarla sınırlı
10 değildir. Kötü huylu lenfomaların ek formları, bunlarla sınırlı olmamak üzere, non-Hodgkin lenfoma ve bunların varyantlarını, periferik T hücre lenfomaları, erişkin T hücresi lösemi/ lenfoma (ATL), kutanöz T hücreli lenfoma (CTCL), büyük granüler lenfositik lösemi (LGF), Hodgkin hastalığı ve Reed-Sternberg
15 hastalığını içerir.

Bir "iltihaplanma", sistemik iltihaplı durumları ve monositler, lökositler ve/ veya nötrofillerin yerdeğiştirim ve çekimi ile lokal olarak bağlantılı durumları ifade eder. İnflamasyon
20 örnekleri, ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere, patojenik organizmalar (gram-pozitif bakteriler, gram-negatif bakteriler, virüsler, mantarlar ve protozoa ve helmintler gibi parazitler dahil), transplant reddi (böbrek, karaciğer, kalp, akciğer veya kornea gibi katı organların reddedilmesi ve greft-versus-host
25 hastalığı (GVHD) dahil olmak üzere kemik iliği transplantlarının reddedilmesi dahil) veya lokalize kronik veya akut otoimmün veya alerjik reaksiyonlardan kaynaklanan inflamasyonu içerir. Otoimmün hastalıklar akut glomerülonefrit; romatoid veya reaktif artrit; kronik glomerülonefrit; Crohn hastalığı, ülseratif kolit
30 ve nekrotizan enterokolit gibi enflamatuar bağırsak hastalıkları; hepatit; sepsis; alkolik karaciğer hastalığı; alkolik olmayan steatoz; granülosit transfüzyonu ile ilişkili sendromlar; kontakt dermatit, atopik dermatit, sedef hastalığı gibi iltihaplı dermatozlar; sistemik lupus eritematosus (SLE),
35 otoimmün tiroidit, multipl skleroz ve bazı diyabet formları ya

da patolojik doku yıkımı ile sonuçlanan deneğin kendi bağışıklık sistemi tarafından saldırıya uğradığı herhangi bir başka otoimmün durumu içerir. Alerjik reaksiyonlar arasında alerjik astım, kronik bronşit, akut ve gecikmiş hipersensitivite bulunur.

- 5 Sistemik iltihaplı hastalık durumları arasında, travma, yanıklar, iskemik olayları takiben reperfüzyon (örn., kalpte, beyinde, bağırsakta veya miyokardiyal enfarktüs ve felç de dahil olmak üzere periferik vaskülatürde), sepsis, ARDS veya çoklu organ disfonksiyon sendromu ile ilişkili inflamasyon bulunur.
- 10 İnflamatuar hücre alımı ayrıca aterosklerotik plaklarda da ortaya çıkar. İnflamasyon, Non-Hodgkin lenfoma, Wegener granülomatozu, Hashimoto tiroiditi, hepatoselüler karsinom, timüs atrofisi, kronik pankreatit, romatoid artrit, reaktif lenfoid hiperplazi, osteoartrit, ülseratif kolit, papiller
- 15 karsinom, Crohn hastalığı, ülseratif kolit, akut kolesistit, kronik kolesistit, siroz, kronik sialadenitis, peritonit, akut pankreatit, kronik pankreatit, kronik Gastrit, adenomyoz, endometriozis, akut servisit, kronik servisit, lenfoid hiperplazi, multipl skleroz, idiyopatik trombositopenik
- 20 purpuraya, primer IgA nefropatisine, sistemik lupus eritematozus, psoriasis, pulmoner amfizem, kronik piyelonefrit ve kronik sistitlere bağlı hipertrofiyi içerir ancak bunlarla sınırlı değildir.

Polinükleotid ve Oligonükleotit Bileşimleri ve Molekülleri

25

Hedefler: Bir örnekte, hedefler, sınırlama olmaksızın BKNF ile ilişkili sens ve/ veya antisens kodlayıcı olmayan ve/ veya kodlayan diziler de dahil olmak üzere, Beyin kaynaklı nörotrofik faktörün (BKNF) nükleik asit dizilerini içerir. Her ikisi de

30 "BKNF'ye Doğal Antisens Transkripsiyonunun İnhibisyonu ile Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BKNF) ile İlişkili Hastalıkların Mualemesi" başlıklı olan PCT Yay. No. WO 2010/093904 ve ABD Pat. Uygulama. Yay. No. 2011/0319475 yayınları, burada belirtildiği

gibi oligonükleotitler kullanılarak modülasyon için BKNF'yi hedef olarak açıklar.

Nörotrofinler, nöral sağkalımı ve farklılaşmayı destekleyen yapısal olarak ilişkili büyüme faktörleri sınıfıdır. Nörit gelişimini uyarırlar, yaralı nöronların rejenerasyonunu teşvik edebilecekleri ve nörotrofiyi üreten hedef dokularda kollateral filizlenmeyi uyarmak için hedef kaynaklı nörotrofik faktörler olarak hareket ettikleri öne sürülür. Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BKNF) başlangıçta beyin ekstrelerinde bulunan ve dorsal kök gangliyonunun hayatta kalmasını arttıran temel bir protein olarak karakterize edilmiştir. Hücre gövdesi ile aksonal iletişim yaralanma sebebi ile kesildiğinde, Schwann hücreleri sinir büyüme faktörü (NGF) ve BKNF gibi nörotrofik faktörler üretir. Nörotrofinler Schwann hücrelerinden serbest bırakılır ve daha sonra nörotrofinlerin yoğunluk gradyanı boyunca distal olarak uzayan rejeneratif aksonlar etrafında gradyan tarzda dağıtılır. Yeni doğan sıçanlarda BKNF'nin lokal sinirler üzerinde lokal olarak uygulanmasının, aksotomiyi takip eden motor nöronların kitlesel ölümünü önlediği gösterilmiştir. BKNF'nin mRNA titresi, oksotomiden dört gün sonra normal seviyenin birkaç katına çıkar ve maksimum seviyesine 4 haftada ulaşır. Dahası, BKNF'nin kültürde kolinerjik nöronların hayatta kalmasını arttırdığı bildirilmiştir.

25

Bir örnekte, antisens oligonükleotitler, BKNF ailesi üyeleri ile bağlantılı hastalıkları veya bozuklukları önlemek veya mualeme etmek için kullanılır. Tarifnemenin antisens oligonükleotitleri ve/ veya antisens bileşikleri kullanılarak elde edilen kök hücrelerden rejenere edilmiş hücre/ dokular ile mualeme edilebilen örnek Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BKNF) aracılı hastalıklar ve bozukluklar aşağıdakileri içerir: BKNF'nin anormal fonksiyonu ve/ veya ekspresyonu ile ilişkili bir hastalık veya bozukluk, nörolojik bir hastalık veya bozukluk,

kusurlu nörogenez ile ilişkili bir hastalık veya bozukluk; nörodejeneratif bir hastalık veya bozukluk (örn., Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, amiyotrofik lateral skleroz vb.); bir nöropsikiyatrik bozukluk (depresyon, şizofreni, şizofreniform bozukluk, şizoaffektif bozukluk ve sanrılı bozukluk); panik bozukluk, fobiler (agorafobi dahil) gibi anksiyete bozuklukları, obsesif kompulsif bozukluk, travma sonrası stres bozukluğu, bipolar bozukluk, anoreksiya nervoza, bulimiya nervoza), merkezi sinir sisteminin bir otoimmün bozukluğu (örn., multipl skleroz), hafıza kaybı, uzun süreli veya kısa süreli bir hafıza bozukluğu, iyi huylu unutkanlık, çocukluk çağı bozukluğu, kafa travması, bir dikkat eksikliği bozukluğu, viral enfeksiyona nöronal reaksiyon, beyin hasarı, narkolepsi, bir uyku bozukluğu (örn., sirkadiyen ritim bozuklukları, uykusuzluk ve narkolepsi); sinirlerin kopması ya da sinir hasarı, serebrospinal sinir kordunun (CNS) kesilmesi ve beyin ya da sinir hücrelerine zarar verilmesi, motor ve/veya vokal tiklerle karakterize edilen bir motor ve tik bozukluğu (örn. Tourette bozukluğu, kronik motor veya vokal tik bozukluğu, geçici tik bozukluğu ve stereotipik hareket bozukluğu), AIDS ile ilişkili bir nörolojik defisit, bir madde kötüye kullanımı bozukluğu (örn., madde bağımlılığı, madde istismarı ve madde kaynaklı psikolojik bozukluk gibi madde istismarı/ bağımlılığı sekeli, madde yoksunluğu ve madde kaynaklı demans veya amnestik bozukluk); travmatik beyin hasarı, tinnitus, nevralji (örn., trigeminal nevralji), ağrı (örn., kronik ağrı, kronik iltihaplı ağrı, artrit ile ilişkili ağrı, fibromiyalji, sırt ağrısı, kansere bağlı ağrı, sindirim sistemi ile ilişkili ağrı, Crohn hastalığı ile bağlantılı ağrı, otoimmün hastalık ile ilişkili ağrı, endokrin hastalığına bağlı ağrı, diyabetik nöropati ile ilişkili ağrı, hayalet uzuv ağrısı, spontan ağrı, kronik ameliyat sonrası ağrı, kronik temporomandibular ağrı, causalgia, post-herpetik nevralji, AIDS ile ilişkili ağrı, kompleks bölgesel ağrı sendromları tip I ve II, trigeminal nevralji, kronik sırt ağrısı, omurilik yaralanması ile ilişkili ağrı, ilaç

alımı ile ilişkili ağrı ve tekrarlayan akut ağrı, nöropatik ağrı), diyabet, bir MS ve bir motor nöron hastalığı, ataksiler, kas sertliği (spastisite), temporomandibular eklem disfonksiyonu, Ödül yetersizliği sendromu (RDS) gibi bir hastalıkta nöro-
5 sistitlerle sonuçlanan uygun olmayan nöronal aktivite, alkol veya madde kötüye kullanımı (örneğin, ecstasy, metamfetamin vb.), zeka geriliği veya kognitif bozukluktan kaynaklanan nörotoksisite (örn., anormal olmayan X'e bağlı mental retardasyon, frajil X sendromu, Down sendromu, otizm), afazi,
10 Bell felci, Creutzfeldt-Jacob hastalığı, ansefalit, yaş ile ilişkili maküler dejenerasyon, ondine sendromu, wagr sendromu, işitme kaybı, Rett sendromu, epilepsi, omurilik yaralanması, inme, hipoksi, iskemi , beyin hasarı, diyabetik nöropati, periferik nöropati, sinir transplantasyonu komplikasyonları,
15 motor nöron hastalığı, periferik sinir hasarı, obezite, metabolik sendrom, kanser, astım, atopik hastalık, iltihap, alerji, egzama, nöro-onkolojik bir hastalık veya bozukluk, nöro-immünolojik hastalık veya bozukluk ve nöro-otolojik hastalık veya bozukluk; ve yaşlanma ve yaşlanma ile ilişkili bir hastalık
20 veya bozukluk.

Mevcut açıklama, endojen NAT'lerin, sens gen muadillerinin transkripsiyonunu baskıladığı bir mekanizma sağlar. Açıklama, endojen gen ekspresyonunun, çoğu transkripsiyonel birimden
25 kopyalanan NAT'lerin uzaklaştırılması veya inhibisyonu ile lokus spesifik bir şekilde yukarı regüle edilebilmesini sağlar.

Mevcut açıklamanın bir örneği, protein çıktısını düzenleyen fonksiyonel ncRNA'ların örneklerini, diğer birçok genomik
30 lokuslar için geçerli olan fenomeni sağlar.

Beyin kaynaklı Nörotrofik Faktör (BKNF) nöronal büyüme, olgunlaşma farklılaşması ve bakım için gerekli olan "nörotrofin" büyüme faktörleri ailesinin bir üyesidir. BKNF, nöronal
35 plastisite için de gereklidir ve öğrenmeye ve hafıza süreçlerine

dahil olduğu gösterilmiştir. BKNF lokusu, kromozom 11 üzerindedir ve her iki şeritten aktif transkripsiyon gösterir, bu da kodlanmamış NAT'lerin transkripsiyonuna yol açar.

5 Mevcut açıklama, hem in vitro hem de in vivo olarak BKNF mRNA ve proteinin ifadesi üzerinde güçlü bir karşılıklı ve dinamik düzenleme uygulayan bu antisens RNA molekülü BKNF-AS'nin regülatör rolünü karakterize eder.

10 Mevcut açıklamanın bir rneği, AntagoNAT olarak adlandırılan antisens RNA transkript inhibitör molekülleri kullanılarak mRNA ekspresyonunun yukarı regülasyonu için bir strateji temin etmektedir. AntagoNAT'ler, rn., PCT Yay. No. WO 2012/068340'da tarif edilir.

15

Ökaryotik genomlardaki ncRNA'ların sayısının, gelişimsel karmaşıklığın bir fonksiyonu olarak arttığı gösterilmiştir ve örneğin, sinir sisteminde eksprese edilen ncRNA'larda büyük bir çeşitlilik vardır. Geçtiğimiz birkaç yıl içinde, fonksiyonel

20 NAT'ler hakkında raporlar yayınlanmış ve bunların Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve Frajil X sendromu dahil olmak üzere insan bozukluklarında potansiyel katılımlarını göstermiştir. Ayrıca CD97 sens geninin yukarı regülasyonunun, antisens RNA transkriptinin demonte edilmesiyle elde

25 edilebileceği bildirilmiştir. Progesteron reseptörü (PR) ve diğer endojen transkriptlerin yukarı regülasyonu, promotrden türetilmiş kodlayıcı olmayan RNA'ların hedeflenmesinden sonra rapor edilmiştir. NAT'lerin tükenmesi sonrasında p21 geninin ve Oct4 promotörünün transkripsiyonel aktivasyonu rapor edilmiştir.

30 Antisens RNA ile indüklenen kromatin yeniden şekillenmesi, birçok düşük kopya sayısı olan NAT için uygulanabilir ve dinamik bir etki tarzı gibi görünmektedir. Eğer yleyse, antisens RNA, kromatin yapısını korumak veya modifiye etmek için, sonuçta sens geni ekspresyonunu aktive eden veya bastıran lokal etkileri
35 gösterebilir.

PCR2, dört çekirdek alt birimden oluşan bir protein kompleksidir: Eed, Suz12, RbAp48 ve histon H3-lizin'in trimetilasyonunu katalize eden katalitik Ezh2. (H3K27met3). Son 5 çalışmalar Ezh2 ve birçok ncRNA transkriptleri arasında doğrudan RNA-protein etkileşimi için kanıt sağlar. X inaktivasyonu ve HOX gen kümelenmesi ile ilgili diğer çalışmalar, H3K27met3'ün baskılanmış kromatin işaretlerinin PRC2 aracılı indüksiyonuna dahil edilecek RNA transkriptlerini göstermektedir. PRC2 10 transkriptom profili, çoğu antisens RNA transkriptleri olarak kategorize edilen embriyonik kök hücrelerde 9,000'den fazla PRC2 etkileşimli RNA'yı tanımlamıştır. P15 ve DM1 genlerinin epigenetik susturulmasının, antisens RNA'sı ile heterokromatin oluşumunu kapsadığı rapor edilmiştir. Kromatinin hetero- veya ö- 15 kromatin kategorilerine geleneksel ikili bölüşümü, son çalışmalar orijinal olarak inanılandan daha dinamik ve esnek olan beş ana kromatin tipinin olduğunu gösterdiğinden tamamlanamayabilir. Çok sayıda gen lokusu için uygulanabilir olan NAT'ler kromatin modifikasyonunda lokus-spesifik bir 20 değişiklik elde etmek için manipüle edilebilir. Örnekler olarak, BKNF genlerinin antisens transkriptlerinin parçalanması (siRNA ile) veya inhibisyonunun (AntagoNAT'ler ile) mukabil mRNA'ların yukarı regülasyonuna yol açtığı gösterilmiştir.

25 Nörotrofinler, nöronların hayatta kalmasını, gelişmesini, farklılaşmasını ve işlevini arttıran bir salgılanmış büyüme faktörleri sınıfına aittir ve BKNF, sinaptik plastisitenin önemli bir moleküler aracısıdır. BKNF, nöronal ve glial olgunlaşmayı senkronize etmek, aksonal ve dendritik 30 farklılaşmaya katılmak ve nöronal hücre sağkalımını korumak ve geliştirmek için önerilmektedir. Nörotrofin ekspresyon seviyeleri nörodejeneratif ve psikiyatrik ve nörogelişimsel bozukluklarda bozulmaktadır. Nörotrofinlerin yukarı regülasyonunun, çeşitli nörolojik bozukluklar üzerinde yararlı 35 etkilere sahip olduğuna inanılmaktadır. AntagoNAT'ler, BKNF-

AS'yi inhibe etmek ve sonuç olarak çeşitli hastalık durumlarında nöronal proliferasyonu ve hayatta kalmayı arttırmak için terapötik bir strateji olarak kullanılabilir. Doğal modifikasyonları içerdiği ve bilinen tüm ekleme formlarını temsil ettiği kabul edilen, endojen BKNF moleküllerinin sentezini yukarı regüle etmek için burada tarif edilen yaklaşımın, sentetik BKNF moleküllerinin uygulanmasının belirgin ve belki de daha üstün olduğu hariç tutulamaz.

10 Bir örnekte, BKNF'nin bir veya daha fazla antisens oligonükleotit tarafından modülasyonu, ihtiyacı olan bir hastaya normal bir kontrole kıyasla BKNF anormal ekspresyonu, fonksiyonu, aktivitesi ile ilgili herhangi bir hastalığı veya bozukluğu önlemek veya mualeme etmek için uygulanır.

15

Bir örnekte oligonükleotitler, sınırlama olmaksızın kodlayıcı olmayan bölgeleri içeren, burada belirtilen BKNF'nin doğal antisens transkriptlerine özgüdür. BKNF hedefleri BKNF'nin varyantlarını; SNP'ler de dahil olmak üzere BKNF mutantları; BKNF'nin kodlanmamış dizileri; aleller, fragmanlar ve benzerlerini içerir. Tercihen oligonükleotit antisens bir RNA molekülüdür.

20

Açıklamanın örneklerine uygun olarak, hedef nükleik asit molekülü, tek başına BKNF polinükleotidleri ile sınırlı olmayıp, BKNF'nin izoform, reseptör, homolog, kodlayıcı olmayan bölgeleri ve benzerlerinden herhangi birine uzanır.

25

Bir örnekte, bir oligonükleotit, sınırlama olmaksızın varyantlar, aleller, homologlar, mutantlar, türevler, fragmanlar ve tamamlayıcı diziler dahil olmak üzere BKNF hedeflerinin doğal bir antisens dizisini (kodlayan ve kodlayıcı olmayan bölgelere doğal antisens) hedefler. Tercihen oligonükleotit antisens bir RNA veya DNA molekülüdür.

30

Bir örnekte, mevcut açıklamanın oligomerik bileşikleri, aynı zamanda, bileşiğin içindeki nükleotit pozisyonlarının bir veya daha fazlasında farklı bir bazın mevcut olduğu varyantları da içerir. Örneğin, birinci nükleotid bir adenin ise, bu konumda timidin, guanosin, sitidin veya diğer doğal veya doğal olmayan nükleotidleri içeren varyantlar üretilebilir. Bu, antisens bileşiğin konumlarından herhangi birinde yapılabilir. Bu bileşikler daha sonra, bir hedef nükleik asidin ekspresyonunu inhibe etme kabiliyetlerini belirlemek için burada tarif edilen yöntemler kullanılarak test edilir.

Bazı durumlarda, antisens bileşik ve hedef arasında homoloji, dizi özdeşliği veya tamamlayıcılık yaklaşık %50 ila yaklaşık %60 arasındadır. Bazı durumlarda, homoloji, dizi özdeşliği veya tamamlayıcılık yaklaşık %60 ila yaklaşık %70'tir. Bazı durumlarda, homoloji, dizi özdeşliği veya tamamlayıcılık yaklaşık %70 ila yaklaşık %80'dir. Bazı durumlarda, homoloji, dizi özdeşliği veya tamamlayıcılık yaklaşık %80 ila yaklaşık %90'dır. Bazı durumlarda, homoloji, dizi özdeşliği veya tamamlayıcılığı yaklaşık %90, yaklaşık %92, yaklaşık %94, yaklaşık %95, yaklaşık %96, yaklaşık %97, yaklaşık %98, yaklaşık %99 veya yaklaşık %100'dür.

Bileşiğin hedef nükleik aside bağlanması, bir aktivite kaybına neden olmak için hedef nükleik asidin normal fonksiyonu ile etkileşime girdiğinde, bir antisens bileşiği spesifik olarak hibridize edilebilirdir ve spesifik bağlamanın arzu edildiği koşullar altında hedef olmayan nükleik asit dizilerine antisens bileşiğin spesifik olmayan bağlanmasını önlemek için yeterli bir tamamlayıcılık derecesi vardır. Bu gibi durumlar, örneğin in vivo analizler veya terapötik mualeme durumunda fizyolojik koşulları ve in vitro deneyler durumunda analizlerin yapıldığı koşulları içerir.

DNA, RNA, kimerik, ornatılmış vb. ne olursa olsun bir antisens bileşiği, bileşiğin hedef DNA'ya bağlanması veya RNA molekülünün hedef DNA veya RNA'nın normal fonksiyonuna müdahale etmesi durumunda, fayda kaybına neden olmak için spesifik olarak hibridize edilebilir, ve spesifik bağlamanın arzu edildiği koşullar altında, yani in vivo analizler veya terapötik mualeme durumunda fizyolojik koşullar altında ve in vitro analizlerde, analizlerin yapıldığı koşullar altında, hedef olmayan dizilere karşı antisens bileşiğin spesifik olmayan bağlanmasını önlemek için yeterli derecede tamamlayıcılık seviyesi bulunmaktadır.

Bir örnekte BKNF'nin hedeflenmesi sınırlama olmaksızın örneğin PCR, hibridizasyon vb. kullanılarak tanımlanan ve genişletilmiş antisens diziler dahil, DİZİ KİM NO: 3 ila 11 olarak belirtilen dizilerden bir veya daha fazlası ve benzerleri, BKNF'nin ekspresyonunu veya fonksiyonunu modüle eder. Bir örnekte, bir kontrol ile kıyaslandığında ekspresyon veya fonksiyon yukarı regüle edilir. Bir örnekte, bir kontrol ile karşılaştırıldığında ekspresyon veya fonksiyon aşağı regüle edilir.

Bir örnekte, oligonükleotitler, örneğin PCR, hibridizasyon vb. kullanılarak tespit edilen ve genişletilmiş antisens dizileri içeren, DİZİ KİM. NO: 12 ila 49 olarak belirtilen nükleik asit dizilerini içerir. Bu oligonükleotitler, bir veya daha fazla modifiye edilmiş nükleotid, daha kısa veya daha uzun fragmanlar, modifiye edilmiş bağlar ve benzerlerini içerebilir. Modifiye edilmiş bağların veya nükleotit arası bağların örnekleri, fosforotioat, fosforoditiyoat veya benzerlerini içerir. Bir örnekte, nükleotitler bir fosfor türevini içerir. Mevcut açıklamanın modifiye edilmiş oligonükleotitlerinde şeker veya şeker analog kısmına bağlanabilen fosfor türevi (veya modifiye edilmiş fosfat grubu), bir monofosfat, difosfat, trifosfat, alkifosfat, alkanfosfat, fosforotioat ve benzerleri olabilir. Yukarıda belirtilen fosfat analoglarının hazırlanması ve

bunların nükleotitler, modifiye edilmiş nükleotitler ve oligonükleotitlere dahil edilmesi de başlı başına bilinmektedir ve burada açıklanmasına gerek yoktur.

5 Antisensin spesifikliği ve hassasiyeti, terapötik kullanımlar için teknikte uzman kişilerce de ilişkilendirilmektedir. Antisens oligonükleotitleri, hayvanlarda ve insanda hastalık durumlarının mualemesinde terapötik parçalar olarak kullanılmıştır. Antisens oligonükleotitleri, insanlara güvenli
10 ve etkin bir şekilde uygulanmıştır ve birçok klinik çalışma halen devam etmektedir. Bu nedenle, oligonükleotitlerin, özellikle insanlar, hücreler, dokular ve hayvanların mualemesi için mualeme rejimlerinde faydalı olacak şekilde konfigüre edilebilen yararlı terapötik yaklaşımlar olabileceği tespit edilmiştir.

15

Mevcut açıklamanın örneklerinde oligomerik antisens bileşikleri, özellikle oligonükleotitler, hedef nükleik asit moleküllerine bağlanır ve bir hedef gen tarafından kodlanan moleküllerin ekspresyonunu ve/ veya fonksiyonunu modüle eder.
20 Müdahale edilecek DNA'nın işlevleri, örneğin, replikasyon ve transkripsiyonu içerir. Müdahale edilecek RNA'nın fonksiyonları, örneğin, RNA'nın protein translasyonu, RNA'dan proteinin translasyonu, bir veya daha fazla mRNA türü üretmek için RNA'nın eklenmesi ve RNA'ya bağlanabilen veya RNA tarafından
25 kolaylaştırılabilen katalitik aktivite gibi tüm son derece önemli fonksiyonları içerir. İstenen fonksiyonlara bağlı olarak fonksiyonlar yukarı regüle edilebilir veya inhibe edilebilir.

Antisens bileşikleri arasında, antisens oligomerik bileşikler,
30 antisens oligonükleotitler, harici kılavuz dizisi (EGS) oligonükleotitleri, alternatif ekleyiciler, primerler, problemler ve hedef nükleik asidin en azından bir kısmına hibritlenen diğer oligomerik bileşikler bulunur. Bu şekilde, bu bileşikler, tek iplikli, çift iplikli, kısmen tek iplikli veya dairesel
35 oligomerik bileşikler formunda eklenebilir.

Belirli bir nükleik asit molekülüne karşı bir antisens bileşiğinin hedeflenmesi, bu açıklama bağlamında çok aşamalı bir işlem olabilir. İşlem genellikle işlevi modüle edilecek olan bir
5 hedef nükleik asidin tanımlanmasıyla başlar. Bu hedef nükleik asit, örneğin, belirli bir bozukluk veya hastalık durumu veya bulaşıcı bir maddeden bir nükleik asit molekülü ile ilişkili olan bir hücresel gen (veya genden transkribe edilmiş mRNA) olabilir. Mevcut açıklamada, hedef nükleik asit, Beyin kaynaklı
10 nörotrofik faktör (BKNF) kodlayıcılıktadır.

Hedefleme prosesi genellikle arzu edilen etkinin, örn., ekspresyonun modülasyonunun sonuçlanacağı şekilde, antisens etkileşimi için hedef nükleik asit içindeki en az bir hedef
15 bölgenin, bölümün veya alanın belirlenmesini de içerir. Mevcut açıklama kapsamında "bölge" terimi, en az bir tanımlanabilir yapıya, fonksiyona veya karakteristiğe sahip hedef nükleik asidin bir kısmı olarak tanımlanmaktadır. Hedef nükleik asitlerin bölgeleri arasında bölümler bulunur. "Bölümler", bir
20 hedef nükleik asit içindeki bölgelerin daha küçük veya alt bölümleri olarak tanımlanır. Mevcut açıklamada kullanıldığı haliyle "alanlar", bir hedef nükleik asit içindeki konumlar olarak tanımlanmaktadır.

25 Bir örnekte, antisens oligonükleotitler, Beyin kaynaklı nörotrofik faktörün (BKNF) doğal antisens dizilerine bağlanır ve BKNF'nin (DİZİ KİM. NO: 1 ve 2) ekspresyonunu ve/veya fonksiyonunu modüle eder. Antisens dizilerin örnekleri arasında DİZİ KİM. NO: 3 ila 55 bulunur.

30

Bir örnekte, antisens oligonükleotitler, Beyin kökenli nörotrofik faktör (BKNF) polinükleotitlerinin bir veya daha fazla bölümüne bağlanır ve BKNF'nin ekspresyonunu ve/veya fonksiyonunu modüle eder. Bölümler, BKNF sensinin veya antisens
35 polinükleotitlerin en az beş ardışık nükleotitini içerir.

Bir örnekte, antisens oligonükleotitleri, BKNF'nin doğal antisens dizileri için spesifiktir; buradaki oligonükleotitlerin BKNF'nin doğal antisens dizilerine bağlanması, BKNF'nin ekspresyonunu ve/ veya fonksiyonunu modüle eder.

Bir örnekte, oligonükleotit bileşikleri DİZİ KİM. NO: 12 ila 49 olarak belirtilen dizileri, örneğin PCR, hibridizasyon vb. kullanılarak tespit edilen ve genişleyen antisens dizileri içerir. Bu oligonükleotitler, bir veya daha fazla modifiye edilmiş nükleotid, daha kısa veya daha uzun fragmanlar, modifiye edilmiş bağlar ve benzerlerini içerebilir. Modifiye edilmiş bağların veya nükleotit arası bağların örnekleri, fosforotioat, fosforoditiyoat veya benzerlerini içerir. Bir örnekte, nükleotitler bir fosfor türevini içerir. Mevcut açıklamanın modifiye edilmiş oligonükleotitlerinde şeker veya şeker analog kısmına bağlanabilen fosfor türevi (veya modifiye edilmiş fosfat grubu), bir monofosfat, difosfat, trifosfat, alkifosfat, alkanfosfat, fosforotioat ve benzerleri olabilir. Yukarıda belirtilen fosfat analoglarının hazırlanması ve bunların nükleotitler, modifiye edilmiş nükleotitler ve oligonükleotitlere dahil edilmesi de başlı başına bilinmektedir ve burada açıklanmasına gerek yoktur.

Teknikte bilindiği üzere, translasyon başlatma kodonu tipik olarak 5'-AUG (transkribe edilmiş mRNA moleküllerinde; karşılık gelen DNA molekülünde 5'-ATG) olduğundan, translasyon başlatma kodonu "AUG kodonu", "başlangıç kodonu" veya "AUG başlangıç kodonu" olarak da adlandırılır. Bir azınlık gen, RNA dizisi 5'-GUG, 5'-UUG veya 5'-CUG olan bir translasyon başlatma kodonuna sahiptir; ve 5'-AUA, 5'-ACG ve 5'-CUG'nin in vivo olarak işlev gördüğü gösterilmiştir. Bu nedenle "translasyon başlatma kodonu" ve "başlangıç kodonu" terimleri, her bir durumda başlatıcı amino asit tipik olarak metionin (ökaryotlarda) veya formil metionin (prokaryotlarda) olmasına rağmen birçok kodon dizisini

kapsayabilir. Ökaryotik ve prokaryotik genler, iki veya daha fazla alternatif başlangıç kodonuna sahip olabilir, bunlardan herhangi biri, belirli bir hücre tipi veya dokusunda translasyon başlatma için veya belirli bir koşullar dizisi altında tercihen kullanılabılır. Açıklama kapsamında, "başlangıç kodonu" ve "translasyon başlatma kodonu", bu kodonların dizisinden (dizilerinden) bağımsız olarak, beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BKNF) kodlayan bir genden kopyalanan bir mRNA'nın translasyonunu başlatmak için in vivo kullanılan kodon veya kodonlara atıfta bulunur. Bir genin bir translasyon sonlandırma kodonu (veya "durdurma kodonu") üç diziden birine, yani 5'-UAA, 5'-UAG ve 5'-UGA'ya sahip olabilir (karşılık gelen DNA dizileri, sırasıyla 5'-TAA, 5'-TAG ve 5'-TGA'dır).

"başlatma kodonu bölgesini " ve "translasyon başlatma kodonu bölgesi" terimleri, bir translasyon başlatma kodonundan her iki doğrultuda (yani, 5 'veya 3') yaklaşık 25 ila yaklaşık 50 bitişik nükleotidi kapsayan böyle bir mRNA veya genin bir bölümünü ifade eder. Benzer şekilde, " durdurma kodonu bölgesi " ve "translasyon sonlandırma kodonu bölgesi" terimleri, bir translasyon sonlandırma kodonundan her iki doğrultuda (yani, 5' veya 3') yaklaşık 25 ila yaklaşık 50 bitişik nükleotiti kapsayan böyle bir mRNA veya genin bir bölümünü ifade eder. Sonuç olarak, "başlama kodonu bölgesi" (veya "translasyon başlatma kodonu bölgesi") ve "durdurma kodonu bölgesi" (veya "translasyon sonlandırma kodonu bölgesi"), mevcut açıklamanın antisens bileşikleri ile etkin bir şekilde hedeflenebilen bölgelerin tümüdür.

Teknikte, translasyon başlatma kodonu ve translasyon sonlandırma kodonu arasındaki bölgeye atıfta bulunan açık okuma çerçevesi (ORF) veya "kodlayıcı bölgesi" de, etkili bir şekilde hedeflenebilen bir bölgedir. Mevcut açıklama bağlamında, hedeflenen bir bölge, bir genin açık okuma çerçevesinin (ORF)

translasyon başlatma veya sonlandırma kodonunu kapsayan intragenik bölgedir.

Bir başka hedef bölge, translasyon başlatma kodonundan 5' yönündeki bir mRNA kısmına atıfta bulunmak için teknik alanda bilinen 5' translasyona uğramamış bölgeyi (5'UTR) içerir ve böylece 5' başlık alanı ve bir mRNA'nın (veya gen üzerinde ilgili nükleotidler) translasyon başlatma kodonu arasındaki nükleotidler içerir. Yine bir başka hedef bölge, translasyon sonlandırma kodonundan 3' yönündeki bir mRNA kısmına atıfta bulunmak için teknik alanda bilinen 3' translasyona uğramamış bölgeyi (3'UTR) içerir ve böylece, bir sonlandırma kodonu ve bir mRNA'nın 3' ucu (ya da gen üzerindeki karşılık gelen nükleotitler) arasındaki nükleotidler içerir. Bir mRNA'nın 5' başlık alanı, bir 5'-5' trifosfat bağlantısı yoluyla mRNA'nın 5'-çoğu kalıntısına birleştirilen bir N7-metillenmiş guanosin kalıntısı içerir. Bir mRNA'nın 5' başlık alanının, başlığın kendisine bitişik olan ilk 50 nükleotidin yanı sıra 5' başlık yapısını içerdiği kabul edilir. Bu açıklama için bir başka hedef bölge 5' başlık bölgesidir.

Bazı ökaryotik mRNA transkriptleri doğrudan translasyona uğramış olmasına rağmen, birçoğu translasyondan önce bir transkriptten kesilen "intronlar" olarak bilinen bir veya daha fazla bölgeyi içerir. Geriye kalan (ve dolayısıyla translasyona uğrayan) bölgeler "eksonlar" olarak bilinir ve kesintisiz bir mRNA dizisi oluşturmak üzere birbirine eklenir. Bir örnekte, ekleme bölgelerini, yani intron-ekson bağlantılarını veya ekson-intron bağlantılarını hedeflemek, özellikle anormal eklenmenin hastalıkta rol oynadığı durumlarda veya belirli bir ekleme ürününün aşırı bir üretiminin hastalıkta rol oynadığı durumlarda özellikle yararlıdır. Yeniden düzenleme veya silinme nedeniyle anormal bir füzyon jonksiyonu, hedef alanın başka bir örneğidir. Farklı gen kaynaklarından iki (veya daha fazla) mRNA'nın birleştirilmesi işlemi yoluyla üretilen mRNA transkriptleri

"füzyon transkriptleri" olarak bilinir. Intronlar, örneğin DNA veya pre-mRNA'ya hedeflenen antisens bileşikleri kullanılarak etkili bir şekilde hedeflenebilir.

5 Bir örnekte, antisens oligonükleotitler, bir hedef polinükleotitin kodlayıcı ve/ veya kodlayıcı olmayan bölgelerine bağlanır ve hedef molekülün ekspresyonunu ve/ veya fonksiyonunu modüle eder.

10 Bir örnekte, antisens oligonükleotitler doğal antisens polinükleotidlere bağlanır ve hedef molekülün ekspresyonunu ve/ veya fonksiyonunu modüle eder.

Bir örnekte, antisens oligonükleotitler, sens polinükleotidlere bağlanır ve hedef molekülün ekspresyonunu ve/ veya fonksiyonunu modüle eder.

Alternatif RNA transkriptleri, aynı genomik DNA bölgesinden üretilebilir. Bu alternatif transkriptler genellikle
20 "varyantlar" olarak bilinir. Daha spesifik olarak "pre-mRNA varyantları", aynı genomik DNA'dan üretilen, aynı genomik DNA'dan üretilen diğer transkriptlerden başlangıç veya bitiş konumu açısından farklı olan ve hem intronik hem de eksonik diziyi içeren transkriptlerdir.

25

Ekleme sırasında bir veya daha fazla ekson veya intron bölgesinin veya bunun kısımlarının eksizyonu üzerine, pre-mRNA varyantları daha küçük "mRNA varyantları" üretir. Sonuç olarak, mRNA varyantları, pre-mRNA varyantları olarak işlenir ve her bir
30 benzersiz pre-mRNA varyantı, her zaman, ekleme sonucunda benzersiz bir mRNA varyantı üretmelidir. Bu mRNA varyantları ayrıca "alternatif ekleme varyantları" olarak bilinir. Pre-mRNA varyantı eklemesi yapılmazsa, pre-mRNA varyantı mRNA varyantı ile aynı olur.

Transkripsiyonu başlatmak veya durdurmak için alternatif sinyaller kullanılarak varyantlar üretilebilir. Pre-mRNA'lar ve mRNA'lar, birden fazla başlangıç kodonuna veya durdurma kodonuna sahip olabilir. Alternatif başlangıç kodonları kullanan bir pre-mRNA veya mRNA'dan kaynaklanan varyantlar, bu pre-mRNA veya mRNA'nın "alternatif başlangıç varyantları" olarak bilinir. Alternatif bir durdurma kodonu kullanan transkriptler, bu pre-mRNA veya mRNA'nın "alternatif durdurma varyantları" olarak bilinir. Spesifik bir alternatif durdurma varyantı türü, çoklu transkriptlerin, transkripsiyon mekanizması tarafından "poliA durdurma sinyallerinin" birinin alternatif seçiminden kaynaklandığı ve böylece eşsiz poliA alanlarında sona eren transkriptlerin üretildiği "poliA varyantı" dır. Açıklama bağlamında, burada tarif edilen varyantların tipleri ayrıca hedef nükleik asitlerin örnekleridir.

Antisens bileşiklerinin hibritlendiği hedef nükleik asit üzerindeki konumlar, aktif bir antisens bileşiğinin hedeflendiği bir hedef bölgenin en az bir 5-nükleotit uzun kısmı olarak tanımlanır.

Bazı örnek niteliğindeki hedef parçaların spesifik dizileri burada ortaya konulurken, teknikte uzman kişiler, bunların, bu açıklamanın kapsamı içindeki belirli örnekleri açıklamaya ve betimlemeye hizmet ettiğini kabul edecektir. İlave hedef bölümler, bu açıklama ışığında teknikte uzman bir kişi tarafından kolaylıkla tanımlanabilir.

Tercih edilen hedef bölümler arasından seçilen en az beş (5) ardışık nükleotidden oluşan bir bölüm içeren 5-100 uzunluktaki nükleotid hedef bölümlerin, hedefleme için de uygun olduğu düşünülmektedir.

Hedef bölümler, tercih edilen hedef bölümlerden birinin 5

'ucundan en az 5 ardışık nükleotit içeren DNA veya RNA dizilerini içerebilir (geri kalan nükleotidler, hedef bölümün 5'-terminusunun hemen yukarı akışından başlayan ve DNA ve RNA yaklaşık 5 ila yaklaşık 100 nükleotid içerene kadar devam eden aynı DNA veya RNA'nın ardışık bir uzantısıdır). Benzer şekilde tercih edilen hedef bölümler, tercih edilen hedef bölümlerden birinin 3' terminisundan en az 5 ardışık nükleotit içeren DNA veya RNA dizileri tarafından temsil edilebilir (geri kalan nükleotidler, hedef bölümün 3'-terminusunun hemen aşağı akışından başlayan ve DNA ve RNA yaklaşık 5 ila yaklaşık 100 nükleotid içerene kadar devam eden aynı DNA veya RNA'nın ardışık bir uzantısıdır). Burada gösterilen hedef bölümlerle donatılmış olan teknikte uzman birinin gereksiz deneyler yapmadan daha fazla tercih edilen hedef bölümleri belirlemesi mümkün olacaktır.

15

Bir veya daha fazla hedef bölge, bölüm veya alan belirlendikten sonra, hedefe yeterince tamamlayıcı olan, yani arzu edilen etkiyi vermek için yeterince iyi ve yeterli özgünlükte hibritleşecek olan antisens bileşikleri seçilir.

20

Açıklamanın örneklerinde oligonükleotitler belirli bir hedefin antisens ipliğine bağlanır. Oligonükleotitler en az 5 nükleotit uzunluğundadır ve sentezlenebilir, böylece her bir oligonükleotit, üst üste gelen dizileri hedefler, öyle ki oligonükleotitler, hedef polinükleotitin tüm uzunluğunu kapsayacak şekilde sentezlenir. Hedefler ayrıca kodlayıcı olmayan bölgelerin yanı sıra kodlayıcı bölgelerini de içerir.

Bir örnekte, spesifik nükleik asitleri antisens oligonükleotitler ile hedeflemek tercih edilir. Belirli bir nükleik aside karşı bir antisens bileşiği hedeflemek, çok adımlı bir işlemdir. İşlem genellikle işlevi modüle edilecek olan bir nükleik asit dizisinin tanımlanmasıyla başlar. Bu, örneğin, belirli bir bozukluk veya hastalık durumu ile ilgili bir hücresel

gen (veya genden kopyalanan mRNA) veya örneğin kodlayıcı olmayan RNA (ncRNA) gibi kodlayıcı olmayan bir polinükleotid olabilir.

RNA'lar proteinlere çevrilen (1) haberci RNA'lar (mRNA'lar) ve
5 (2) protein-kodlayıcı olmayan RNA'lar (ncRNA'lar) olarak
sınıflandırılabilir. ncRNA'lar, yüksek yoğunluklu durdurma
kodonları içeren ve herhangi bir "Açık Okuma Çerçevesi"
içermeyen mikroRNA'ları, antisens transkriptlerini ve diğer
Transkripsiyonel Birimlerini (TU) içerir. Birçok ncRNA'nın,
10 protein kodlayıcı lokuslarının 3' translasyona uğramamış
bölgelerinde (3'UTR'ler) başlangıç alanlarından başladığı
görülmektedir. ncRNA'lar sıklıkla nadirdir ve FANTOM
konsorsiyumu tarafından dizilen ncRNA'ların en azından yarısı
poliadenilasyona uğramamış gibi görünmektedir. Çoğu araştırmacı,
15 bariz sebeplerden ötürü işlenen ve sitoplazmaya gönderilen
poliadenilatlanmış mRNA'lara odaklanmıştır. Son zamanlarda,
poliadenilatlanmamış nükleer RNA'ların kümesinin çok büyük
olabildiği ve bu denli fazla transkriptin, intergenik bölgeler
olarak adlandırılan bölgelerden kaynaklandığı gösterilmiştir.
20 ncRNA'ların gen ekspresyonunu regüle edebileceği mekanizma,
hedef transkriptlerle baz eşleşmesidir. Baz eşleştirmesi ile
çalışan RNA'lar, (1) aynı genetik konumda kodlanan, ancak
etkiledikleri RNA'lara zıt iplikler olan ve böylece hedeflerine
mükemmel bir tamamlayıcılık gösteren cis kodlu RNA'lar olarak ve
25 (2) etki ettikleri RNA'lardan farklı bir kromozomal konumda
kodlanan ve genellikle hedefleri ile mükemmel bir baz eşleme
potansiyeli sergilemeyen trans-kodlu RNA'lar olarak
gruplanabilir.

30 Teoriye bağlı kalmak istenmeksizin, burada tarif edilen
antisens oligonükleotitler tarafından antisens polinükleotitin
pertürbasyonu, karşılık gelen haberci sens RNA'ların
ekspresyonunu değiştirebilir. Bununla birlikte, bu düzenleme ya
uyumsuz (haberci RNA yükselmesinde antisens demonte sonuçları)
35 ya da uyumlu olabilir (konkomitant haberci RNA azalmasında

antisens demonte sonuçları). Bu durumlarda, antisens oligonükleotitleri, onun demonte edilmesine veya sekestrasyonuna yol açan, antisens transkriptinin çakışan veya çakışmayan kısımlarına hedeflenebilir. Kodlayıcı olmayan antisensin yanı sıra kodlayıcı antisens de aynı şekilde hedeflenebilir ve her iki kategori de, karşılık gelen sens transkriptlerini - uyumlu veya uyumsuz bir şekilde - regüle edebilir. Bir hedefe karşı kullanılmak üzere yeni oligonükleotitlerin tanımlanmasında kullanılan stratejiler, antisens RNA transkriptlerinin antisens oligonükleotitler tarafından demonte edilmesine veya istenen hedefi modüle etmeye yönelik başka herhangi bir yola dayandırılabilir.

Strateji 1: Uyumsuz regülasyon durumunda, antisens transkripsiyonun demontesi, geleneksel (sens) genin ekspresyonunu yükseltir. Bu son gen bilinen veya varsayılan bir ilaç hedefi için kodlanırsa, antisens muadilinin demontesi, bir reseptör agonistinin veya bir enzim uyarıcısının etkisini taklit edebilir.

Strateji 2: Uyumlu regülasyon durumunda, hem antisens hem de transkriptleri konkomitant olarak demonte edebilir ve böylece geleneksel (sens) gen ekspresyonunun sinerjistik olarak azalmasını sağlayabilir. Örneğin, demonte etmek için bir antisens oligonükleotit kullanılırsa, daha sonra bu strateji, sens transkriptine hedeflenen bir antisens oligonükleotiti ve karşılık gelen antisens transkriptine bir başka antisens oligonükleotiti veya eş zamanlı olarak örtüşen sens ve antisens transkriptlerini hedefleyen tek bir enerjisel simetrik antisens oligonükleotiti uygulamak için kullanılabilir.

Mevcut açıklamaya göre, antisens bileşikleri arasında antisens oligonükleotitler, ribozimler, harici kılavuz dizisi (EGS) oligonükleotitleri, siRNA bileşikleri, siRNA bileşikleri gibi tek veya çift iplikli RNA interferans (RNAi) bileşikleri ve hedef

nükleik asidin en azından bir bölümüne hibritlenen ve işlevini modüle eden diğer oligomerik bileşikler bulunur. Bu şekilde bunlar, DNA, RNA, DNA benzeri, RNA benzeri veya bunların karışımları olabilir veya bunlardan bir veya daha fazlasının taklitleri olabilir. Bu bileşikler, tek iplikli, çift iplikli, dairesel veya firkete oligomerik bileşikler olabilir ve dahili veya terminal çıkıntılar, yanlış eşleşmeler veya ilmekler gibi yapısal elemanlar içerebilir. Antisens bileşikleri, rutin olarak doğrusal olarak hazırlanırlar, ancak dairesel ve/veya dallanmış olmak için birleştirilebilir veya başka şekilde hazırlanabilirler. Antisens bileşikleri, örneğin tamamen ya da kısmen çift-iplikli bir bileşik ya da hibridizasyona ve tamamen ya da kısmen çift-iplikli bir bileşiğin oluşmasına izin vermek için yeterli kendi kendini tamamlayıcılığı olan tek bir iplik oluşturmak üzere hibritlenmiş iki iplikli gibi yapıları içerebilir. İki iplik, dahili olarak serbest 3' veya 5' terminustan ayrılabilir veya sürekli bir firkete yapısı veya ilmek oluşturmak üzere bağlanabilir. Firkete yapısı, tek iplikli bir karakterin bir uzantısını üreten 5' veya 3' terminusunda bir çıkıntı içerebilir. Çift iplikli bileşikler isteğe bağlı olarak uçlarda çıkıntılar içerebilir. Diğer modifikasyonlar, terminuslardan birine, seçilmiş nükleotid konumlarına, şeker konumlarına veya nükleositler arası bağlantılardan birine bağlı konjugat gruplarını içerebilir. Alternatif olarak, iki iplik, nükleik asit olmayan bir parça veya bağlayıcı grup yoluyla bağlanabilir. Sadece bir iplikten oluşturulduğunda, dsRNA, bir dupleks oluşturmak üzere kendi kendine ikiye katlanan kendi kendini tamamlayıcı, firkete tipi bir molekül şeklini alabilir. Böylece, dsRNA'lar tamamen veya kısmen çift iplikli olabilir.

Gen ekspresyonunun spesifik modülasyonu, transjenik hücre çizgilerinde dsRNA firketelerinin stabil ekspresyonu ile başarılabılır, ancak bazı durumlarda gen ekspresyonu veya fonksiyonu yukarı regüle edilir. İki iplikten oluşturulduğunda veya kendi kendini tamamlayıcı firkete tipi bir molekülün şeklini alan tek bir iplik, bir dupleks oluşturmak üzere kendi

üzerine ikiye katlandığında, iki iplik (veya tek bir ipliğin dupleks oluşturuıcı bölgeleri), Watson-Crick tarzında baz çifti olan tamamlayıcı RNA iplikleridir.

5 Bir sisteme sokulduktan sonra, açıklamanın bileşikleri, hedef nükleik asidin parçalanmasını veya başka bir modifikasyonunu gerçekleştirmek için bir veya daha fazla enzimin veya yapısal proteinin etkisini ortaya çıkarabilir veya doluluk temelli mekanizmalar yoluyla çalışabilir. Genel olarak, nükleik asitler
10 (oligonükleotitler dahil) "DNA benzeri" (yani, genellikle bir veya daha fazla 2'-deoksi şekerine ve genellikle U bazından ziyade T'ye sahiptir) veya "RNA benzeri" (yani, genellikle bir veya daha fazla 2'-hidroksil veya 2'-değiştirilmiş şekere ve genellikle T bazlarından ziyade U'ya sahiptir) olarak tarif
15 edilebilir. Nükleik asit iplikleri, birden fazla tipte yapıyı, en çok A ve B biçimlerini benimseyebilir. Genel olarak, B-formuna benzer yapıya sahip olan oligonükleotitlerin "DNA benzeri" olduğu ve A-biçimli yapıya sahip olanların "RNA benzeri" olduğuna inanılmaktadır. Bazı (kimerik) durumlarda, bir antisens
20 bileşiği hem A hem de B-biçimli bölgeleri içerebilir.

Bir örnekte, istenen oligonükleotitler veya antisens bileşikleri, aşağıdakilerden en az birini içerir: antisens RNA, antisens DNA, kimerik antisens oligonükleotitler, modifiye
25 edilmiş bağlar içeren antisens oligonükleotitler, interferans RNA (RNAi), kısa interferans RNA (siRNA); mikro, interferans RNA (miRNA); küçük, temporal bir RNA (stRNA); veya kısa bir firkete RNA (shRNA); küçük RNA-kaynaklı gen aktivasyonu (RNAa); küçük aktive edici RNA'lar (saRNA'lar) veya bunların kombinasyonları.

30

dsRNA ayrıca, "küçük RNA-kaynaklı gen aktivasyonu" veya RNAa olarak adlandırılan bir mekanizmayı, gen ekspresyonunu aktifleştirebilir. Gen promotörlerini hedefleyen dsRNA'lar, ilişkili genlerin güçlü transkripsiyonel aktivasyonunu indükler.
35 RNAa, "küçük aktive edici RNA'lar" (saRNA'lar) olarak

adlandırılan sentetik dsRNA'lar kullanılarak insan hücrelerinde gösterilmiştir. Şu anda RNAa'nın diğer organizmalarda korunup korunmadığı bilinmemektedir.

5 Küçük interferanslı RNA (siRNA) ve mikroRNA (miRNA) gibi küçük çift zincirli RNA (dsRNA), RNA interferansı (RNAi) olarak bilinen evrimsel olarak korunmuş bir mekanizmanın tetikleyicisi olarak bulunmuştur. RNAi değişmez bir şekilde yeniden modelleme kromatiniyle gen susturmaya, böylece transkripsiyonu bastırmaya, 10 tamamlayıcı mRNA'yı indirgemeye veya protein translasyonunu bloke etmeye yol açar. Bununla birlikte, takip eden örnekler bölümünde detaylı olarak tarif edilen durumlarda, oligonükleotitlerin, Beyinden kaynaklı nörotrofik faktör (BKNF) polinükleotidlerinin ve kodlanmış ürünlerinin ekspresyonunu ve/ 15 veya fonksiyonunu arttırdığı gösterilmiştir. dsRNA'lar aynı zamanda küçük aktive edici RNA'lar (saRNA) olarak da davranabilir. Teori ile sınırlanmaksızın, gen promotörlerinde dizileri hedefleyerek, saRNA'lar dsRNA ile indüklenen transkripsiyonel aktivasyon (RNAa) olarak adlandırılan bir 20 fenomende hedef gen ekspresyonunu indükleyecekti.

Başka bir örnekte, burada tanımlanan "tercih edilen hedef bölümler", Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BKNF) polinükleotidlerinin ekspresyonunu modüle eden ek bileşikler 25 için bir ekranda kullanılabilir. "Modülatörler", BKNF'yi kodlayan bir nükleik asit molekülünün ekspresyonunu azaltan veya arttıran ve tercih edilen bir hedef bölüme tamamlayıcı olan en az 5 nükleotid kısım içeren bileşiklerdir. Tarama yöntemi, BKNF'nin sens veya doğal antisens polinükleotidlerini kodlayan 30 bir nükleik asit molekülünün tercih edilen bir hedef bölümünü bir veya daha fazla aday modülatör ile temas ettirme ve BKNF polinükleotidlerini, örn., DİZİ KİM. NO: 12 ila 49'u kodlayan bir nükleik asit molekülünün ekspresyonunu azaltan veya arttıran bir veya daha fazla aday modülatör için seçim adımlarını içerir. 35 Aday modülatör veya modülatörlerin BKNF polinükleotidlerini

kodlayan bir nükleik asit molekülünün ekspresyonunu modüle (örn., azaltan ya da artıran) edebildikleri gösterildikten sonra, modülatör daha sonra BKNF polinükleotidlerinin fonksiyonuyla ilgili başka araştırma çalışmalarında veya mevcut açıklamaya göre bir araştırma, teşhis veya terapötik ajan olarak kullanım için kullanılabilir.

Doğal antisens dizisini hedeflemek, tercihen hedef genin işlevini modüle eder. Örneğin, BKNF geni (örn., Erişim numarası NM_170735 ve NM_007540). Bir örnekte hedef, BKNF geninin bir antisens polinükleotitidir. Bir örnekte, bir antisens oligonükleotiti, BKNF polinükleotidlerinin (örn., Erişim numarası NM_170735 ve NM_007540), varyantların, alellerin, izoformların, homologların, mutantların, türevlerin, fragmanların ve tamamlayıcı dizilerin sens ve/ veya doğal antisens dizilerini hedefler. Tercihen oligonükleotit, bir antisens moleküldür ve hedefler, antisens ve/ veya sens BKNF polinükleotidlerinin kodlayıcı ve kodlayıcı olmayan bölgelerini içerir.

Mevcut açıklamanın tercih edilen hedef bölümlerleri, ayrıca, stabilize edilmiş çift iplikli (duplekslenmiş) oligonükleotitler oluşturmak için mevcut açıklamanın tamamlayıcı antisens bileşikleri ile birleştirilebilir.

Bu çift iplikli oligonükleotit kısımları, teknikte hedef ekspresyonu modüle etmek ve translasyonu düzenlemek ve ayrıca bir antisens mekanizması yoluyla RNA'nın işlenmesi için gösterilmiştir. Ayrıca, çift iplikli kısımlar kimyasal modifikasyonlara tabi olabilir. Örneğin, bu tür çift iplikli kısımların hedefe karşı dubleksin antisens ipliğinin klasik hibridizasyonu ile hedefi inhibe ettiği, böylece hedefin enzimatik bozulmasını tetiklediği gösterilmiştir.

Bir örnekte, bir antisens oligonükleotiti, Beyin kaynaklı

nörotrofik faktör (BKNF) polinükleotidlerini (örn., Erişim numarası NM_170735 ve NM_007540), varyantları, alelleri, homologları, mutantları, türevleri, fragmanları ve tamamlayıcı dizileri hedefler. Tercihen oligonükleotit bir antisens molekülüdür.

Açıklamanın örneklerine göre, hedef nükleik asit molekülü, tek başına BKNF ile sınırlı değildir, ancak bunun bir BKNF ekspresyon ürününü ve/ veya bunun herhangi bir izoformunu üreten, etkileyen, tesir eden veya bunlarla sonuçlanan herhangi bir polinükleotit varyantına ve herhangi bir polinükleotide uzanır.

Bir örnekte, bir oligonükleotit, BKNF polinükleotidlerinin doğal bir antisens dizisini, örneğin DİZİ KİM. NO: 3 ila 11 olarak belirtilen polinükleotidleri ve bunlara ait varyantları, alelleri, homologları, mutantları, türevleri, fragmanları ve tamamlayıcı dizileri hedefler. Antisens oligonükleotitlerin örnekleri DİZİ KİM NO: 12 ila 49 olarak verilmiştir.

Bir örnekte, oligonükleotitler BKNF antisensinin bunlarla sınırlı olmamak üzere BKNF polinükleotidleri ile ilişkili kodlayıcı olmayan sens ve/ veya antisens dizileri olan nükleik asit dizilerine tamamlayıcıdır veya bunlara bağlanır ve BKNF molekülünün ekspresyonunu ve/ veya fonksiyonunu modüle eder.

Bir örnekte, oligonükleotitler, DİZİ KİM. NO: 3 ila 11 olarak belirtilen ve BKNF molekülünün ekspresyonunu ve/ veya fonksiyonunu modüle eden BKNF doğal antisensinin nükleik asit dizilerine tamamlayıcıdır veya bağlanır.

Bir örnekte, oligonükleotitler, DİZİ KİM. NO: 12 ila 49'un en az 5 ardışık nükleotidine sahip dizileri içerir ve BKNF molekülünün ekspresyonunu ve/ veya fonksiyonunu modüle eder.

Polinükleotit hedefler, bunun aile üyeleri de dahil olmak üzere

BKNF'yi, BKNF'nin varyantlarını; SNP'ler de dahil olmak üzere BKNF mutantlarını; BKNF'nin kodlayıcı olmayan dizilerini; BKNF'nin alellerini; tür varyantlarını, fragmanları ve benzerlerini içerir. Tercihen oligonükleotit bir antisens
5 molekülüdür.

Bir örnekte BKNF polinükleotitlerini hedefleyen oligonükleotit şunları içerir: antisens RNA, interferans RNA (RNAi), kısa interferans RNA (siRNA); mikro interferans RNA (miRNA); küçük,
10 temporal bir RNA (stRNA); veya kısa bir firkete RNA (shRNA); küçük RNA-kaynaklı gen aktivasyonu (RNAa); veya küçük aktive edici RNA (saRNA).

Bir örnekte, Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BKNF)
15 polinükleotidlerinin, örn. DİZİ KİM. NO: 3 ila 55'in hedeflenmesi, bu hedeflerin ekspresyonunu veya fonksiyonunu modüle eder. Bir örnekte, bir kontrol ile kıyaslandığında ekspresyon veya fonksiyon yukarı regüle edilir. Bir örnekte, bir kontrol ile karşılaştırıldığında ekspresyon veya fonksiyon aşağı
20 regüle edilir.

Bir örnekte, antisens bileşikleri DİZİ KİM. NO: 12 ila 49 olarak belirtilen dizileri içerir. Bu oligonükleotitler, bir veya daha fazla modifiye edilmiş nükleotid, daha kısa veya daha
25 uzun fragmanlar, modifiye edilmiş bağlar ve benzerlerini içerebilir.

Bir örnekte, DİZİ KİM. NO: 12 ila 49, bir veya daha fazla LNA nükleotit içerir. Tablo 1, açıklama yöntemlerinde faydalı örnek
30 antisens oligonükleotitleri göstermektedir.

Tablo 1:

Dizi KİMLİK	Antisens Dizi İsmi	Dizi
DİZİ NO:12	KİM. CUR-2046 (Antisens)	ArArCrArArArCrArArCrUrGrGrUrGrArGrCrCr UrGrG
DİZİ NO:13	KİM. CUR-2047 (Antisens)	rUrGrArGrCrCrUrArArGrArUrArCrArUrUrGrC rUrCrU
DİZİ NO:14	KİM. CUR-2048 (Antisens)	rGrUrGrCrUrGrUrUrGrUrArArGrArUrUrArGrC rCrArC
DİZİ NO:15	KİM. CUR-2049 (Antisens)	rArArUrGrArCrArUrGrUrUrUrGrUrArGrGrGrA rGrCrC
DİZİ NO:16	KİM. CUR-2050	+C*mC*mA*+G*mG*mU*+G*mU*mG*mC*+G*mG*mA *+C
DİZİ NO:17	KİM. CUR-2051	+C*mC*mA*+U*mG*mG*+G*mA*mC*mU*+C*mU*mG *+G
DİZİ NO:18	KİM. CUR-2052	+A*mG*mA*+G*mC*mG*+U*mG*mA*mA*+U*mG*mG *+G
DİZİ NO:19	KİM. CUR-2053	+C*mC*mC*+A*mA*mG*+G*mC*mA*mG*+G*mU*mU *+C

Dizi KİMLİK	Antisens Dizi İsmi	Dizi
DİZİ NO:20	KİM. CUR-2054	+A*mA*mG*+A*mU*mG*+C*mU*mU*mG*+A*mC*mA* *+U
DİZİ NO:21	KİM. CUR-2055	+C*mA*mU*+U*mG*mG*+C*mU*mG*mA*+C*mA*mC* *+U
DİZİ NO:22	KİM. CUR-2056	+U*mU*mC*+G*mA*mA*+C*mA*mC*mG*+U*mG*mA* *+U
DİZİ NO:23	KİM. CUR-2057	+A*mG*mA*+A*mG*mA*+G*mC*mU*mG*+U*mU*mG* *+G
DİZİ NO:24	KİM. CUR-2058	+A*mU*mG*+A*mG*mG*+A*mC*mC*mA*+G*mA*mA* *+A
DİZİ NO:25	KİM. CUR-2059	+G*mU*mU*+C*mG*mG*+C*mC*mC*mA*+A*mU*mG* *+A
DİZİ NO:26	KİM. CUR-2060	+A*mG*mA*+A*mA*mA*+C*mA*mA*mU*+A*mA*mG* *+G
DİZİ NO:27	KİM. CUR-2061	+A*mC*mG*+C*mA*mG*+A*mC*mU*mU*+G*mU*mA* *+C

Dizi KİMLİK	Antisens Dizi İsmi	Dizi
DİZİ NO:28	KİM. CUR-2062	+A*mC*mG*+U*mC*mC*+A*mG*mG*mG*+U*mG*mA*+U
DİZİ NO:29	KİM. CUR-2063	+G*mC*mU*+C*mA*mG*+U*mA*mG*mU*+C*mA*mA*+G
DİZİ NO:30	KİM. CUR-2064	+U*mG*mC*+C*mU*mU*+U*mG*mG*mA*+G*mC*mC*+U
DİZİ NO:31	KİM. CUR-2065	+C*mC*mU*+C*mU*mU*+C*mU*mC*mU*+U*mU*mC*+U
DİZİ NO:32	KİM. CUR-2066	+C*+C*+C*G*G*T*A*T*C*C*A*A*A*+G*+G*+ C
DİZİ NO:33	KİM. CUR-2067	+G*+T*+A*T*T*A*G*C*G*A*G*T*G*+G*+G*+ T
DİZİ NO:34	KİM. CUR-2068	+G*+T*+C*T*A*T*G*A*G*G*G*T*T*+C*+G*+ G
DİZİ NO:35	KİM. CUR-2069	+C*+C*+T*C*C*T*C*T*A*C*T*C*T*+T*+T*+ C
DİZİ NO:36	KİM. CUR-2070	+G*+G*+C*A*G*G*T*T*C*G*A*G*A*+G*+G*+ T
DİZİ NO:37	KİM. CUR-2071	+T*+T*+C*C*T*T*C*C*C*A*C*A*G*+T*+T*+ C
DİZİ NO:38	KİM. CUR-2072	+C*+G*+G*T*T*G*C*A*T*G*A*A*G*+G*+C*+ G

Dizi KİMLİK	Antisens Dizi İsmi	Dizi
DİZİ NO:39	KİM. CUR-2073	+T*+G*+G*C*T*G*G*C*G*A*T*T*C*+A*+T*+ A
DİZİ NO:40	KİM. CUR-2074	+C*+A*+A*C*A*T*A*T*C*A*G*G*A*+G*+C*+ C
DİZİ NO:41	KİM. CUR-2075	+T*+G*+T*A*T*T*C*C*A*G*A*A*+C*+T*+ T
DİZİ NO:42	KİM. CUR-2076 (Antisens)	rUrArUrGrGrUrUrArUrUrUrCrArUrArCrUrUrC rGrGrUrUrGrCrArUrG
DİZİ NO:43	KİM. CUR-2077 (Antisens)	rArGrArArGrUrArArArCrGrUrCrCrArCrGrGrA rCrArArGrGrCrArArC
DİZİ NO:44	KİM. CUR-2078 (Antisens)	rArUrUrUrCrUrArCrGrArGrArCrCrArArGrUrG rUrArArUrCrCrCrArU
DİZİ NO:45	KİM. CUR-2079 (Antisens)	rUrArArGrGrArCrGrCrGrGrArCrUrUrGrUrArC rArCrUrUrCrCrGrGrG
DİZİ NO:46	KİM. CUR-2080 (Antisens)	rArGrArArArGrArArArGrUrUrCrUrArArCrCrU rGrUrUrCrUrGrUrGrU
DİZİ NO:47	KİM. CUR-2081	+G*+A*+T*T*T*C*A*G*A*G*C*C*G*+C*+A*+ G
DİZİ NO:48	KİM. CUR-2082	+G*+A*+C*A*C*A*T*C*C*A*T*C*C*+C*+A*+ G
DİZİ NO:49	KİM. CUR-2083	+C*+C*+T*C*G*T*C*A*T*G*T*C*T*+G*+T*+ G

Dizi KİMLİK	Antisens Dizi İsmi	Dizi
DİZİ NO:50	KİM. CUR-0071	C*+T*+T*G*A*A*T*T*G*T*T*T*+G*+T*+A
DİZİ NO:51	KİM. CUR-0072	A*+G*+T*T*G*C*A*A*G*A*G*T*+T*+G*+G
DİZİ NO:52	KİM. CUR-0073	A*+T*+C*T*G*T*T*C*T*G*C*T*+G*+T*+C
DİZİ NO:53	KİM. CUR-0074	C*+A*+T*A*T*T*C*T*T*G*G*A*+C*+G*+A
DİZİ NO:54	KİM. CUR-0075	T*+G*+T*G*C*T*G*T*T*G*T*A*+A*+G*+A
DİZİ NO:55	KİM. CUR-0076	T*+G*+A*C*A*G*A*G*G*A*G*T*+A*+T*+T

İstenen bir hedef nükleik asidin modülasyonu, teknikte bilinen çeşitli yollarla gerçekleştirilebilir. Örneğin, antisens oligonükleotitler, siRNA vb. enzimatik nükleik asit molekülleri (örn., Ribozimler), nükleotid baz dizisine spesifik bir şekilde diğer ayrı nükleik asit moleküllerini tekrar tekrar bölme yeteneği dahil olmak üzere çeşitli reaksiyonların bir veya daha fazlasını katalize edebilen nükleik asit molekülleridir. Bu gibi enzimatik nükleik asit molekülleri, örneğin, hemen hemen her RNA transkriptini hedeflemek için kullanılabilir.

Diziye spesifik olmalarından dolayı, trans bölünen enzimatik nükleik asit molekülleri, insan hastalığı için terapötik maddeler olarak umut vermektedir. Enzimatik nükleik asit molekülleri, hücresel RNA'nın arka planı içindeki spesifik RNA hedeflerini parçalamak için tasarlanabilir. Böyle bir bölünme olayı, mRNA'yı işlevsel olmayan hale getirir ve bu RNA'dan protein ekspresyonunu iptal eder. Bu şekilde, bir hastalık

durumu ile ilişkili bir proteinin sentezi seçici olarak inhibe edilebilir.

Genel olarak, RNA parçalama aktivitesine sahip olan enzimatik nükleik asitler, bir hedef RNA'ya ilk bağlanma ile etki ederler. Bu bağlanma, hedef RNA'yı parçalamak üzere hareket eden molekülün bir enzimatik kısmına yakın bir yerde tutulan bir enzimatik nükleik asidin hedef bağlama kısmı boyunca gerçekleşir. Bu nedenle, enzimatik nükleik asit, ilk olarak, bir hedef RNA'yı tanır ve tamamlayıcı baz eşleme yoluyla ve bağlanır ve bir kez doğru yere bağlandığında, hedef RNA'yı kesmek için enzimatik olarak hareket eder. Bu tür bir hedef RNA'nın stratejik bölünmesi, kodlanmış bir proteinin sentezini değiştirme yeteneğini ortadan kaldıracaktır. Bir enzimatik nükleik asit, RNA hedefine bağlandıktan ve ayrıldıktan sonra, başka bir hedef aramak için bu RNA'dan salınır ve tekrar tekrar yeni hedeflere bağlanabilir ve ayrılabilir.

İn vitro seçim (evrim) stratejileri (Orgel, (1979) Proc. R. Soc. London, B 205, 435) gibi çeşitli yaklaşımlar, fosfodiester bağlarının ve amid bağlarının ayrılması ve ligasyonu gibi çeşitli reaksiyonları katalize edebilen yeni nükleik asit katalizörlerini geliştirmek için kullanılmıştır.

Katalitik aktivite için optimal olan ribozimlerin gelişimi, gen ekspresyonunun düzenlenmesi amacıyla RNA-parçalayan ribozimler kullanan herhangi bir stratejiye önemli ölçüde katkıda bulunacaktır. Çekiç başlı ribozim, örneğin doymuş (10 mM) Mg^{2+} + kofaktör konsantrasyonlarının varlığında yaklaşık 1 dak-1 katalitik hız (kcat) ile çalışır. Yapay bir "RNA ligaz" riboziminin, karşılık gelen kendi kendini değiştirme reaksiyonunu yaklaşık 100 dak-1 oranında katalize ettiği gösterilmiştir. Ek olarak, DNA'dan yapılan substrat bağlama kollarına sahip olan bazı modifiye edilmiş çekiç başlı ribozimlerin, 100 dak-1'e yaklaşan çoklu dönüş oranlarıyla

RNA'yı katalize ettiği bilinmektedir. Son olarak, eki başının katalitik çekirdeği içindeki belirli bir kalıntının bazı nükleotid analogları ile değiştirilmesi, katalitik hızda 10 katlık bir iyileşme gösteren modifiye ribozimler verir. Bu bulgular, ribozimlerin, çoğu doğal kendi kendine parçalanan ribozimler tarafından in vitro olarak gösterilenlerden önemli ölçüde daha büyük olan katalitik oranlarla kimyasal dönüşümleri destekleyebileceğini göstermektedir. Bundan sonra, bazı kendiliğinden kıvrılan ribozimlerin yapılarının, maksimum katalitik aktivite vermek üzere optimize edilebilmesi veya RNA fosfodiester bölünmesi için önemli ölçüde daha hızlı oranlar sergileyen tamamen yeni RNA motiflerinin yapılabilmesi mümkündür.

Bir RNA substratının "eki başı" modeline uyan bir RNA katalizör ile moleküller arası bölünmesi ilk olarak 1987'de gösterilmiştir (Uhlenbeck, O.C. (1987) Nature, 328: 596-600). RNA katalizörü geri kazanılmış ve gerçekten katalitik olduğunu gösteren oklu RNA molekülleri ile reaksiyona sokulmuştur.

"eki başı" motifine dayalı olarak tasarlanan katalitik RNA'lar, hedef dizilerle gerekli baz eşleşmesini muhafaza etmek için katalitik RNA'da uygun baz değişikliklerini yaparak spesifik hedef dizileri parçalamak için kullanılmıştır. Bu, katalitik RNA'nın spesifik hedef dizileri ayırmasına izin vermiş ve "eki başı" modeline göre tasarlanan katalitik RNA'ların in vivo olarak spesifik substrat RNA'larını muhtemelen ayırabildiğini göstermiştir.

RNA interferansı (RNAi), memelilerde ve memeli hücrelerinde gen ekspresyonunu modüle etmek için güçlü bir araç haline gelmiştir. Bu yaklaşım, bir ekspresyon plazmidi veya virüsü ve siRNA'lara işlenen kk firkete RNA'ları için kodlayıcı dizisi kullanılarak RNA'nın kendisi olarak veya DNA olarak kk interferans RNA'nın (siRNA) verilmesini gerektirir. Bu sistem, pre-siRNA'ların aktif oldukları sitoplazmaya etkili bir şekilde

nakledilmesini sağlar ve gen ekspresyonu için düzenlenmiş ve dokuya spesifik promotörlerin kullanımına izin verir.

Bir örnekte, bir oligonükleotit veya antisens bileşiği bir oligomer veya ribonükleik asit (RNA) ve/ veya deoksiribonükleik asit (DNA) veya bunların bir mimetik, kimera, analog veya homologunu içerir. Bu terim, doğal olarak oluşan nükleotitler, şekerler ve kovalent internükleosit (omurga) bağlarından oluşan oligonükleotitlerin yanı sıra benzer şekilde işlev gören, doğal olarak oluşmayan bölümlere sahip olan oligonükleotitleri içerir. Bu tür modifiye edilmiş veya ornatılmış oligonükleotitler, örneğin, arttırılmış hücre sel alım, hedef nükleik asit için artmış afinite ve nükleazların varlığında artan stabilite gibi istenen özellikler nedeniyle, genellikle doğal formlara nazaran arzu edilir.

Mevcut açıklamaya göre, oligonükleotitler veya antisens bileşikler arasında antisens oligonükleotitler (örn., RNA, DNA, taklit, kimera, analog veya homologue), ribozimler, harici kılavuz dizisi (EGS) oligonükleotitleri, siRNA bileşikler, siRNA bileşikler gibi tek veya çift iplikli RNA interferans (RNAi) bileşikler, saRNA, aRNA ve hedef nükleik asidin en azından bir bölümüne hibritlenen ve işlevini modüle eden diğer oligomerik bileşikler bulunur. Bu şekilde bunlar, DNA, RNA, DNA benzeri, RNA benzeri veya bunların karışımları olabilir veya bunlardan bir veya daha fazlasının taklitleri olabilir. Bu bileşikler, tek iplikli, çift iplikli, dairesel veya firkete oligomerik bileşikler olabilir ve dahili veya terminal çıkıntılar, yanlış eşleşmeler veya ilmekler gibi yapısal elemanlar içerebilir. Antisens bileşikler, rutin olarak doğrusal olarak hazırlanırlar, ancak dairesel ve/ veya dallanmış olmak için birleştirilebilir veya başka şekilde hazırlanabilirler. Antisens bileşikler, örneğin tamamen ya da kısmen çift-iplikli bir bileşik ya da hibridizasyona ve tamamen ya da kısmen çift-iplikli bir bileşiğin oluşmasına izin vermek

için yeterli kendi kendini tamamlayıcılığı olan tek bir iplik oluşturmak üzere hibritlenmiş iki iplikli gibi yapıları içerebilir. İki iplik, dahili olarak serbest 3' veya 5' terminustan ayrılabilir veya sürekli bir firkete yapısı veya
5 ilmek oluşturmak üzere bağlanabilir. Firkete yapısı, tek iplikli bir karakterin bir uzantısını üreten 5' veya 3' terminusunda bir çıkıntı içerebilir. Çift iplikli bileşikler isteğe bağlı olarak uçlarda çıkıntılar içerebilir. Diğer modifikasyonlar, terminuslardan birine, seçilmiş nükleotid konumlarına, şeker
10 konumlarına veya nükleositler arası bağlantılardan birine bağlı konjugat gruplarını içerebilir. Alternatif olarak, iki iplik, nükleik asit olmayan bir parça veya bağlayıcı grup yoluyla bağlanabilir. Sadece bir iplikten oluşturulduğunda, dsRNA, bir dupleks oluşturmak üzere kendi kendine ikiye katlanan kendi
15 kendini tamamlayıcı, firkete tipi bir molekül şeklini alabilir. Böylece, dsRNA'lar tamamen veya kısmen çift iplikli olabilir. Gen ekspresyonunun spesifik modülasyonu, transjenik hücre çizgilerinde dsRNA firketelerinin kararlı ekspresyonu ile elde edilebilir. İki iplikten oluşturulduğunda veya kendi kendini
20 tamamlayıcı firkete tipi bir molekülün şeklini alan tek bir iplik, bir dupleks oluşturmak üzere kendi üzerine ikiye katlandığında, iki iplik (veya tek bir ipliğin dupleks oluşturucu bölgeleri), Watson-Crick tarzında baz çifti olan tamamlayıcı RNA iplikleridir.

25

Bir sisteme sokulduktan sonra, açıklamanın bileşikleri, hedef nükleik asidin parçalanmasını veya başka bir modifikasyonunu gerçekleştirmek için bir veya daha fazla enzimin veya yapısal proteinin etkisini ortaya çıkarabilir veya doluluk temelli
30 mekanizmalar yoluyla çalışabilir. Genel olarak, nükleik asitler (oligonükleotitler dahil) "DNA benzeri" (yani, genellikle bir veya daha fazla 2'-deoksi şekerine ve genellikle U bazlarından ziyade T'ye sahiptir) veya "RNA benzeri" (yani, genellikle bir veya daha fazla 2'-hidroksil veya 2'-değiştirilmiş şekere ve
35 genellikle T bazlarından ziyade U'ya sahiptir) olarak tarif

edilebilir. Nükleik asit iplikleri, birden fazla tipte yapıyı, en çok A ve B biçimlerini benimseyebilir. Genel olarak, B-formuna benzer yapıya sahip olan oligonükleotitlerin "DNA benzeri" olduğu ve A-biçimli yapıya sahip olanların "RNA benzeri" olduğu inandırılmaktadır. Bazı (kimerik) durumlarda, bir antisens bileşiği hem A- hem de B-biçimli bölgeleri içerebilir.

Bu açıklamaya uygun antisens bileşikleri, uzunluk olarak yaklaşık 5 ila yaklaşık 80 nükleotit (yani yaklaşık 5 ila yaklaşık 80 bağıl nükleosit) içeren bir antisens kısmı içerebilir. Bu, antisens ipliğinin veya antisens bileşiğinin bir kısmının uzunluğunu ifade eder. Başka bir deyişle, açıklamanın tek iplikli bir antisens bileşiği, 5 ila yaklaşık 80 nükleotid içerir ve açıklamanın (örneğin bir dsRNA gibi) bir çift iplikli antisens bileşiği, bir sens ve bir antisens ipliği veya 5 ila yaklaşık 80 nükleotid uzunluğunun bir kısmını içerir. Teknikte uzman bir kişi, bunun uzunluk olarak 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 veya 80 nükleotit veya bunların herhangi bir aralığı kadar nükleotitlik antisens kısımlarını dahil ettiğini takdir edecektir.

Bir örnekte, açıklamanın antisens bileşikleri, 10 ila 50 nükleotid uzunluğunda antisens kısımlarına sahiptir. Teknikte uzman bir kişi, bunun, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, veya 50 veya bunların herhangi bir aralığı kadar nükleotitlik antisens kısımlarına sahip oligonükleotitleri içerdiğini takdir edecektir. Bazı durumlarda, oligonükleotitler uzunluk olarak 15 nükleotittir.

Bir örnekte, açıklamanın antisens veya oligonükleotit bileşikleri, 12 veya 13 ila 30 nükleotid uzunluğunda antisens kısımlarına sahiptir. Teknikte uzman bir kişi, bunun, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 veya 30 veya bunların herhangi bir aralığı kadar nükleotitlik antisens kısımlarına sahip antisens bileşiklerini içerdiğini takdir edecektir.

10 Bir örnekte, mevcut açıklamanın oligomerik bileşikleri, aynı zamanda, bileşiğin içindeki nükleotit pozisyonlarının bir veya daha fazlasında farklı bir bazın mevcut olduğu varyantları da içerir. Örneğin, birinci nükleotid bir adenozin ise, bu konumda timidin, guanosin, sitidin içeren varyantlar üretilebilir. Bu, antisens veya dsRNA bileşikleri konumlarından herhangi birinde yapılabılır. Bu bileşikler daha sonra, bir hedef nükleik asidin ekspresyonunu inhibe etme kabiliyetlerini belirlemek için burada tarif edilen yöntemler kullanılarak test edilir.

20 Bazı durumlarda, antisens bileşik ve hedef arasında homoloji, dizi özdeşliği veya tamamlayıcılık yaklaşık %40 ila yaklaşık %60 arasındadır. Bazı durumlarda, homoloji, dizi özdeşliği veya tamamlayıcılık yaklaşık %60 ila yaklaşık %70 arasındadır. Bazı durumlarda, homoloji, dizi özdeşliği veya tamamlayıcılık yaklaşık %70 ila yaklaşık %80 arasındadır. Bazı durumlarda, homoloji, dizi özdeşliği veya tamamlayıcılık yaklaşık %80 ila yaklaşık %90 arasındadır. Bazı durumlarda, homoloji, dizi özdeşliği veya tamamlayıcılığı yaklaşık %90, yaklaşık %92, yaklaşık %94, yaklaşık %95, yaklaşık %96, yaklaşık %97, yaklaşık %98, yaklaşık %99 veya yaklaşık %100'dür.

Bir örnekte, örneğin DİZİ KİM. NO: 12 ila 49'da belirtilen nükleik asit molekülleri gibi antisens oligonükleotitleri bir veya daha fazla ornatım veya modifikasyon içerir. Bir örnekte, nükleotidler kilitli nükleik asitler (LNA) ile ornatılır.

Bir örnekte, oligonükleotitler, nükleik asit moleküllerinin bir veya daha fazla bölgesini, BKNF ile bağlantılı kodlayıcı ve/veya kodlayıcı olmayan dizilerin sens ve/veya antisensini ve
5 DİZİ KİM. NO: 1 ila 11 olarak belirtilen dizileri hedefler. Oligonükleotitler ayrıca DİZİ KİM. NO: 1 ila 11 arasındaki çakışan bölgeleri hedef alır.

Bu açıklamanın belirli tercih edilen oligonükleotitleri
10 kimerik oligonükleotitlerdir. Bu açıklama bağlamında "kimerik oligonükleotitler" veya "kimeralar", her biri en az bir nükleotitten oluşan iki veya daha fazla kimyasal olarak ayrı bölgeyi içeren oligonükleotitlerdir. Bu oligonükleotitler tipik olarak, bir veya daha fazla faydalı özellik (örneğin, artan
15 nükleaz direnci, hücrelere daha fazla alım, hedef için bağlanma afinitesi gibi) kazandıran en az bir modifiye edilmiş nükleotid bölgesini ve RNA: DNA veya RNA: RNA hibridlerini ayırabilen enzimler için bir substrat olan bir bölgeyi içerir. Örnek olarak, RNaz H bir RNA: DNA dupleksinin RNA dizisini parçalayan bir
20 hücrel endonükleazdır. Bu nedenle, RNaz H'nin aktivasyonu, RNA hedefinin bölünmesine neden olur, böylece gen ekspresyonunun antisens modülasyonunun etkinliğini büyük ölçüde artırır. Sonuç olarak, benzer sonuçlar, aynı hedef bölgeye hibridize olan fosforotioat deoksoligonükleotitler ile karşılaştırıldığında,
25 kimerik oligonükleotitler kullanıldığında daha kısa oligonükleotitler ile elde edilebilir. RNA hedefinin bölünmesi, jel elektroforezi ve gerekirse teknikte bilinen nükleik asit hibridizasyon teknikleri ile rutin olarak tespit edilebilir. Bir örnekte, bir kimerik oligonükleotit, hedef bağlanma afinitesini
30 arttırmak için değiştirilmiş en az bir bölge ve genellikle, RNase H için bir substrat görevi gören bir bölgeyi içerir. Hedefi (bu durumda, ras kodlayan bir nükleik asit) için bir oligonükleotitin afinitesi bir oligonükleotit/ hedef çiftinin Tm'sini ölçerek rutin olarak belirlenir; bu, oligonükleotitin ve
35 hedefin ayrıştığı sıcaklıktır; ayrışma spektrofotometrik olarak

tespit edilir. T_m ne kadar yüksekse, hedef için oligonükleotitin afinitesi de o kadar büyüktür.

Açıklamanın kimerik antisens bileşikleri, yukarıda tarif edildiği gibi iki veya daha fazla oligonükleotit, modifiye edilmiş oligonükleotit, oligonükleosit ve/veya oligonükleotit mimetiklerinin kompozit yapıları olarak oluşturulabilir. Bu bileşikler ayrıca teknikte hibritler veya gapmerler olarak belirtilmiştir. Bu tür hibrit yapıların hazırlanmasını öğreten temsili Birleşik Devletler patentleri, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte ABD Patent numaraları 5,013,830; 5,149,797; 5,220,007; 5,256,775; 5,366,878; 5,403,711; 5,491,133; 5,565,350; 5,623,065; 5,652,355; 5,652,356; ve 5,700,922 içerir.

Bir örnekte, modifiye edilen oligonükleotitin bölgesi, şekerin 2' konumunda modifiye edilmiş en az bir nükleotit, en çok tercihen 2'-Oalkil, 2'-O-alkil-O-alkil veya 2'-floro-modifiye nükleotit içerir. Başka bir örnekte, RNA modifikasyonları, pirimidinlerin ribozu, abazik kalıntıları veya RNA'nın 3' ucunda ters çevrilmiş bir baz üzerinde 2'-floro, 2'-amino ve 2'-O-metil modifikasyonlarını içerir. Bu tür modifikasyonlar, rutin olarak oligonükleotitlere dahil edilir ve bu oligonükleotitlerin, belirli bir hedefe karşı 2'-deoksoligonükleotitlerden daha yüksek bir T_m'ye (yani, daha yüksek hedef bağlanma afinitesi) sahip olduğu gösterilmiştir. Bu artan afinitenin etkisi, gen ekspresyonunun RNAi oligonükleotit inhibisyonunu büyük ölçüde arttırmaktır. RNAz H, RNA: DNA duplekslerinin RNA dizisini bölen bir hücrel endonükleazdır; bu enzimin aktivasyonu bu nedenle RNA hedefinin bölünmesine neden olur ve bu nedenle RNAi inhibisyonunun etkinliğini büyük ölçüde artırabilir. RNA hedefinin bölünmesi, jel elektroforezi ile rutin olarak gösterilebilir. Bir örnekte, kimerik oligonükleotit de nükleaz direncini arttırmak için modifiye edilir. Hücreler, nükleik asitleri bozabilen çeşitli ekso- ve endo-nükleazlar içerir. Bir

dizi nükleotit ve nükleosit modifikasyonunun, içerildikleri oligonükleotiti nükleaz sindirime karşı doğal oligodeoksinükleotidin olduğundan daha dirençli hale getirdikleri gösterilmiştir. Nükleaz direnci rutin olarak 5 oligonükleotitleri hücrel ekstraktlar veya izole edilmiş nükleaz solüsyonları ile inkübe ederek ve genellikle jel elektroforezi ile zaman içinde kalan bozulmamış oligonükleotitin derecesini ölçerek ölçülür. Nükleaz direncini arttırmak için modifiye edilmiş oligonükleotitler, modifiye edilmemiş 10 oligonükleotitlere göre daha uzun süre bozulmadan hayatta kalır. Nükleaz direncini arttırmak veya vermek için çeşitli oligonükleotit modifikasyonları gösterilmiştir. En az bir fosforotioat modifikasyonu içeren oligonükleotitler şu anda daha çok tercih edilmektedir. Bazı durumlarda, hedef bağlanma 15 afinitesini arttıran oligonükleotit modifikasyonları da bağımsız olarak nükleaz direncini arttırabilmektedir.

Bu açıklama için öngörülen bazı tercih edilen oligonükleotitlerin spesifik örnekleri arasında modifiye 20 omurgalar, örneğin fosforotioatlar, fosfotriesterler, metil fosfonatlar, kısa zincirli alkil veya sikloalkil şekerarası bağları veya kısa zincirli heteroatomik veya heterosiklik şekerarası bağlantılar içerenler yer alır. En çok tercih edilenler fosforotioat omurgaları olan ve heteroatom omurgaları 25 olan, özellikle $\text{CH}_2\text{-NH-O-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-O-CH}_2$ [metilen (metilimino) ya da MMI omurga olarak bilinir], $\text{CH}_2\text{-O-N(CH}_3\text{)-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-N(CH}_3\text{)-CH}_2$ ve $\text{O-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-CH}_2$ omurgaları oligonükleotitlerdir, burada doğal fosfodiester omurgası O-P-O-CH_2 olarak temsil edilir. De Mesmaeker ve arkadaşları tarafından 30 (1995) Acc. Chem. Res. 28: 366-374'de açıklanan amid omurgaları da tercih edilir. Ayrıca tercih edilenler morfolino omurga yapılarına sahip oligonükleotitlerdir (Summerton ve Weller, ABD Patenti 5,034,506). Peptid nükleik asit (PNA) omurgası gibi başka bir durumda, oligonükleotitin fosfodiester omurgası bir 35 poliamid omurgası ile değiştirilir, nükleotitler poliamid

omurgasının aza nitrojen atomlarına doğrudan veya dolaylı olarak bağlanır. Oligonükleotitler ayrıca bir veya daha fazla sayıda ikame edilmiş şeker parçasını içerebilir. Tercih edilen oligonükleotitler, 2' konumunda aşağıdakilerden birini içerir:

- 5 OH, SH, SCH₃, F, OCN, OCH₃, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nNH₂ veya O (CH₂)_nCH₃, burada n 1 ila yaklaşık 10'dur; C₁ ila C₁₀ alt alkil, alkoksialkoksi, ornatılmış alt alkil, alkaril veya aralkil; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; O--, S--, veya N-alkil, O--, S-- veya N-alkenil; SOCH₃; SO₂ CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂; heterosikloalkil; heterosikloalkaril; aminoalkilamino; polialkilamino; ornatılmış silil; bir RNA parçalayıcı grup; bir haberci grup; bir aralayıcı; bir oligonükleotitin farmakokinetik özelliklerini geliştirmek için bir grup; veya bir oligonükleotitin ve benzer özelliklere sahip diğer ornatıkların farmakodinamik özelliklerini geliştirmek için bir grup. Tercih edilen bir modifikasyon, 2'-metoksietoksidir [2'-O-CH₂ CH₂ OCH₃, ayrıca 2'-O-(2-metoksietil) olarak da bilinir]. Tercih edilen diğer modifikasyonlar arasında 2'-metoksi (2'-O-CH₃), 2'-propoksi (2'-OCH₂ CH₂CH₃) ve 2'-floro (2'-F) bulunur. Oligonükleotit üzerindeki diğer konumlarda, özellikle de 3' terminal nükleotidindeki şekerin 3' konumunda ve 5' terminal nükleotidinin 5' konumunda da benzer modifikasyonlar yapılabilir. Oligonükleotitler ayrıca pentofuranosil grubu yerine siklobutiller gibi şeker mimetiklerine de sahip olabilir.

- 25 Oligonükleotitler ayrıca ilaveten veya alternatif olarak nükleobaz (genellikle teknikte "baz" olarak) modifikasyonları veya ornatıkları da içerebilir. Burada kullanıldığı şekliyle "modifiye edilmemiş" veya "doğal" nükleotitler arasında adenin (A), guanin (G), timin (T), sitozin (C) ve urasil (U) bulunur. Modifiye edilmiş nükleotidler, doğal nükleik asitlerde, örneğin hipoksantin, 6-metiladenin, 5-Me pirimidinler, özellikle 5-metilsitosin (5-metil-2 'deoksistosin olarak da refere edilmekte ve sıklıkla teknikte 5-Me-C olarak refere edilmektedir), 5-hidroksimetilsitosin (HMC), glikozil HMC ve gentobiyosil HMC'nin yanı sıra sentetik nükleotitlerde, örn., 2-aminoadenin, 2-

(metilamino)adenin, 2-(imidazolilalkil)adenin, 2-(aminoalkilamino)adenin veya diğer heteroortanik alkideninler, 2-tioürasil, 2-tiyotimin, 5-bromourasil, 5-hidroksimetilülazil, 8-azaguanin, 7-deazaguanin, N6 (6-aminoheksil)adenin ve 2,6-diaminopurin'de bulunur. Teknikte bilinen bir "evrensel" baz, örn., inozin dahil edilebilir. 5-Me-C ikamelerinin, nükleik asit dubleks stabilitesini 0.6-1.2 °C arttırdığı ve hali hazırda tercih edilen baz ornatıkları olduğu gösterilmiştir.

10 Açıklamanın oligonükleotitlerinin başka bir modifikasyonu, oligonükleotitin aktivitesini veya hücrel alımını arttıran bir veya daha fazla oligonükleotit parçası veya konjugatına kimyasal olarak bağlanmasını içerir. Bu gibi parçalar, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte, bir kolesterol parçası, bir kolesteril parçası, bir alifatik zincir, örn., dodekandiol veya undesil kalıntıları, bir poliamin veya bir polietilen glikol zinciri veya Adamantan asetik asit gibi lipid parçaları içerir. Lipofilik parçaları içeren oligonükleotitler ve bu gibi oligonükleotitlerin hazırlanması için yöntemler teknikte, 15 örneğin, ABD Pat. Noları 5,138,045, 5,218,105 ve 5,459,255'de bilinmektedir.

Belirli bir oligonükleotitteki tüm konumların homojen olarak modifiye edilmesi gerekli değildir ve aslında, yukarıda bahsedilen modifikasyonlardan birden fazlası tek bir oligonükleotide veya hatta bir oligonükleotit içindeki tek bir nükleosit içine dahil edilebilir. Mevcut tarifname ayrıca, daha önce tanımlandığı gibi kimerik oligonükleotitler olan oligonükleotitleri de içerir.

30

Bir başka durumda, bu açıklamanın nükleik asit molekülü, bunlarla sınırlı olmamak üzere abazik nükleotitler, polieter, poliamin, poliamidler, peptitler, karbohidratlar, lipid veya polihidrokarbon bileşikleri içeren başka bir parça ile konjuge edilir. Teknikte uzman kişiler, bu moleküllerin, şeker, baz veya 35

fosfat grubu üzerinde çeşitli konumlarda nükleik asit molekülünü içeren herhangi bir nükleotitin bir veya daha fazlasına bağlanabileceğini kabul edeceklerdir.

5 Bu açıklamaya uygun olarak kullanılan oligonükleotitler, iyi bilinen katı faz sentezi tekniğiyle uygun ve rutin olarak yapılabilir. Böyle bir sentez için ekipman Applied Biosystems dahil olmak üzere çeşitli satıcılar tarafından satılmaktadır. Bu sentez için başka herhangi bir vasıta da kullanılabilir;

10 oligonükleotitlerin gerçek sentezi, teknikte sıradan uzmanlığa sahip kişilerce iyi bilinmektedir. Aynı zamanda fosforotioatlar ve alkillenmiş türevler gibi başka oligonükleotitlerin hazırlanması için benzer tekniklerin kullanımı iyi bilinmektedir. Aynı tekniklerin ve ticari olarak temin edilebilen modifiye

15 edilmiş amiditlerin ve biyotin, fluoresein, akridin veya psoralen ile modifiye edilmiş amiditler ve/ veya CPG (Glen Research, Sterling VA'dan alınabilir) gibi kontrollü gözenekli cam (CPG) ürünlerinin de floresan olarak etiketlenmiş, biyotinile edilmiş veya kolesterol ile modifiye edilmiş

20 oligonükleotitler gibi diğer modifiye edilmiş oligonükleotitlerin sentezlenmesi için kullanılması da iyi bilinmektedir.

Açıklamaya göre, LNA monomerlerinin kullanımı gibi

25 modifikasyonların hareketin etkisi, özgünlüğü ve etki süresini arttırmak ve oligonükleotitlerin uygulama yollarını genişletmek için kullanılması, MOE, ANA, FANA, PS vb. gibi mevcut kimyalardan oluşur. Bu, mevcut oligonükleotitlerdeki bazı monomerlerin LNA monomerleri ile ornatılmasıyla başarılabilir. LNA ile modifiye

30 edilmiş oligonükleotit, ana bileşiğe benzer bir büyüklüğe sahip olabilir veya daha büyük veya tercihen daha küçük olabilir. Bu tip LNA ile modifiye edilmiş oligonükleotitlerin yaklaşık %70'den az, daha tercihen yaklaşık %60'tan az, en çok tercihen yaklaşık %50'den az LNA monomerleri içermesi ve

büyükliklerinin yaklaşık 5 ila 25 nükleotit, daha tercihen yaklaşık 12 ila 20 nükleotit arasında olması tercih edilir.

Tercih edilen modifiye edilmiş oligonükleotit omurgaları, bunlarla sınırlı olmamak üzere, fosforotioatlar, kiral fosforotioatlar, fosforoditioatlar, fosfotriesterler, aminoalkilfosfotriesterler, metil ve 3'alkilen fosfonatlar ve kiral fosfonatlar, fosfinatlar, 3'-amino fosforamidat içeren fosforamidatlar içeren diğer alkil fosfonatlar ve aminoalkilfosforamidatlar, tionofosforamidatlar, tionoalkilfosfonatlar, tionoalkilfosfotriesterler, ve normal 3'-5' bağları olan boranofosfatlar, bunlardan 2'-5' bağlantılı analoglar, ve nükleosid birimlerinin bitişik çiftlerinin 3'-5'ila 5'-3' veya 2'-5' ila 5'-2' bağlandığı ters polariteye sahip olanlardır. Çeşitli tuzlar, karışık tuzlar ve serbest asit formları da dahildir.

Yukarıdaki fosfor içeren bağların hazırlanmasını öğreten temsili Birleşik Devletler patentleri, bunlarla sınırlı olmamak üzere, ABD patent noları 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; ve 5,625,050'dir.

Burada bir fosfor atomu içermeyen tercih edilen modifiye edilmiş oligonükleotit omurgaları, kısa zincirli alkil veya sikloalkil nükleositler arası bağlantılar, karışık heteroatom ve alkil veya sikloalkil nükleositler arası bağlantılar veya bir veya daha fazla kısa zincirli heteroatomik veya heterosiklik nükleositler arası bağlantılarla oluşturulan omurgalara sahiptir. Bunlar morfolino bağlantılarına (kısmen bir nükleositin şeker kısmından oluşturulmuş) sahip olanları içerir; siloksan omurgalar; sülfür, sülfoksit ve sülfon omurgaları; formasetil ve

tioformasetil omurgalar; metilen formasetil ve tioformasetil omurgalar; omurga içeren alken; sülfamat omurgaları; metilenimino ve metilenehidrazino omurgaları; sülfonat ve sülfonamid omurgaları; amit omurgaları; ve karıştırılmış N, O, S ve CH₂ bileşen parçalarına sahip olan diğerleridir.

Yukarıdaki oligonükleotitlerin hazırlanmasını öğreten temsili Birleşik Devletler patentleri, bunlarla sınırlı olmamak üzere, ABD patent noları 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; ve 5,677,439'dur.

Diğer tercih edilen oligonükleotit mimetiklerde, hem şeker hem de internükleosit bağlantısı, yani nükleotid birimlerinin omurgası, yeni gruplar ile yer değiştirmiştir. Baz birimler uygun bir nükleik asit hedef bileşik ile hibridizasyon için korunur. Böyle bir oligomerik bileşik, mükemmel hibridizasyon özelliklerine sahip olduğu gösterilen bir oligonükleotit mimetiği, bir peptit nükleik asit (PNA) olarak adlandırılır. PNA bileşiklerinde, bir oligonükleotitin şeker omurgası, bir amid içeren bir omurga ile, özellikle bir aminoetilglisin omurgası değiştirilir. Nükleobazlar korunur ve doğrudan veya dolaylı olarak omurganın amid kısmının aza nitrojen atomlarına bağlanır. PNA bileşiklerinin hazırlanmasını öğreten temsili Birleşik Devletler patentleri, bunlarla sınırlı olmamak üzere, ABD patent noları 5,539,082; 5,714,331; ve 5,719,262'dir. PNA bileşiklerinin daha ileri öğretimi, Nielsen ve arkadaşları (1991) Science 254, 1497-1500'de bulunabilir.

Açıklamanın bir örneğinde, fosforotioat omurgaları ve heteroatom omurgaları olan oligonükleositleri olan oligonükleotitler, ve özellikle CH₂-NH-O-CH₂-, -CH₂-N (CH₃)-O-

CH₂-metilen (metilimino) veya MMI omurgası olarak bilinir, CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂N(CH₃)-N(CH₃) CH₂-ve-O-N(CH₃)-CH₂-CH₂- burada doğal fosfodiester omurgası, yukarıda referans olarak belirtilen ABD patenti No. 5,489,677'de O-P-O-CH₂- olarak ve yukarıda referans olarak bahsedilen ABD patenti No. 5,602,240'da amid omurgaları olarak temsil edilir. Ayrıca, yukarıda referans olarak bahsedilen 5,034,506 sayılı ABD patentindeki morfolino omurga yapılarına sahip oligonükleotitler de tercih edilir.

10 Modifiye edilmiş oligonükleotitler ayrıca bir veya daha fazla ornatılmış şeker parçasını içerebilir. Tercih edilen oligonükleotitler, 2' konumunda aşağıdakilerden birini içerir: OH; F; O-, S- veya N-alkil; O-, S- veya N-alkenil; O-, S- veya N-alkinil; veya O alkil-O-alkildir, burada alkil, alkenil ve

15 alkinil, ornatılmış veya ornatılmamış C ila CO alkil veya C₂ ila C₁₀ alkenil ve alkinil olabilir. Özellikle tercih edilenler O (CH₂)_n OmCH₃, O(CH₂)_n, OCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ ve O(CH₂)_nON(CH₃)₂'dir, burada n ve m 1 ila yaklaşık 10 arasında olabilir. Diğer tercih edilen oligonükleotitler, 2' konumunda

20 aşağıdakilerden birini içerir: C'den CO'ya, (düşük alkil, ornatık alt alkil, alkaril, aralkil, O-alkaril veya O-aralkil, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterosikloalkil, heterosikloalkil, aminoalkilamino, polialkilamino, ornatık silil, bir RNA parçalayıcı grup, bir

25 haberci grup, bir interkalatör, bir oligonükleotitin farmakokinetik özelliklerinin geliştirilmesi için bir grup veya bir oligonükleotitin farmakodinamik özelliklerini geliştirmek için bir grup ve benzer özelliklere sahip diğer ornatıklar. Tercih edilen bir modifikasyon, 2'-metoksietoksi (2'-O-(2-

30 metoksietil) veya 2'-MOE olarak da bilinen 2'-O-CH₂CH₂OCH₃) yani bir alkoksialkoksi grubunu içerir. Tercih edilen başka bir modifikasyon, 2'-dimetilaminoetoksietoksi, yani, buradaki örneklerde tarif edildiği gibi 2'-DMAOE olarak da bilinen bir O (CH₂)₂ON(CH₃)₂ grubunu ve 2'-dimetilaminoetoksietoksi (ayrıca

teknikte 2'-O-dimetilaminoetoksietil veya 2'-DMAEOE olarak bilinir), yani 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂ içerir.

Tercih edilen diğer modifikasyonlar arasında 2'-metoksi (2'-O-CH₃), 2'-aminopropoksi (2'-O-CH₂CH₂CH₂NH₂) ve 2'-floro (2'-F) bulunur. Aynı modifikasyonlar, oligonükleotit üzerindeki diğer pozisyonlarda, özellikle de 3' terminal nükleotidindeki şekerin 3' konumunda veya 2'-5' bağlı oligonükleotitlerde ve 5' terminal nükleotidinin 5' konumunda da yapılabilir. Oligonükleotitler ayrıca pentofuranosil şeker yerine siklobutil parçaları gibi şeker mimetiklerine de sahip olabilir. Bu gibi modifiye şeker yapılarının hazırlanmasını öğreten temsili Birleşik Devletler patentleri,

4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; ve 5,700,920 sayılı ABD Patentleridir.

Oligonükleotitler nükleobaz (genellikle teknikte "baz" olarak) modifikasyonları veya ornatıkları da içerebilir. Burada kullanıldığı şekliyle "modifiye edilmemiş" veya "doğal" nükleotitler, pürin bazları adenin (A) ve guanin (G) ve pirimidin bazları timin (T), sitozin (C) ve urasil (U) içerir. Modifiye edilmiş nükleotitler arasında, aşağıdakiler gibi diğer sentetik ve doğal nükleotitler bulunur: 5-metilsitozin (5-me-C), 5-hidroksimetil sitozin, ksantin, hipoksantin, 2-aminoadenin, 6-metil ve diğer adenin ve guanin alkil türevleri, 2-propil ve diğer adenin ve guanin alkil türevleri, 2-tiyourasil, 2-tiyotimin ve 2-tiyositozin, 5-halourasil ve sitozin, 5-propinil urasil ve sitozin, 6-azo urasil, sitozin ve timin, 5-urasil (psödourasil), 4-tiyourasil, 8-halo, 8-amino, 8-tiyol, 8-tiyoalkil, 8-hidroksil ve diğer 8-ornatılmış adeninler ve guaninler, 5-halo, özellikle 5-bromo, 5-triflorometil ve diğer 5-ornatılmış urasil ve sitozinler, 7-metilguanin ve 7-metiladenin, 2-F-adenin, 2-amino-adenin, 8-azaguanin ve 8-

azaadenin, 7-deazaguanin ve 7-deazaadenin ve 3- deazaguanin ve 3-deazaadenin bulunur.

Ayrıca, nükleotitler, ABD Patenti No. 3,687,808'de "Polimer Bilimi ve Mühendisliği Muhtasar Ansiklopedisi", sayfa 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990'da açıklananlar, Englisch ve arkadaşları tarafından, 'Angewandte Chemie, International Edition', 1991, 30, sayfa 613, ve Sanghvi, Y.S., Bölüm 15, 'Antisense Research and Applications', sayfa 289-302, Crooke, S.T. ve Lebleu, B. ea., CRC Press, 1993'de açıklananları kapsar. Bu nükleotidlerin bazıları, özellikle açıklamanın oligomerik bileşiklerinin bağlanma afinitesini arttırmak için yararlıdır. Bunlar, 5-orнатılmış pirimidinleri, 6-azapirimidinleri ve N-2, N-6 ve O-6 orнатılmış purinleri içerir, bunlar arasında 2-aminopropilamin, 5-propinilüloz ve 5-propinilsitozin bulunur. 5-metilstosin ornatıklarının nükleik asit dupleks stabilitesini 0.6-1.2 °C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. ve Lebleu, B., eds, 'Antisense Araştırma ve Uygulamaları', CRC Press, Boca Raton, 1993, sayfa 276-278) arttırdığı ve daha da özellikle 2'-Ometoksietil şeker modifikasyonları ile kombine edildiğinde halihazırda tercih edilen baz ornatıkları olduğu gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen modifiye nükleotidlerin yanı sıra diğer modifiye edilmiş nükleotidlerin hazırlanmasını öğreten temsili Birleşik Devletler patentleri, bunlarla sınırlı olmamak üzere, 3,687,808 sayılı ABD patentinin yanı sıra 4,845,205; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,596,091; 5,614,617; 5,750,692 ve 5,681,941 patenlerini de içerir.

Açıklamanın oligonükleotitlerinin başka bir modifikasyonunu, oligonükleotitin aktivitesini, hücrel dağılımını veya hücrel

alımını arttıran bir veya daha fazla oligonükleotit parçası veya konjugatına kimyasal olarak bağlanmasını içerir.

Böyle parçalar arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, lipit parçaları, örn., bir kolesterol parçası, kolik asit, bir tiyoeter, örn., heksil-s-triteltiyol, bir tiyokolesterol, alifatik bir zincir, örn., dodekandiol veya undesil kalıntıları, bir fosfolipit, örn., di-heksadesil-ras-gliserol veya trietilamonyum 1,2-di-O-heksadesil-ras-gliserol-3-H-fosfonat, bir poliamin veya bir polietilen glikol zinciri, Adamantan asetik asit, bir palmitil parça, bir oktadesilamin veya heksilamino-karbonil-oksikolesterol parçası bulunur.

Bu tür oligonükleotit konjugatlarının hazırlanmasını öğreten temsili Birleşik Devletler patentleri, bunlarla sınırlı olmamak üzere, ABD patent noları

4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717, 5,580,731; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,245,022; 5,254,469; 5,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 5,292,873; 5,317,098; 5,371,241, 5,391,723; 5,416,203, 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928 ve 5,688,941'dir.

İlaç keşfi: Mevcut açıklamanın bileşikleri, ilaç keşfi ve hedef validasyon alanlarında da uygulanabilir. Mevcut tarifname, Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BKNF) polinükleotidleri ve bir hastalık durumu, fenotipi veya koşulu arasında var olan ilişkilerin aydınlatılması için ilaç keşif çabalarında burada tanımlanan bileşiklerin ve tercih edilen hedef bölümlerin kullanımı kapsar. Bu yöntemler arasında, mevcut buluşun

bileşikleri ile bir numune, doku, hücre veya organizmanın temas ettirilmesini içeren BKNF polinükleotidlerinin saptanması veya modüle edilmesi, BKNF polinükleotidlerinin ve/veya ilgili fenotipik veya kimyasal son noktanın nükleik asit veya protein seviyesinin, işlemiden bir süre sonra ölçülmesi, ve isteğe bağlı olarak ölçülen değeri, işlenmemiş bir numune veya açıklamanın bir başka bileşiği ile işleme tabi tutulmuş numune ile karşılaştırılması yer alır. Bu yöntemler, hedef doğrulama işlemi için bilinmeyen genlerin işlevini belirlemek veya belirli bir hastalık, durum veya fenotipin mualemesi veya önlenmesi için hedef olarak belirli bir gen ürününün geçerliliğini belirlemek için paralel olarak veya diğer deneylerle kombinasyon halinde de yapılabilir.

Gen ifadesinin yukarı regülasyonu veya inhibisyonunun değerlendirilmesi:

Bir eksojen nükleik asidin bir konakçı hücre veya organizmaya aktarılması, hücre veya organizmada nükleik asidin varlığını doğrudan tespit ederek değerlendirilebilir. Bu tespit, teknikte iyi bilinen birkaç yöntemle sağlanabilir. Örneğin, eksojen nükleik asidin mevcudiyeti, Southern blot veya nükleik asit ile ilişkili nükleotit dizilerini spesifik olarak yükselten primerler kullanılarak bir polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği ile saptanabilir. Eksojen nükleik asitlerin ekspresyonu, gen ekspresyonu analizi dahil olmak üzere geleneksel yöntemler kullanılarak da ölçülebilir. Örneğin, eksojen bir nükleik asitten üretilen mRNA, bir Northern blot ve tersine transkripsiyon PCR (RT-PCR) kullanılarak saptanabilir ve sayısallaştırılabilir.

30

Ekzojen nükleik asitten RNA'nın ekspresyonu, bir enzimatik aktivite veya bir haberci protein aktivitesinin ölçülmesiyle de tespit edilebilir. Örneğin, antisens modülatör aktivitesi,

ekzojen nükleik asidin efektör RNA'yı üreteceğinin bir göstergesi olarak hedef nükleik asit ekspresyonunda bir azalma veya artış olarak dolaylı olarak ölçülebilir. Dizi korumasına dayalı olarak, primerler hedef genlerin kodlayıcı bölgelerini çoğaltmak için tasarlanabilir ve kullanılabilir. Başlangıçta, her bir genin en fazla ekspresyona uğrayan kodlayıcı bölgesi, herhangi bir kodlayıcı veya kodlayıcı olmayan bölge kullanılabilse de, bir model kontrol geni oluşturmak için kullanılabilir. Her kontrol geni, her kodlayıcı bölgenin bir haberci kodlayıcı bölgesi ve onun poli (A) sinyali arasına yerleştirilmesiyle birleştirilir. Bu plazmidler, genin giriş kısmında bir haberci geni ve 3' kodlayıcı olmayan bölgede bir potansiyel RNAi hedefi olan bir mRNA üretecekti. Münferit antisens oligonükleotitlerin etkinliği, haberci genin modülasyonu ile tahlil edilecektir. Mevcut açıklamanın yöntemlerinde yararlı olan haberci genler arasında asetohipoksiasit sentaz (AHAS), alkalik fosfataz (AP), beta galaktosidaz (LacZ), beta glukuronidaz (GUS), kloramfenikol asetiltransferaz (CAT), yeşil flüoresan protein (GFP), kırmızı floresan protein (RFP), sarı floresan protein (YFP), camgöbeği floresan protein (CFP), yabancıturpu peroksidaz (HRP), lusiferaz (Luc), nopalin sentaz (NOS), ahtapin sentaz (OCS) ve bunların türevleri bulunur. Ampisilin, bleomisin, kloramfenikol, gentamisin, higromisin, kanamisin, lincomisin, metotreksat, fosfinotrisin, puromisin ve tetrasikline direnç kazandıran çoklu seçilebilir markörler mevcuttur. Bir haberci genin modülasyonunu belirleme yöntemleri, teknikte iyi bilinmektedir ve bunlarla sınırlı olmamak üzere, florometrik yöntemleri (örn., floresans spektroskopisi, Floresans Aktif Hücre Ayırma (FACS), floresan mikroskopisi), antibiyotik direnç tayinini içerir.

BKNF proteini ve mRNA ekspresyonu, teknikte uzman kişilerce bilinen ve buradan başka bir yerde tarif edilen yöntemler kullanılarak analiz edilebilir. Örneğin, protein seviyelerini ölçmek için ELISA gibi bağışıklık tahlilleri kullanılabilir.

BKNF ELISA deney kitleri ticari olarak, örn., R&D Systems'dan (Minneapolis, MN) temin edilebilir.

Örneklerde, bir numunede (örn., in vivo veya in vitro olarak hücreler veya dokular) BKNF ekspresyonu (örn., mRNA veya protein), bir kontrol numunesindeki bir antisens oligonükleotiti kullanılarak muamele edilir, bir kontrol örneğindeki BKNF ekspresyonu ile karşılaştırılarak değerlendirilir. Örneğin proteinin veya nükleik asidin ekspresyonu, teknikte uzman kişilerce bilinen yöntemlerle, sahte işlem görmüş veya işlenmemiş bir örnekle karşılaştırılabilir. Alternatif olarak, bir kontrol antisens oligonükleotiti ile (örneğin, değiştirilmiş veya farklı bir diziye sahip olan) muamele edilen bir numune ile karşılaştırılması, istenen bilgiye bağlı olarak yapılabilir. Başka bir durumda, muamele edilmiş ve muamele edilmemiş bir numunede BKNF proteininin veya nükleik asidin (araştırmacı tarafından uygun görülen herhangi bir standart, örn., bir referans gen) ekspresyonundaki bir fark, muamele edilmemiş bir numunede ve muamele edilen bir numunede farklı bir nükleik asidin ekspresyonundaki farklılık ile karşılaştırılabilir.

Gözlemlenen farklılıklar, kontrol ile bir mukayesede kullanım için, örn., bir oran veya kesir formunda arzu edildiği gibi ifade edilebilir. Örneklerde, bu açıklamanın bir antisens oligonükleotiti ile muamele edilen bir örnekteki BKNF mRNA veya proteinin seviyesi, muamele edilmemiş bir numuneye veya kontrol nükleik asidi ile muamele edilen bir numuneye göre yaklaşık 1,25 kat ila yaklaşık 10 kat veya daha fazla arttırılır veya azaltılır. Örneklerde BKNF mRNA veya proteinin seviyesi en az yaklaşık 1,25 kat, en az yaklaşık 1,3 kat, en az yaklaşık 1,4 kat, en az yaklaşık 1,5 kat, en az yaklaşık 1,6 kat, en az yaklaşık 1,7 kat, en az yaklaşık 1,8 kat, en az yaklaşık 2 kat, en az yaklaşık 2,5 kat, en az yaklaşık 3 kat, en az yaklaşık 3,5 kat, en az yaklaşık 4 kat, en az yaklaşık 4,5 kat, en az yaklaşık 5 kat, en az yaklaşık 5,5 kat, en az yaklaşık 6 kat, en az yaklaşık 6,5 kat,

en az yaklaşık 7 kat, en az yaklaşık 7,5 kat, en az yaklaşık 8 kat, en az yaklaşık 8,5 kat, en az yaklaşık 9 kat, en az yaklaşık 9,5 kat veya en az yaklaşık 10 kat veya daha fazla arttırılır veya azaltılır.

5 *Kitler, Araştırma Reaktifleri, Teşhis ve Terapötikler*

Mevcut açıklamanın bileşikleri, teşhis, mualeme ve profilaksi için ve araştırma reaktifleri ve kitlerin bileşenleri olarak kullanılabilir. Ayrıca, gen ekspresyonunu mükemmel spesifite ile inhiye edebilen antisens oligonükleotitler, genellikle, belirli genlerin fonksiyonunu aydınlatmak veya biyolojik yolağın çeşitli üyelerinin fonksiyonlarını ayırt etmek için sıradan yetenekte kişilerce kullanılır.

Kitlerde ve teşhislerde ve çeşitli biyolojik sistemlerde kullanım için, mevcut tarifnamenin bileşikleri, tek başlarına veya diğer bileşikler veya terapötiklerle kombinasyon halinde, bir bölümün ekspresyon modellerini veya hücreler ve dokular içinde eksprese edilen genlerin tüm tamamlayıcılarını açığa çıkarmak için diferansiyel ve/ veya birleşimsel analizlerdeki araçlar olarak yararlıdır.

Burada kullanıldığı şekliyle "biyolojik sistem" veya "sistem" terimi, Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BKNF) genlerinin ürünlerini eksprese eden veya eksprese etmek için yetkin hale getirilen herhangi bir organizma, hücre, hücre kültürü veya doku olarak tanımlanır. Bunlar, insanlar, transgenik hayvanlar, hücreler, hücre kültürleri, dokular, ksenograftlar, transplantlar ve bunların kombinasyonlarını içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir.

Sınırlayıcı olmayan bir örnek olarak, bir veya daha fazla antisens bileşiği ile muamele edilen hücreler veya dokulardaki

ekspresyon modelleri antisens bileşiklerle muamele edilmeyen kontrol hücreleri veya dokuları ile karşılaştırılır ve üretilen modeller, incelenen genlerin, örneğin hastalık ilişkisi, sinyal yolağı, hücresel lokalizasyon, ekspresyon seviyesi, boyutu, yapısı veya işlevine ilişkin olarak farklı gen ekspresyon seviyeleri için analiz edilir. Bu analizler, uyarılmış veya uyarılmamış hücreler üzerinde ve ekspresyon modellerini etkileyen başka bileşiklerin varlığında veya yokluğunda gerçekleştirilebilir.

10

Teknikte bilinen gen ekspresyonu analizi yöntemlerinin örnekleri arasında DNA dizileri veya mikro diziler, SAGE (gen ekspresyonunun seri analizi), READS (sindirilmiş cDNA'ların restriksiyon enzim amplifikasyonu), TOGA (toplam gen ekspresyonu analizi), protein dizileri ve proteomik, eksprese edilen dizi etiketi (EST) dizilimi, subtractif RNA parmak izi (SuRF), subtraktif klonlama, diferansiyel görüntüleme (DD), karşılaştırmalı genomik hibridizasyon, FISH (floresan in situ hibridizasyon) teknikleri ve kütle spektrometresi yöntemleri bulunur.

20

Açıklamanın bileşikleri, araştırma ve teşhis için yararlıdır, çünkü bu bileşikler, Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BKNF) kodlayan nükleik asitlere hibridize olur. Örneğin, bu tür bir verimlilik ile hibritlenen ve etkili BKNF modülatörleri olarak açıklanan bu koşullar altında melezlenen oligonükleotitler, sırasıyla, gen amplifikasyonu veya saptamayı destekleyen koşullar altında etkili primerler veya problardır. Bu primerler ve problar, BKNF'yi kodlayan nükleik asit moleküllerinin spesifik olarak saptanmasını gerektiren ve BKNF'nin daha ileri çalışmalarında kullanılmak üzere veya bu nükleik asit moleküllerinin amplifikasyonu için yöntemlerde yararlıdır. Açıklamanın, BKNF'yi kodlayan bir nükleik asit ile antisens oligonükleotitlerinin, özellikle de primerler ve problarının hibridizasyonu, teknikte bilinen yollarla tespit edilebilir. Bu tür araçlar, bir enzimin oligonükleotide konjugasyonunu,

35

oligonükleotitin radyo-etiketlenmesini veya herhangi bir başka uygun tespit aracını içerebilir. Bir numunedeki BKNF seviyesini saptamak için bu tür tespit araçlarını kullanan kitler de hazırlanabilir.

5

Antisensin spesifikliği ve hassasiyeti, terapötik kullanımlar için teknikte uzman kişilerce de ilişkilendirilmektedir. Antisens bileşikleri, insanlar da dahil olmak üzere hayvanlarda hastalık durumlarının mualemesinde terapötik parçalar olarak kullanılmıştır. Antisens oligonükleotit ilaçları, insanlara güvenli ve etkin bir şekilde uygulanmıştır ve birçok klinik çalışma halen devam etmektedir. Bu nedenle, antisens bileşiklerinin, özellikle insanlar, hücreler, dokular ve hayvanların mualemesi için mualeme rejimlerinde faydalı olacak şekilde konfigüre edilebilen yararlı terapötik yaklaşımlar olabileceği tespit edilmiştir.

Terapötikler için, BKNF polinükleotitlerinin ekspresyonunu modüle ederek mualeme edilebilen bir hastalık veya bozukluğa sahip olduklarından şüphelenilen bir hayvana, tercihen bir insana, bu buluşa uygun antisens bileşikler uygulanarak muamele edilir. Örneğin, sınırlayıcı olmayan bir örnekte, yöntemler mualemeye ihtiyaç duyan hayvana, terapötik olarak etkili bir miktarda BKNF modülatörünün uygulanması adımını içerir. Mevcut açıklamaların BKNF modülatörleri, BKNF'nin aktivitesini etkili bir şekilde modüle eder veya BKNF proteininin ekspresyonunu modüle eder. Bir örnekte, bir hayvanda BKNF'nin aktivitesi veya ekspresyonu, bir kontrole kıyasla yaklaşık %10 oranında inhibe edilir. Tercihen, bir hayvanda BKNF'nin aktivitesi veya ekspresyonu yaklaşık %30 oranında inhibe edilir. Daha tercihen, bir hayvanda BKNF'nin aktivitesi veya ekspresyonu %50 oranında veya daha fazla inhibe edilir. Bu nedenle, oligomerik bileşikler, bir kontrol ile karşılaştırıldığında, Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BKNF) mRNA'nın ekspresyonunu en az %10, en az %50, en az %25, en az %30, en az %40, en az %50, en az %60, en az %70,

en az %75, en az%80, en az %85, en az %90, en az %95, en az %98, en az %99 veya %100 oranında modüle eder.

5 Bir örnekte, bir hayvanda Beyin kaynaklı nörotrofik faktörün (BKNF) aktivitesi veya ekspresyonu, bir kontrole kıyasla yaklaşık %10 oranında artırılır. Tercihen, bir hayvanda BKNF'nin aktivitesi veya ekspresyonu yaklaşık %30 oranında artırılır. Daha tercihen, bir hayvanda BKNF'nin aktivitesi veya ekspresyonu %50 oranında veya daha fazla artırılır. Bu nedenle, 10 oligomerik bileşikler, bir kontrol ile karşılaştırıldığında, BKNF mRNA'nın ekspresyonunu en az %10, en az %50, en az %25, en az %30, en az %40, en az %50, en az %60, en az %70, en az %75, en az%80, en az %85, en az %90, en az %95, en az %98, en az %99 veya %100 oranında modüle eder.

15

Örneğin, Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BKNF) ekspresyonunun artması veya azaltılması, serum, kan, yağ dokusu, karaciğer veya hayvanın herhangi bir başka vücut sıvısı, dokusu veya organında ölçülebilir. Tercihen, analiz edilen adı geçen 20 sıvılar, dokular veya organlar içinde bulunan hücreler, BKNF peptitlerini ve/ veya BKNF proteinin kendisini kodlayan bir nükleik asit molekülü içerir.

Açıklamanın bileşikleri, farmasötik bileşimlerde, bir 25 bileşiğin uygun bir farmasötik olarak kabul edilebilir seyreltici veya taşıyıcıya etkili bir miktarının eklenmesiyle kullanılabilir. Açıklamanın bileşiklerinin ve yöntemlerinin kullanımı ayrıca profilaktik olarak da yararlı olabilir.

Konjugatlar

30

Açıklamanın oligonükleotitlerinin başka bir modifikasyonu, oligonükleotitin aktivitesini, hücresel dağılımını veya hücresel alımını arttıran bir veya daha fazla oligonükleotit parçası veya konjugatına kimyasal olarak bağlanmayı içerir. Bu kısımlar veya

konjüгатlar, birincil veya ikincil hidroksil grupları gibi fonksiyonel gruplara kovalent olarak bağlı konjüгат grupları içerebilir. Açıklamanın konjüгат grupları arasında, aralayıcılar, haberci moleküller, poliaminler, poliamidler, polietilen 5 glikoller, polieterler, oligomerlerin farmakodinamik özelliklerini geliştiren gruplar ve oligomerlerin farmakokinetik özelliklerini geliştiren gruplar yer alır. Tipik konjüгат grupları arasında kolesteroller, lipitler, fosfolipitler, biyotin, fenazin, folat, fenantridin, antrakinson, akridin, 10 flöresinler, rodaminler, kumarinler ve boyalar bulunur. Bu açıklama bağlamında farmakodinamik özellikleri geliştiren gruplar, alımını arttıran, bozunmaya karşı direnci arttıran ve/veya hedef nükleik asit ile diziye özgü hibritleşmeyi güçlendiren grupları içerir. Farmakokinetik özellikleri 15 geliştiren gruplar, bu açıklama bağlamında, mevcut açıklamanın bileşiklerinin alımını, dağıtımını, metabolizmasını veya ekskresyonunu arttıran grupları içerir. Temsili konjüгат grupları, 23 Ekim 1992'de dosyalanmış Uluslararası Patent Başvurusu No PCT/ US92/ 09196'da ve ABD Patenti No. 6,287,860'da 20 açıklanmaktadır. Konjüгат parçaları arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, kolesterol parçası gibi lipit parçaları, , kolik asit, bir tiyoeter, örn., heksil-5-triteltiyol, bir tiyokolesterol, alifatik bir zincir, örn., dodekandiol veya undesil kalıntıları, bir fosfolipit, örn., di-heksadesil-ras- 25 gliserol veya trietilamonyum 1,2-di-O-heksadesil-ras-gliserol-3-Hfosfonat, bir poliamin veya bir polietilen glikol zinciri, Adamantan asetik asit, bir palmitil parça, bir oktadesilamin veya heksilamino-karbonil-oksikolesterol parçası bulunur. Açıklamanın oligonükleotitleri, örneğin aspirin, varfarin 30 fenilbutazon, ibuprofen, suprofen, fenbufen, ketoprofen, (S)-(+)- pranoprofen, karprofen, dansilsarosin, 2,3,5-triiodobenzoik asit, flufenamik asit, folinik asit, benzotiyadiazid, klorotiazid, diazepin, indomisisin, barbitürat, sefalosporin, bir sülfa ilacı, bir antidiyabetik, bir

antibakteriyel veya bir antibiyotik gibi aktif ilaç maddelerine de konjuge edilebilir.

Bu tür oligonükleotit konjugelerin hazırlanmasını öğreten
5 temsili Birleşik Devletler patentleri arasında, bunlarla sınırlı
olmamak üzere, ABD Pat. Noları
4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,7
30; 5,552,538; 5,578,717, 5,580,731; 5,580,731; 5,591,584; 5,1
09,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439;
10 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,
779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,
958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963
; 5,214,136; 5,245,022; 5,254,469; 5,258,506; 5,262,536; 5,272
,250; 5,292,873; 5,317,098; 5,371,241, 5,391,723; 5,416,203, 5,
15 451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810;
5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,
923; 5,599,928 ve 5,688,941 bulunur.

Formülasyonlar

20

Açıklamanın bileşikleri ayrıca karıştırılabilir, kapsüllenebilir, konjuge olabilir veya örneğin, alım, dağıtım ve/ veya emilimde yardımcı olmak için lipozomlar, reseptör hedefli moleküller, oral, rektal, topikal veya diğer
25 formülasyonlar gibi başka moleküller, molekül yapıları veya bileşik karışımları ile başka şekilde ilişkilendirilebilir. Bu tür alım, dağıtım ve/ veya emilim destekli formülasyonların hazırlanmasını öğreten temsili Birleşik Devletler patentleri arasında, bunlarla sınırlı olmamak
30 üzere, 5,108,921; 5,354,844; 5,416,016; 5,459,127; 5,521,291; 5,543,165; 5,547,932; 5,583,020; 5,591,721; 4,426,330; 4,534,899; 5,013,556; 5,108,921; 5,213,804; 5,227,170; 5,264,221; 5,356,633; 5,395,619; 5,416,016; 5,417,978; 5,462,854; 5,469,854; 5

,512,295; 5,527,528; 5,534,259; 5,543,152; 5,556,948; 5,580,575; ve 5,595,756 sayılı ABD Patentleri bulunur.

Her ne kadar antisens oligonükleotitlerin bir hedef ekspresyonu ve/ veya fonksiyonunu modüle etmek amacıyla bir vektör bağlamında uygulanması gerekmemekte de olsa açıklamanın örnekleri, antisens oligonükleotitlerin ekspresyonu için, promotörler, hibrid promotör gen dizileri içeren ve güçlü bir konstitütif promotör aktivitesine sahip olan ekspresyon vektör yapıları veya istenen durumda indüklenebilen bir promotör aktivitesi ile ilgilidir.

Bir örnekte, açıklamanın uygulaması, yukarıdaki antisens oligonükleotitlerinden en az birinin uygun bir nükleik asit dağıtım sistemi ile uygulanmasını içerir. Bir durumda, bu sistem polinükleotide işlevsel olarak bağlı viral olmayan bir vektör içerir. Bu tür viral olmayan vektörlerin örnekleri, oligonükleotiti tek başına (örn., herhangi bir veya daha fazla DİZİ KİM. NO: 12 ila 49) veya uygun bir protein, polisakarit veya lipit formülasyonu ile kombinasyon halinde içerir.

Ek olarak uygun nükleik asit uygulama sistemleri arasında, viral vektör, tipik olarak bir adenovirüsün en az birinden, adenovirüs ile ilişkili virüs (AAV), yardımcı bağımlı adenovirüs, retrovirüs veya Japonya-lipozom (HVJ) kompleksinin hemaglutinin virüsünden dizi bulunmaktadır. Tercihen, viral vektör, örn., bir sitomegalovirüs (CMV) promotörü gibi polinükleotide işlevsel olarak bağlı güçlü bir ökaryotik promotör içerir.

30

Ayrıca tercih edilen vektörler arasında viral vektörler, füzyon proteinleri ve kimyasal konjugatlar bulunur. Retroviral vektörler arasında Moloney murin lösemi virüsleri ve HIV bazlı virüsler bulunur. Tercih edilen bir HIV bazlı viral vektör, gag

ve pol genlerinin bir HIV genomundan geldiği ve env geninin başka bir virüs olduğu en az iki vektör içerir. DNA viral vektörleri tercih edilir. Bu vektörler, ortopox veya avipox vektörleri gibi pox vektörlerini, herpes simpleks I virüsü (HSV) vektörü, 5 Adenovirüs Vektörleri ve Adeno ile ilişkili Virüs Vektörleri gibi herpesvirüs vektörlerini içerir.

Mevcut açıklamanın antisens bileşikler, farmasötik olarak kabul edilebilir tuzlar, esterler veya bu esterlerin tuzları 10 veya bir insan dahil bir hayvana uygulanmasının ardından biyolojik açıdan aktif metabolit veya metabolit kalıntısını (doğrudan veya dolaylı şekilde) oluşturabilen herhangi bir bileşiği kapsar.

15 "Farmasötik olarak kabul edilebilir tuzlar", açıklamanın bileşiklerinin fizyolojik ve farmasötik olarak kabul edilebilir tuzları: yani, ana bileşiğin istenen biyolojik aktivitesini muhafaza eden ve buna istenmeyen toksikolojik etkiler vermeyen tuzlar anlamına gelir. Oligonükleotitler için, farmasötik olarak 20 kabul edilebilir tuzların tercih edilen örnekleri ve kullanımları, ABD Patenti No. 6,287,860'da ayrıca açıklanmıştır.

Mevcut açıklama ayrıca, açıklamanın antisens bileşiklerini içeren farmasötik bileşimleri ve formülasyonları da içerir. Bu 25 mevcut açıklamanın farmasötik bileşimleri, lokal veya sistemik mualemenin istenip istenmediğine ve mualeme edilecek bölgeye bağlı olarak çeşitli şekillerde uygulanabilir. Uygulama, topikal (oftalmik dahil olmak üzere vajinal ve rektal aktarım dahil olmak üzere mukoz membranlara), pulmoner, örn., tozların veya 30 aerosollerin inhalasyonu veya insüflasyonu ile, (nebülizatör, intratrakeal, intranazal, epidermal ve transdermal dahil olmak üzere), oral veya parenteral olabilir. Parenteral uygulamalar arasında, intravenöz, intraarteryal, subkutanöz, intraperitoneal, intramusküler veya örn., intratekal veya

intraventriküler uygulama dahil olmak üzere intrakraniyal, enjeksiyon ya da infüzyon bulunmaktadır.

Merkezi sinir sisteminde dokuların mualemesi için, uygulama, 5 örn., beyin omurilik sıvısına enjeksiyon veya infüzyon yoluyla yapılabilir. Antisens RNA'nın beyin-omurilik sıvısına uygulanması, örneğin A.B.D. Patenti Başvuru Yay. No. 2007/0117772, "Ailesel ALS hastalığı ilerlemesini yavaşlatma yöntemleri" başlıklı patentte tanımlanmıştır.

10

Mevcut açıklamanın antisens oligonükleotitinin merkezi sinir sistemi içindeki hücrelere uygulanması amaçlandığında, uygulama, kan-beyin bariyeri boyunca söz konusu antisens oligonükleotitin penetrasyonunu destekleyebilen bir veya daha fazla ajan ile 15 olabilir. Enjeksiyon, örn., entorinal korteks veya hipokampusta yapılabilir. Bir adenovirüs vektörünün kas dokusunda motor nöronlara uygulanmasıyla nörotrofik faktörlerin verilmesi, örn., "Medüller motor nöronlara adenoviral-vektör aracılı gen transferi" başlıklı A.B.D. Pat. No. 6,632,427'de açıklanmaktadır.

20

Vektörlerin direkt olarak beyne, örneğin striatum, talamus, hipokampus veya substantia nigra'ya ulaştırılması, teknikte bilinmektedir ve örneğin "Yabancı genlerin özellikle merkezi sinir sistemi hücreleri içine aktarılması için adenovirüs vektörleri" başlıklı, 6,756,523 sayılı ABD Patentinde 25 tanımlanmıştır.

Uygulama, enjeksiyonla hızlı olabilir veya yavaş infüzyon veya yavaş salınan formülasyonların uygulanması ile bir süre boyunca yapılabilir.

30

Söz konusu antisens oligonükleotitler ayrıca arzu edilen farmasötik veya farmakodinamik özellikler sağlayan maddeler ile bağlanabilir veya konjuge edilebilir. Örneğin, antisens oligonükleotit, transferrin reseptörüne yönelik bir antikor gibi kan-beyin bariyerinden nüfuz etmeyi veya naklini desteklemek 35 için teknikte bilinen ve intravenöz enjeksiyon ile uygulanan

herhangi bir maddeye bağlanabilir. Antisens bileşiği, örneğin antisens bileşiğini daha etkili kılan ve/ veya antisens bileşiğinin kan-beyin bariyeri boyunca taşınmasını arttıran bir viral vektör ile bağlanabilir. Ozmotik kan beyin bariyerinin bozulması, örneğin mezo eritritol, ksilitol, D(+) galaktoz, D(+) laktoz, D(+) ksiloz, dulcitol, miyo-inositol, L(-) fruktoz, D(-) manitol, D(+) glikoz, D(+) arabinoz, D(-) arabinoz, sellobiyoz, D(+) maltoz, D(+) rafinoz, L(+) ramnoz, D(+) melibioz, D(-) riboz, adonitol, D(+) arabitol, L(-) arabitol, D(+) fukoz, L(-) fukoz, D(-) liyofoz, L(+) leksoz ve L(-) liksoz, dahil ancak bunlarla sınırlı olmayan şekerlerin ya da bunlarla sınırlı olmamak üzere, glutamin, lisin, arjinin, asparagin, aspartik asit, sistein, glutamik asit, glisin, histidin, lösin, metionin, fenilalanin, prolin, serin, treonin, tirozin, valin ve taurin dahil olmak üzere amino asitlerin infüzyonu ile gerçekleştirilebilir. Kan-beyin bariyeri penetrasyonunu arttırmaya yönelik yöntemler ve materyaller, "Kan beyin bariyeri boyunca genetik materyalin teslimi için yöntem" başlıklı ABD Patenti No. 4,866,042'de, "Kan-beyin bariyerinden geçiş için malzeme" başlıklı ABD Patenti No. 6,294,520'de ve "Parenteral dağıtım sistemleri" başlıklı ABD Patenti No. 6,936,589'da tarif edilmiştir.

Söz konusu antisens bileşikleri karıştırılabilir, kapsüllenebilir, konjuge olabilir veya örneğin, alım, dağıtım ve/ veya emilimde yardımcı olmak için lipozomlar, reseptör hedefli moleküller, oral, rektal, topikal veya diğer formülasyonlar gibi başka moleküller, molekül yapıları veya bileşik karışımları ile başka şekilde ilişkilendirilebilir. Örneğin, oligonükleotit alımını kolaylaştırmak için formülasyona katyonik lipitler dahil edilebilir. Alımı kolaylaştırmak için gösterilen böyle bir bileşim LIPOFECTIN'dir (GIBCO-BRL, Bethesda, MD'den temin edilebilir).

En az bir 2'-O-metoksietil modifikasyonuna sahip olan oligonükleotitlerin, oral uygulama için özellikle yararlı

olduğuna inanılmaktadır. Topikal uygulama için farmasötik bileşimler ve formülasyonlar, transdermal yamalar, merhemler, losyonlar, kremler, jeller, damlalar, spreyler, fitiller, sıvılar ve tozları içerebilir. Konvansiyonel farmasötik taşıyıcılar, sulu, toz veya yağlı bazlar, koyulaştırıcılar ve benzerleri gerekli olabilir veya istenebilir. Kaplanmış kondomlar, eldivenler ve benzerleri de yararlı olabilir.

Mevcut açıklamanın uygun şekilde birim dozaj formunda sunulabilen farmasötik formülasyonları, farmasötik endüstrisinde iyi bilinen klasik tekniklerle hazırlanabilir. Bu gibi teknikler, aktif bileşenlerin farmasötik taşıyıcı(lar) veya eksipyan(lar) ile ilişkilendirilmesi adımını içerir. Genel olarak, formülasyonlar, aktif muhteviyatların sıvı taşıyıcılar veya ince bölünmüş katı taşıyıcılar veya her ikisi ile yeknesak ve sıkı bir şekilde ilişkilendirilmesi ve daha sonra gerekirse ürünün şekillendirilmesi suretiyle hazırlanır.

Mevcut açıklamanın bileşimleri, bunlarla sınırlı olmamak üzere tabletler, kapsüller, jel kapsülleri, sıvı şuruplar, yumuşak jeller, fitiller ve lavmanlar gibi birçok olası dozaj biçiminden herhangi birine formüle edilebilir. Bu açıklamanın bileşimleri aynı zamanda sulu, sulu olmayan veya karıştırılmış ortamlardaki süspansiyonlar halinde formüle edilebilir. Sulu süspansiyonlar ayrıca süspansiyonun viskozitesini arttıran, örneğin sodyum karboksimetilselüloz, sorbitol ve/veya dekstran içeren maddeler ihtiva edebilir. Süspansiyon ayrıca stabilizatörler ihtiva edebilir.

Mevcut açıklamanın farmasötik bileşimleri, bunlarla sınırlı olmamak üzere zelttiler, emülsiyonlar ve lipozom içeren formülasyonları içerir. Mevcut açıklamanın farmasötik bileşimleri ve formülasyonları, bir veya daha fazla penatrasyon artırıcı, taşıyıcı, eksipyan veya diğer aktif veya inaktif bileşenler içerebilir.

Emülsiyonlar tipik olarak, genellikle 0.1 µm çapını aşan damlacıklar formunda bir diğetine dağılmış bir sıvının heterojen sistemleridir. Emülsiyonlar, dağılmış fazlara ek olarak ek
5 bileşenler ve sulu fazda, yağlı fazda veya kendisinde ayrı bir faz olarak bir çözelti halinde mevcut olabilen aktif ilacı içerebilir. Mikroemülsiyonlar, mevcut açıklamanın bir örneği olarak dahil edilmiştir. Emülsiyonlar ve kullanımları teknikte iyi bilinmektedir ve ayrıca ABD Patenti No. 6,287,860'da
10 tanımlanmıştır.

Mevcut açıklamanın formülasyonları lipozomal formülasyonları içerir. Mevcut tarifnamede kullanıldığı haliyle, "lipozom" terimi, bir küresel çift katmanlı veya çift katmanlı olarak
15 düzenlenmiş amfifilik lipitlerden oluşan bir keseciği ifade eder. Lipozomlar, bir lipofilik malzemedan ve bir membran içine yerleştirilmiş bir bileşimi içeren bir sulu iç kısımdan oluşan bir membran içeren tek katmanlı veya çok katmanlı keseciklerdir. Katyonik lipozomlar, kararlı bir kompleks oluşturmak için
20 negatif yüklü DNA molekülleri ile etkileşime girdiğine inanılan pozitif yüklü lipozomlardır. pH'a duyarlı veya negatif yüklü lipozomların, DNA ile karmaşık olmaktan ziyade DNA'yı yakaladıklarına inanılmaktadır. Hem katyonik olan hem de katyonik olmayan lipozomlar, DNA'yı hücrelere vermek için
25 kullanılmıştır.

Lipozomlar ayrıca "sterik olarak stabilize" lipozomları içerir; bu terim, burada kullanılan şekliyle bir veya daha fazla özel lipid içeren lipozomlar anlamına gelir. Lipozomlara dahil
30 edildiğinde, bu özelleşmiş lipidler, bu tür özelleşmiş lipidlerin lipozom eksikliğine göre geliştirilmiş dolaşım ömürlerine sahip lipozomlarla sonuçlanır. Sterik olarak stabilize edilmiş lipozomların örnekleri, lipozomun kesecik oluşturan lipit kısmının bir bölümünün bir veya daha fazla
35 glikolipid içerdiği veya bir polietilen glikol (PEG) parçası

gibi bir veya daha fazla hidrofilik polimer ile türetilmiş olanlardır. Lipozomlar ve kullanımları ABD Patenti No. 6,287,860'da ayrıca tanımlanmıştır.

5 Mevcut açıklamanın farmasötik formülasyonları ve bileşimleri ayrıca yüzey aktif maddeler de içerebilir. İlaç ürünleri, formülasyonlar ve emülsiyonlarda yüzey aktif maddelerin kullanımı teknikte iyi bilinmektedir. Yüzey aktif maddeler ve kullanımları ABD Patenti No. 6,287,860'da ayrıca tanımlanmıştır.

10

Bir örnekte, mevcut tarifname, nükleik asitlerin, özellikle oligonükleotitlerin etkili bir şekilde verilmesini sağlamak için çeşitli penetrasyon arttırıcıları kullanır. Lipofilik olmayan ilaçların hücre membranları boyunca difüzyonuna yardımcı olmanın yanı sıra, penetrasyon arttırıcılar lipofilik ilaçların geçirgenliğini de arttırır. Penetrasyon arttırıcılar, beş geniş kategoriden birine, yani, yüzey aktif maddelere, yağ asitlerine, safra tuzlarına, kelatlayıcı maddelere ve kelatsız yüzey aktif maddelere ait olarak sınıflandırılabilir. Penetrasyon arttırıcılar ve kullanımları ABD Patenti No. 6,287,860'da ayrıca tanımlanmıştır.

25 Teknikte uzman bir kişi, formülasyonların, kullanım amaçlarına, yani uygulama yoluna göre rutin olarak tasarlandığını anlayacaktır.

30 Topik uygulama için tercih edilen formülasyonlar, açıklamanın oligonükleotitlerinin, lipitler, lipozomlar, yağ asitleri, yağlı asit esterleri, steroidler, kelatlama maddeleri ve yüzey aktif cisimleri gibi topikal bir aktarım maddesi ile karışım halinde bulunmasını kapsar. Tercih edilen lipidler ve lipozomlar, nötr (örn., dioleoil-fosfatidil DOPE etanolamin, dimiristoilfosfatidil kolin DMPC, distearolyfosfatidil kolin) negatif (örn., dimiristoilfosfatidil gliserol DMPG) ve katyonik

(örn., dioleoiltetrametilaminopropil DOTAP ve dioleoil-fosfatidil etanolamin DOTMA) içerir.

Topikal veya başka uygulama için, açıklamanın
5 oligonükleotitleri lipozomlar içinde kapsüllenebilir veya özellikle katyonik lipozomlara kompleksler oluşturabilir. Alternatif olarak, oligonükleotitler lipitlere, özellikle katyonik lipitlere kompleksleştirilebilir. Tercih edilen yağ asitleri ve esterler, bunların farmasötik olarak kabul
10 edilebilir tuzları ve kullanımları, ABD Patenti No. 6,287,860'da tanımlanmıştır.

Oral uygulama için bileşimler ve formülasyonlar, toz veya granüller, mikro parçacıklar, nanopartikülatlar, süspansiyonlar
15 veya su veya sulu olmayan ortamdaki solüsyonlar, kapsüller, jel kapsüller, tek dozluk paketler, tabletler veya mini tabletlerdir. Yoğunlaştırıcılar, lezzet verici maddeler, seyrelticiler, emülsifiye ediciler, dağıtıcı yardımcı maddeler veya bağlayıcılar arzu edilebilir. Tercih edilen oral formülasyonlar,
20 açıklamanın oligonükleotitlerinin bir veya daha fazla penetrasyon arttırıcı yüzey aktif madde ve kelatlayıcı ile birlikte uygulandığı formülasyonlardır. Tercih edilen yüzey aktif maddeler arasında yağ asitleri ve/ veya esterleri veya bunların tuzları, safra asitleri ve/ veya bunların tuzları
25 bulunur. Tercih edilen safra asitleri/ tuzları ve yağlı asitler ve kullanımları ayrıca ABD Patenti No. 6,287,860'da açıklanmaktadır.

Ayrıca tercih edilenler, penetrasyon arttırıcıların, örneğin safra asitleri/ tuzları ile kombinasyon halinde yağ asitleri/
30 tuzlarının kombinasyonlarıdır. Özellikle tercih edilen bir kombinasyon, laurik asit, kaprik asit ve UDCA'nın sodyum tuzudur. Daha fazla penetrasyon arttırıcılar arasında polioksietilen-9-lauril eter, polioksietilen-20-setil eter bulunur. Tarifnamenin oligonükleotitleri, püskürtülerek kurutulmuş parçacıklar dahil
35 granüler formda oral olarak veya mikro veya nanopartiküller

oluşturmak üzere kompleks halinde verilebilir. Oligonükleotit kompleksleştirici ajanlar ve kullanımları ayrıca ABD Patenti No. 6,287,860'da tanımlanmıştır.

5 Parenteral, intratekal veya intraventriküler uygulama için bileşimler ve formülasyonlar arasında ancak sınırlayıcı olmamak üzere sızdırmazlık arttırıcılar, taşıyıcı bileşikler ve diğer farmasötik açıdan kabul edilebilir taşıyıcılar veya eksipyanlar gibi tamponlar, seyrelticiler ve diğer uygun katkı maddeleri de
10 içerebilen steril sulu solüsyonlar bulunabilir.

Açıklamanın belirli örnekleri, bir veya daha fazla oligomerik bileşik ve bir antisens olmayan mekanizma ile çalışan bir veya daha fazla başka kemoterapötik ajan içeren farmasötik bileşimler
15 sağlar. Bu tür kemoterapötik ajanların örnekleri arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, daunorubisin, daunomisin, daktinomisin, doksorubisin, epirubisin, idarubisin, esorubisin, bleomisin, mafosfamid, ifosfamid, sitosin arabinosid, biskloroetil- nitrosurea, busulfan, mitomisin C, aktinomisin D,
20 mithramisin, prednizon, hidrokspirogesteron, testosteron, tamoksifen, dakarbazin, prokarbazin, heksametilmelamin, pentametilmeme, mitoksantron, amsakrin, klorambusil, metilsikloheksilnitrozüre, azot hardalları, melfalan, siklofosfamid, 6-merkaptopurin, 6-tioguanin, sitarabin, 5-
25 azasitidin, hidroksiüre, deoksikoformisin, 4- hidrokspiroksisiklo-fosforamid, 5-florourasil (5-FU), 5-florodeoksiüridin (5-FUdR), metotreksat (MTX), kolşisin, taksol, vinkristin, vinblastin, etoposid (VP-16), trimetreksat, irinotekan, topotekan, gemsitabin, teniposid, sisplatin ve
30 dietilstilbestrol (DES) gibi kanser kemoterapötik ilaçları bulunur. Açıklamaya ait bileşiklerle birlikte kullanıldıklarında, bu tür kemoterapötik maddeler münferit olarak (örneğin, 5-FU ve oligonükleotit), sıralı olarak (örn., bir süreliğine 5-FU ve oligonükleotit, ardından MTX ve oligonükleotit) veya bir veya
35 daha fazla başka böyle kemoterapötik ajanlar (örn., 5-FU, MTX ve

oligonükleotit veya 5-FU, radyoterapi ve oligonükleotit) ile kombinasyon halinde kullanılabilir. Nonsteroidal anti-enflamatuar ilaçlar ve kortikosteroidler ve bunlarla sınırlı olmamak üzere ribivirin, vidarabin, asiklovir ve gansiklovir dahil olmak üzere antiviral ilaçlar dahil ancak bunlarla sınırlı olmayan anti-enflamatuar ilaçlar da, buluşun bileşimlerinde birleştirilebilir. Antisens bileşiklerin ve diğer antisens olmayan ilaçların kombinasyonları da bu açıklamanın kapsamındadır. İki veya daha fazla kombine bileşik birlikte veya 10 sırayla kullanılabilir.

Bir başka ilgili örnekte açıklamaya ait bileşimler, bir birinci nükleik asit ve bir ikinci nükleik asit hedefine hedeflenen bir veya daha fazla ilave antisens bileşene yönelik olarak bir veya 15 daha fazla antisens bileşik, özellikle de oligonükleotitler ihtiva edebilir. Örneğin, birinci hedef, Beyin kaynaklı nörotrofik faktörün (BKNF) belirli bir antisens dizisi olabilir ve ikinci hedef başka bir nükleotit dizisinden bir bölge olabilir. Alternatif olarak, açıklamanın bileşimleri, aynı Beyin kaynaklı 20 nörotrofik faktör (BKNF) nükleik asit hedefinin farklı bölgelerine hedeflenen iki veya daha fazla antisens bileşiği içerebilir. Çok sayıda antisens bileşiği burada gösterilmektedir ve diğerleri bu alanda bilinen uygun bileşikler arasından seçilebilir. İki veya daha fazla kombine bileşik birlikte veya 25 sırayla kullanılabilir.

Dozlama:

Terapötik bileşimlerin formülasyonu ve bunların sonraki uygulamalarının (dozlama), teknikte uzman kişilerin bilgisi 30 dahilinde olduğuna inanılmaktadır. Dozajlama, mualeme edilecek hastalık durumunun ciddiyeti ve tepki durumu ile birkaç günden birkaç aya kadar sürecektir mualemenin seyrine veya bir iyileşmenin sağlanmasına veya hastalık durumunun azalmasına bağlıdır. Optimal doz şemaları, hastanın vücudundaki ilaç birikimi

ölçümlerinden hesaplanabilir. Teknikte sıradan yetenekte kişiler, optimum dozajları, dozlama metodolojilerini ve tekrarlama oranlarını kolayca belirleyebilirler. Optimum dozajlar, münferit oligonükleotitlerin nispi kuvvetine bağlı olarak değişebilir ve genellikle in vitro ve in vivo hayvan modellerinde etkili olduğu bulunan EC50'lere dayanarak tahmin edilebilir. Genel olarak, dozaj vücut ağırlığının kilogramı başına 0.01 µg ila 10 mg arasındadır ve günde bir veya birkaç kez, haftalık, aylık veya yıllık olarak veya hatta 2 ila 20 yılda bir kez verilebilir.

10 Teknikte sıradan yetenekte kişiler, ölçülmüş ikamet süreleri ve ilacın vücut sıvıları veya dokuları içindeki konsantrasyonlarına dayanarak dozlama için tekrarlama oranlarını kolayca tahmin edebilir. Başarılı mualemeden sonra, hastalık durumunun nüksetmesini önlemek için hastanın bakım mualemesi görmesi

15 istenebilir, burada oligonükleotit, vücut ağırlığının kilogramı başına 0.01 µg ila 10 mg, günde bir veya daha fazla, her 2-20 yılda bir olmak üzere bakım dozlarında uygulanır.

Örnek olarak, bir hasta, en az yaklaşık 1, en az yaklaşık 2, en az yaklaşık 3, en az yaklaşık 4, en az yaklaşık 5, en az yaklaşık 6, en az yaklaşık 7, en az yaklaşık 8, en az yaklaşık 9, en az yaklaşık 10, en az yaklaşık 15, en az yaklaşık 20, en az yaklaşık 25, en az yaklaşık 30, en az yaklaşık 35, en az yaklaşık 40, en az yaklaşık 45, en az yaklaşık 50, en az yaklaşık 60, en az yaklaşık 70, en az yaklaşık 80, en az yaklaşık 90 veya en az yaklaşık 10 mg/ kg vücut ağırlığı olan bir ilaç dozajı ile mualeme edilir. Bazı enjekte edilen antisens oligonükleotit dozajları, örn., "PTP1B ekspresyonunun antisens modülasyonu" başlıklı ABD Patenti No. 7,563,884'de tanımlanmıştır.

30

Mevcut açıklamanın çeşitli örnekleri yukarıda açıklanmış olmakla birlikte, bunların sadece örnek yoluyla sunulmuş olduğu ve sınırlama olmadığı anlaşılmalıdır. Açıklanan örneklerle yapılan çok sayıda değişiklik, burada açıklanan açıklamaya uygun

olarak, açıklamanın özünden veya kapsamından ayrılmadan yapılabilir. Bu nedenle, bu açıklamanın sahası ve kapsamı, yukarıda açıklanan örneklerin herhangi biri ile sınırlı olmamalıdır.

5

Bu belgede yer alan çeşitli referanslara atıfta bulunarak, Başvuru Sahipleri herhangi bir referansın buluşları için "önceki teknik" olduğunu kabul etmemektedir. Buluşa ait kompozisyonların ve yöntemlerin düzenlemeleri, aşağıdaki örneklerde

10

ÖRNEKLER

Aşağıdaki sınırlayıcı olmayan örnekler, buluşun seçilmiş uygulamalarını açıklamaya hizmet eder. Gösterilen bileşenlerin

15

elemanlarındaki oran ve alternatiflerin varyasyonlarının, teknikte uzman kişilerce anlaşılacağı ve mevcut açıklamanın örnekleri kapsamında olduğu takdir edilecektir.

Örnek 1: Beyin kaynaklı nörotrofik faktöre (BKNF) ve/ veya BKNF polinükleotidine ait bir sens ipliğine bir nükleik asit molekülü

20

antisensine özgü antisens oligonükleotitlerin tasarımı

Yukarıda belirtilen "oligonükleotit spesifik" veya "oligonükleotit hedefleri" terimi, (i) hedeflenen genin bir kısmı ile stabil bir kompleks oluşturabilir veya (ii) hedeflenen

25

genin bir mRNA transkriptinin bir kısmı ile stabil bir dupleks oluşturabilir bir diziye sahip olan bir oligonükleotide karşılık gelir.

Uygun oligonükleotitlerin seçimi, her bir dizide, istenen

30

erime sıcaklığına (genellikle 50-60°C) sahip bir hedef polinükleotid dizisi ile hibritler oluşturacak ve kendi kendine dimerler veya diğer kompleks ikincil yapıları oluşturmayacak olan 19-25 nükleotidlerin alt dizilerini otomatik olarak

tanımlayan bilgisayar programları (örn., IDT AntiSense Design, IDT OligoAnalyzer) kullanılarak kolaylaştırılır.

Uygun oligonükleotitlerin seçimi, nükleik asit dizilerini otomatik olarak hizalayan ve kimlik veya homoloji bölgelerini gösteren bilgisayar programları kullanılarak ayrıca kolaylaştırılır. Bu tür programlar, örneğin GenBank gibi veritabanlarını araştırmak veya PCR ürünlerini sıralamak suretiyle elde edilen nükleik asit dizilerini karşılaştırmak için kullanılır. Belirli bir genomun çeşitli genlerinden ve intergenik bölgelerinden nükleik asit dizilerinin karşılaştırılması, ilgilenilen gene uygun bir özgünlük derecesi sergileyen nükleik asit dizilerinin seçilmesine izin verir. Bu prosedürler, hedef nükleik asit dizilerine yüksek bir tamamlayıcılık derecesi sergileyen ve belirli bir genomdaki diğer nükleik asit dizilerine daha düşük tamamlayıcılık derecesi sergileyen oligonükleotitlerin seçilmesine izin verir. Teknikte uzman bir kişi, mevcut buluşta kullanım için uygun gen bölgelerinin seçilmesinde kayda değer bir genişlik olduğunu fark edecektir.

Bileşiğin hedef nükleik aside bağlanması, bir fonksiyon ve/veya aktivitenin modülasyonuna neden olmak için hedef nükleik asidin normal fonksiyonu ile etkileşime girdiğinde, bir antisens bileşiği "spesifik olarak hibritlenebilir" dir ve spesifik bağlamanın arzu edildiği koşullar altında, yani *in vivo* analizler veya terapötik mualeme durumunda fizyolojik koşullar altında ve *in vitro* deneyler durumunda analizlerin yapıldığı koşullar altında, hedef olmayan nükleik asit dizilerine antisens bileşiğin spesifik olmayan bağlanmasını önlemek için yeterli bir tamamlayıcılık derecesi vardır.

Burada tarif edilen oligonükleotitlerin hibridizasyon özellikleri, teknikte bilinen bir veya daha fazla *in vitro* analiz ile belirlenebilir. Örneğin burada tarif edilen

oligonükleotitlerin özellikleri, hedef doğal antisens ile erime eğrisi testi kullanılarak potansiyel ilaç molekülleri arasındaki bağlanma mukavemetinin belirlenmesiyle elde edilebilir.

5 Hedef doğal antisens ve potansiyel bir ilaç molekülü (Molekül) arasındaki bağlanma kuvveti, moleküller arası etkileşimlerin, örneğin bir erime eğrisi tahlilinin kuvvetinin ölçülmesi için yerleşik yöntemlerden herhangi biri kullanılarak tahmin edilebilir.

10

Erime eğrisi tahlili, doğal antisens/ Molekül kompleksi için çift iplikliden tek iplikli yapıya hızlı bir geçişin meydana geldiği sıcaklığı belirler. Bu sıcaklık, iki molekül arasındaki etkileşim kuvvetinin güvenilir bir ölçüsü olarak kabul

15

Bir erime eğrisi tahlili, gerçek doğal antisens RNA molekülünün bir cDNA kopyası veya Molekülün bağlanma alanına karşılık gelen bir sentetik DNA veya RNA nükleotidi kullanılarak

20 gerçekleştirilebilir. Bu testi gerçekleştirmek için gerekli tüm reaktifleri içeren çoklu kitler mevcuttur (örn. Applied Biosystems Inc. MeltDoctor kiti). Bu kitler, çift iplikli DNA (dsDNA) bağlayıcı boyalarından birini (ABI HRM boya, SYBR Green, SYTO, vb. gibi) içeren uygun bir tampon çözeltiyi içerir.

25 DsDNA boya, boyalarının özellikleri, serbest formda neredeyse hiç floresan yaymayacak şekilde, ancak dsDNA'ya bağlandığında yüksek oranda floresan yayacak şekildedir.

25

Tahlili gerçekleştirmek için cDNA veya karşılık gelen bir

30 oligonükleotit, belirli üretici protokolleri tarafından tanımlanan konsantrasyonlarda Molekül ile karıştırılır. Karışım önceden oluşturulmuş tüm dsDNA komplekslerini ayırmak için 95 °C'ye ısıtılır, daha sonra DNA moleküllerinin tavlanması sağlamak için kit üreticisi tarafından tanımlanan oda

35 sıcaklığına veya diğer düşük sıcaklığa yavaşça soğutulur. Yeni

oluşan kompleksler daha sonra yavaş yavaş 95 °C'ye ısıtılır ve aynı anda reaksiyonla üretilen floresan miktarı hakkında sürekli veri toplanır. Floresan yoğunluğu, reaksiyonda bulunan dsDNA miktarlarıyla ters orantılıdır. Veriler, kit ile uyumlu bir gerçek zamanlı PCR cihazı kullanılarak toplanabilir (örn., ABI's StepOne Plus Gerçek Zamanlı PCR Sistemi veya lightTyper cihazı, Roche Diagnostics, Lewes, UK).

Erime pikleri, uygun bir yazılım (örneğin, lightTyper (Roche) veya SDS Ayırışma Eğrisi, ABI) kullanılarak sıcaklığa (x-eksenine) karşı sıcaklığa (y ekseninde (-d (Floresan)/ dT) göre floresan negatif türevini çizerek oluşturulur. Veriler, dsDNA kompleksinden tek iplikli moleküllere hızlı geçiş sıcaklığını tanımlamak için analiz edilir. Bu sıcaklık T_m olarak adlandırılır ve iki molekül arasındaki etkileşimin kuvvetiyle doğru orantılıdır. Tipik olarak, T_m 40 °C'yi aşacaktır.

Modifiye edilmiş AntagoNAT molekülünün tasarımı:

Bir dizi DNA bazlı antisens oligonükleotiti, kodlanmamış BKNF-AS ve diğer antisens transkriptlerini hedef alan AntagoNAT'ler olarak adlandırılmış ve test edilmiştir. Çeşitli AntagoNAT'ler, tam fosforotioat modifikasyonu artı/eksi 2-O'-metil RNA veya LNA modifiye nükleotidleri olan veya olmayan 12 ila 20 nükleotid uzunluğuna sahip olacak şekilde tasarlanmıştır. En yüksek etkinlik, her uçta (XXXnnnnnnnnnnXXX) üç LNA modifiye nükleotid içeren 16 nükleotid fosforotioat gapmer ile Bknf mRNA seviyesinde gözlemlenmiştir. İnsan BKNF sens-antisens transkriptleri arasındaki etkileşimleri bloke etmek için, hem LNA hem de 2-O'-metil RNA molekülüleri içeren 14-nükleotid mikserler kullanılmıştır. Bu 2-O'-metil RNA ile modifiye edilmiş oligonükleotitlerin sadece RNA'yı bloke etmesi önerilmiş olmasına rağmen, bu deneyde hedeflenen RNA'ların marjinal aşağı regülasyonu gözlenmiştir (Şekil 11). Bu çalışmalar için

kullanılan tüm diğer siRNA'lar, primerler ve problemlerin yanı sıra çeşitli AntagoNAT'ların dizileri Tablo 1'de listelenmiştir.

Örnek 2: BKNF polinükleotidlerinin modülasyonu

5 Örnek 2'de kullanılan tüm antisens oligonükleotitler, Örnek 1'de tarif edildiği gibi tasarlanmıştır. Üreticiye (IDT Inc., Coralville, IA), tasarlanan fosfotiyoat bağ oligonükleotitlerini üretmesi talimatı verilmiş ve Tablo 1'de gösterilen tasarlanmış fosfotiyoat analogları sağlanmıştır. Nükleotitler arasındaki yıldız işareti fosfotiyoat bağının varlığını gösterir. Örnek 10 2'deki deney için gerekli olan oligonükleotitler, herhangi bir uygun yöntem kullanılarak, örneğin IDT tarafından kullanılan yöntemle: fosforamidit monomerleri kullanılarak 5 mikron kontrollü gözenekli cam boncuk (CPG) gibi katı destek üzerinde sentezlenebilir. (koruma grupları ile korunan tüm aktif gruplara 15 sahip normal nükleotidler, örn., şekerin üzerinde tritil grubu, A ve C üzerinde benzoil ve G üzerinde N-2-izobutiril). Koruma grupları oligonükleotit sentezi sırasında istenmeyen reaksiyonları önler. Sentez işleminin sonunda koruma grupları 20 çıkarılır. Başlangıçtaki nükleotid, 3' karbon boyunca katı desteğe bağlanır ve sentez, 3' ile 5' yönüne doğru ilerler. Büyüyen bir oligonükleotit zincirine yeni bir baz eklenmesi dört aşamada gerçekleşir: 1) koruma grubu, trikloroasetik asit kullanılarak 5' immobilize edilmiş nükleotitin oksijeninden 25 çıkarılır; 2) hareketsizleştirilmiş ve sıradaki nükleotidler, tetrazol kullanılarak bir araya getirilir; reaksiyon bir tetrazolil fosforamidit ara maddesi ile ilerler; 3) reaksiyona girmemiş serbest nükleotidler ve reaksiyon yan ürünleri yıkanır ve reaksiyona girmemiş hareketsiz oligonükleotitler, bir sonraki 30 sentez döngüsüne katılmalarını önlemek için kapatılır; kapama, asetik anhidrit ve N-metil imidazol kullanılarak serbest 5' hidroksilin asetilleştirilmesiyle elde edilir; 4) nükleotidler arasındaki bağı stabilize etmek için, fosfor, bir fosfodiester

bağı üretilecekse, iyot ve su kullanılarak veya bir fosfotiyolat bağı isteniyorsa, Beaucage reaktifi (3H-1,2-benzoditiyol-3-bir-1,1-dioksit) kullanılarak oksitlenir. İki oksitleyici ajanı değiştirerek, kimerik bir omurga inşa edilebilir. Yukarıda
5 açıklanan dört aşamalı döngü, dizideki her nükleotid için tekrarlanır. Bütün dizi sentezlendiğinde, oligonükleotit katı destekten ayrılır ve yüksek sıcaklıkta amonyum hidroksit kullanılarak koruması kaldırılır. Koruma grupları tuzdan arındırılarak yıkanır ve kalan oligonükleotitler liyofilize
10 edilir.

BKNF mRNA miktarını ölçmek için farklı siRNA ile Hek293 hücrelerinin muamelesi

1. ATCC'den (cat# CRL-1573) Hek293 hücreleri, 37°C'de ve %5
15 CO₂'de MEM/ EBSS (Hyclone cat # SH30024) +%10 FBS + penisilin+streptomisin içinde büyütülmüştür. Deneyden bir gün önce, hücreler 5x10⁵/kuyucuk yoğunlukta 6 kuyucuklu plakalar içine yeniden yerleştirildi ve 37 °C ve %5 CO₂'de inkübe edildi.
2. Deney gününde, 6 kuyucuklu plakalardaki ortam taze MEM /
20 EBSS +% 10 FBS olarak değiştirildi.
3. Tüm BKNF-AntagoNAT (BKNF-AS'nin oligonükleotit antisensi),
20 uM ve BKNF-AS siRNA'sı (10uM'de BKNF-AS'yi tamamlayan siRNA'ya seyreltildi; her iki oligonükleotit bileşiği IDT tarafından üretildi. Bir kuyucuğu dozlamak için, bu çözeltinin
25 2 µl'si, 20 dakika boyunca oda sıcaklığında 400 µl Opti-MEM ortamı (Gibco cat#31985-070) ve 4 ul Lipofectamine 2000 (Invitrogen cat#11668019) ile inkübe edildi ve HepG2 hücreleri ile 6 kuyucuklu plakaların bir kuyucuğuna damla damla uygulandı. Sahte transfekte edilmiş kontroller için
30 oligonükleotit çözeltisi yerine 2 µl su içeren benzer bir karışım kullanılmıştır.

4. 37 °C'de ve %5 CO₂'de 3-18 saat inkübasyondan sonra ortam taze MEM/ EBSS + %10 FBS + penisilin+streptomisine değiştirildi.

5. Antisens oligonüklotidlerin eklenmesinden 48 saat sonra gerçekleştirildi. Daha sonra ortam çıkarıldı ve üreticinin talimatlarına göre Promega'dan (cat # Z3105) SV Total RNA İzolasyon Sistemi kullanılarak veya Qiagen'den (cat# 74181) RNeasy Total RNA İzolasyon kiti kullanılarak hücrelerden RNA ekstrakte edildi.

6. Rastgele heksamerler, 2.5 mM dNTP, MgCl₂ ve uygun tampon karışımı kullanılarak gerçekleştirilen ters transkripsiyon reaksiyonuna 200-400 ng özütlenmiş RNA eklendi. Bu ters transkripsiyon reaksiyonundan cDNA (20-40ng), ABI Taqman Gen Ekspresyon Karışımı (cat#4369510) ve 300nM ileri ve geri primerler ve son reaksiyon hacmi 15µl olan 200nM prob kullanılarak gerçek zamanlı PCR ile gen ekspresyonunu izlemek için kullanılmıştır. Primerler/ problar FileBuilder yazılımı (Applied Biosystem) kullanılarak tasarlanmıştır. Primerler, sens-antisens çiftleri için ipliğe özgüydü ve problar, genomik DNA amplifikasyonu olasılığını ortadan kaldırmak için egson sınırlarını kapladı. İnsan BKNF'si için ABI tahlili, Applied Biosystems Inc., Foster City CA tarafından Applied Biosystems Taqman Gen Ekspresyon Tahlili: Hs00542425_s1 (BKNF) idi). Aşağıdaki PCR döngüsü kullanıldı: 2 dakika boyunca 50 °C, 10 dakika boyunca 95 °C, GeneAmp 7900 Makinesi (Applied Biosystems) kullanılarak 40 döngü (15 saniye boyunca 95 °C, 1 dakika 60 °C). Antisens oligonükleotitleri ile muameleden sonra gen ekspresyonundaki kat değişikliği, muamele edilen ve sahte transfekte edilen numuneler arasındaki 18S normalize dCt değerlerine göre hesaplandı.

7. BKNF-AS için tespit oligoları:

ABI tespit Kimliği Hs00417345_m1 Bağlam dizisi
GCACACCTGGAGATACTCTATTATA (DİZİ KİM. NO: 65)

8. BKNF için tespit oligoları:

ABI tespit Kimliği Hs00542425_s1
CCTGCAGAATGGCCTGGAATTACAA (DİZİ KİM. NO: 66)

5 BKNF-AS için tespit oligoları: ABI tespit Kimliği
Hs00417345_m1 Bağlam dizisi GCACACCTGGAGATACTCTATTATA
(DİZİ KİM. NO: 65)
BKNF için tespit oligoları: ABI tespit Kimliği
Hs00542425_s1 CCTGCAGAATGGCCTGGAATTACAA (DİZİ KİM. NO:
66)

10 9. Sonuçlar, döngü eşiği (Ct) değerlerine dayanmaktadır. ddCt
olarak deneysel ve referans genler (18S RNA) için Ct değerleri
ve kalibratör numunesine her RNA'nın bir yüzdesi olarak
grafiksel olarak hesaplanan farklar.

15

Sonuçlar: BKNF-AS transkriptinin çakışmayan bölgelerini hedef
alan farklı siRNA'ya sahip HEK293T hücreleri dahil olmak üzere
birkaç insan ve fare hücre hattının transfeksiyonu, BKNF
transkriptinin (Şekil 1a ve Şekil 6) 48 saatte bir 2-6 kat yukarı
20 regülasyonunu göstermektedir. BKNF'nin yukarı regülasyonu
endojen kontrollerin seçimi ile ilgili değildi (Şekil 5a-b).
Yukarı regülasyon, diğer BKNF komşu genlerin regülasyonunu
etkilememiştir (Şekil 9).

25 Şekil 5 BKNF mRNA yukarı regülasyonuna sebep olan BKNF-AS
demontesini göstermektedir. BKNF-AS transkriptinin çakışmayan
bölgesini hedefleyen siRNA'-1 (10 nM) kullanarak BKNF-AS'nin
demonte edilmesi, BKNF (sens) mRNA'sının 6 kat yukarı
regülasyonuna neden olmuştur (**** = pdeğeri <0.0001). Burada
30 gösterilen sonuçlar, endojen kontroller olarak beta aktin (sol
panel) veya 18S rRNA (sağ panel) ve referans örnek olarak sahte
transfeksiyon kullanılarak HEK293T hücrelerindeki deneylerden
elde edildi. Bu deney, endojen kontrollerin veya referans

kalibratör numunesinin seçiminin, BKNF mRNA'nın gözlemlenen yukarı regülasyonunu değiştirmedeğini göstermeyi amaçlamaktadır.

Şekil 6, BKNF ekspresyonunun Posttranskripsiyonel regülasyonunu göstermektedir. Fare Bknf-AS transkripti hedefleyen mBknf-AntagoNAT9 ve mikroRNA (miRNA) işleminde yer alan Drosha proteinini hedefleyen Drosha siRNA kombinasyonu ile transfekte N2a hücreleri. MBknf-ANTagoNAT9 (***) = p değeri <0.0001) ile hücrelerin muamelesinden sonra Bknf mRNA yukarı regülasyonu gözlemlendi. Drosha siRNA'nın eklenmesi, mBknf-AntagoNAT9 muamelesi üzerinde marjinal olarak Bknf transkriptini arttırmıştır (* = p değeri <0.05). Bu deney, Bknf transkriptinin düzenlenmesi için miRNA'lar gibi başka transkripsiyonel mekanizmaların dahil edilmesini önerebilir.

Şekil 9, BKNF-AS demontesinin, ne TrkB seviyesini ne de BKNF komşu genlerin (Let7C ve KIF18A) her iki yönde de değiştirmedeğini göstermektedir: LIN7C ve KIF18A, sırasıyla BKNF'nin 3' aşağı akış yönünde ve 5' yukarı akış yönünde bulunan genlerdir. Nörotrofik tirozin kinaz, reseptör, tip 2 (TrkB), BKNF için bir membrana bağlı reseptörü kodlar ve BKNF olarak farklı bir kromozom (Chr-9) üzerinde bulunur. BKNF-AS transkriptinin tükenmesi üzerine bu genlerin değiştirilip değiştirilmediği belirlenmiştir. HEK293T hücreleri kontrol siRNA veya BKNF-AS siRNA ile transfekte edilmiş ve birkaç transkript seviyesi ölçülmüştür. BKNF-AS transkripti aşağı regüle edilmiş ve BKNF mRNA'nın bu yazının başka bir yerinde belirtildiği gibi yukarı regüle edildiği gözlemlenmiştir. BKNF-AS'nin demonte edilmesinin TrkB ekspresyonu veya komşu genler Let7C ve KIF18A üzerinde bir etkisi olmadığı bulunmuştur. Bu veriler, BKNF-AS tükenmesi üzerine BKNF ekspresyonunun lokusa özgü bir değişikliği olduğunu göstermektedir.

BKNF ve BKNF-AS miktarını ölçmek için Hek239 hücrelerinin bir siRNA ile 0-96 saat arasında muamelesi

Takip edilen metodoloji, Hek293 hücrelerinin siRNA ile Muamelesi ile aynıydı, ancak bu sefer hücreler, oligoların ilavesinden sonra 0 ila 96 saat arasında toplandı.

- 5 *Sonuçlar:* BKNF ve BKNF-AS ekspresyonunun zaman süreci, 48 saatte siRNA'ya bağlı olarak, BKNF-AS'nin optimum bir aşağı regülasyonuna eşzamanlı olarak BKNF'nin optimum bir yukarı regülasyonunu gösterir (Şekil 1b).

10 *BKNF ve BKNF-AS miktarını belirlemek için farklı hBKNF-AntagoNAT'lerle Hek293 hücrelerinin muamelesi*

Takip edilen metodoloji, Hek293 hücrelerinin siRNA ile muamelesi ile aynıydı, ancak bu sefer hücreler AntagoNAT'lar ile muamele edildi.

- 15 *Sonuçlar:* BKNF-AS transkripti, BKNF mRNA'ya tam tamamlayıcılığı olan 225 nükleotitlik çakışan bir bölge içerir. RNA-RNA etkileşimleri, BKNF'nin antisens transkriptiyle uyumsuz regülasyonundan sorumlu olabilir. BKNF-AS'nin BKNF mRNA'sı üzerindeki düzenleyici rolünü belirlemek için, hem LNA hem de
- 20 2'OMe RNA modifikasyonlarını içeren gapmerler (AntagoNAT'ler), sens ve antisens transkriptleri arasındaki etkileşimi bloke etmek için kullanılmıştır. Çakışan bölge, hBKNF-AntagoNAT'lerin döşenmesiyle kaplandı. hBKNF-AntagoNAT'lerin kullanımının BKNF mRNA'sını yukarı regüle ettiği bulunmuştur. BKNF-AS
- 25 transkriptinin bir marjinal aşağı regülasyonu gözlemlendi; bu, 2'OMe-RNA'yı bloke eden oligolar için beklenmiyordu. 16 hBKNF-AntagoNAT'ler test edildi ve BKNF-AS çakışan bölgenin birinci yarısını bloke etmenin BKNF mRNA'nın yukarı regülasyonu üzerinde daha büyük bir etkiye sahip olduğu bulundu. Spesifik olarak,
- 30 hBKNF-AntagoNAT1 ve hBKNFAntagoNAT4, BKNF mRNA'nın önemli ölçüde yukarı regülasyonuna neden olmuştur. Sentetik siRNA'ların aksine, antisens oligonükleotitler tek ipliklidir ve uzunlukları daha kısa olabilir; bu nedenle, spesifik olmayan (hedef dışı)

bağlanma etkilerini azaltır. Tek iplikli kilitli nükleik asit (LNA) ile modifiye edilmiş oligonükleotitler, modifiye edilmemiş siRNA'lara kıyasla genellikle daha etkilidir (Şekil 7).

5 *BKNF ve BKNF-AS miktarını belirlemek için farklı mBKNF-AntagoNAT'lerle fare N2a hücrelerinin muamelesi*

Takip edilen metodoloji, BKNF ve BKNF-AS miktarını ölçmek için farklı hBKNF-AntagoNAT'lerle Hek293 hücrelerinin Muamelesi için olan ile aynıydı, ancak bu sefer hücreler N2a hücreleri idi. 10 Ayrıca, aşağıdaki PCR döngüsü kullanıldı: 2 dakika boyunca 50 °C, 10 dakika boyunca 95 °C, GeneAmp 7900 Makinesi (Applied Biosystems) kullanılarak 50 döngü (15 saniye boyunca 95 °C, 1 dakika 60 °C).

Sonuçlar (Şekil 8), N2a hücrelerindeki fare Bknf-AS 15 transkriptinin, AntagoNAT'ler tarafından engellenmesini gösterir: insan BKNF sens ve antisens transkriptleri arasındaki çakışma bölgesinin bloke edilmesinin, BKNF mRNA seviyelerini yukarı doğru regüle ettiğini gösterir. Daha sonradan, bir fare hücre hattında benzer bir regülatör mekanizma olup olmadığı 20 belirlendi ve fare Bknf-AS transkriptini hedef alan 11 mBknf-AntagoNAT'leri test edildi. mBknf-AntagoNAT'ler, hem 3' hem de 5' uçlarında bir fosforotioat omurgası ve üç LNA ile modifiye edilmiş nükleotit içerir. Kontrol oligonükleotitleri benzer bir omurgaya ve modifikasyonlara sahiptir, fakat memeli genomlarında 25 herhangi bir diziyi hedeflemez. İki mBknf-AntagoNAT (mBknf-AntagoNA3 ve mBknf-AntagoNAT-9), N2a hücrelerinde Bknf mRNA seviyelerini arttırabilmiştir. Özetle, fare Bknf-AS transkriptinin tek iplikli AntagoNAT'ler (16-mer) ile bloke edilmesi, fare N2a hücrelerinde Bknf mRNA seviyelerinin yukarı 30 regülasyonuna neden olmuştur. Bu veriler, Bknf antisens transkripsiyonunun Bknf mRNA üzerinde baskılayıcı bir etki gösterdiğini düşündürmektedir.

BKNF proteinini ölçmek için farklı siRNA ile Hek293 hücrelerinin muamelesi

Takip edilen metodoloji, BKNF mRNA miktarını ölçmek için farklı siRNA ile Hek293 hücrelerinin muamelesi için olan ile, 5. aşamada siRNA ilavesinden 48 saat sonra gerçekleştirilmiş olması haricinde aynıydı. Daha sonra ortam çıkarıldı ve hücreler parçalandı ve BKNF proteini seviyeleri, ELISA (Şekil 1c) ve western blot (Şekil 1d) ile ölçüldü.

10

Western blot HEK293T hücreleri, 10 nM BKNF-AS veya kontrol siRNA ile transfekte edildi. Hücreler, 350 mM DTT içeren 200 µl Laemmli numune tamponu (Biorad) ile transfeksiyondan 48 saat sonra bozuldu. 20 µl lizat %10 SDS PAGE üzerinde ayrıldı ve gece boyunca bir nitroselüloz membranına aktarıldı. Daha sonra, membran, MecP2 (Abcam), BKNF (Promega, katalog numarası G164B) ve HRP'ye konjuge edilmiş ikincil antikor için birincil antikor ile inkübe edildi. HRP substratının eklenmesinden sonra, kemilüminesan sinyali, X-ışını filmi ile tespit edildi. Aynı membran soyuldu ve yükleme kontrolü olarak β -Aktin'in tespiti için tekrar kullanıldı.

ELISA: Hücreler 20 nM BKNF-AS siRNA veya kontrol siRNA ile transfekte edildi. ELISA deneyleri için hücre süpernatantı toplandı. Alternatif olarak, toplam protein, protein ekstraksiyon tamponu artı proteaz inhibitörleri (BCA kiti, Fisher) içine gömülü fare beyin dokularından ekstrakte edildi ve biyobozucu ve metal boncuklar ile homojenize edildi. Total protein, BCA protein testi kiti (Pierce katalog numarası 23227) kullanılarak ölçüldü ve örnek yükler toplam protein konsantrasyonlarına normalize edildi, ELISA kitleri Promega (katalog numarası G7611) veya fare Bknf Millipore'dan (katalog numarası CYT306) insan BKNF için satın alındı ve tedarikçinin protokolünü takiben ELISA gerçekleştirildi. Ortalama absorbans,

arka arkaya 450 nm'de üç tekrardan çıkarıldı ve kontrol örneğine normalleştirildi.

BKNF mRNA'yı ölçmek için farklı konsantrasyonlarda mBKNF-AntagoNAT9 ile Hek293 hücrelerinin (kesin değil) muamelesi

5

Takip edilen metodoloji, BKNF mRNA miktarını ölçmek için farklı siRNA'lı Hek293 hücrelerinin muamelesi ile , aynı hacimde Opti-MEM ortamını kullanarak (Gibco cat# 31985-070) BKNF mRNA miktarını ölçmek için farklı siRNA ile Hek293 hücrelerinin mualemesinde olduğu gibi, aynı orantılı miktarda Lipofectamine 2000 (Invitrogen cat# 11668019) kullanılarak, 11 farklı konsantrasyonun sonuncusunun hücrelere (300nM ile 5pM arasında değişen 1:3 seri seyreltiler) uygulanması gibi tüm mBKNF-AntagoNAT9'un farklı konsantrasyonlara seyreltildiği 3. adım haricinde aynıydı. Bu, oda sıcaklığında 20 dakika boyunca gerçekleştirildi ve HepG2 hücreleri ile 6 kuyucuklu plakaların bir gözüne damla damla uygulandı. Sahte transfekte edilmiş kontroller için oligonükleotit çözeltisi yerine su içeren benzer bir karışım kullanılmıştır.

20 *Sonuçlar:* Şekil 1e'de gösterildiği gibi, BKNF-AS mBKNF-AntagoNAT9 tarafından hedeflendiğinde BKNF'nin doza bağımlı bir yukarı regülasyonu vardır.

Şekil 1, sens mRNA ve proteinin antisens aracılı düzenlemesini göstermektedir. (A) BKNF-AS transkriptinin çakışmayan bölgesini hedef alan üç benzersiz siRNA'nın (10 nM) her biri ile HEK293T hücrelerinde (mualeme başına n = 12), Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BKNF) doğal antisens transkript, BKNF-AS'nin demontesi, BKNF (sens) mRNA'sının 2-6 kat yukarı regülasyonuna (her bir veri noktası/ mualeme için n = 6 *** =P <0.001, ** =P <0.01) neden oldu. Benzer sonuçlar İnsan kortikal nöron (HCN), glioblastoma (MK059) hücreleri, fare N2a hücreleri ve nörosferleri "veriler gösterilmemiştir" kullanılarak yapılan deneylerden elde edilmiştir. Kontrol olarak karmaşık diziler,

sahte transfeksiyon ve kontrol siRNA'ları kullanıldı. Bu ve diğer deneyler için kontrol siRNA, memeli genomunda bilinen herhangi bir diziyi hedeflemeyen bir inert siRNA'dır (CCUCUCCACGCGCAGUACATT). Tüm ölçümler 18S rRNA'ya 5 normalleştirildi ve negatif siRNA kontrol örneğine her mRNA'nın bir yüzdesi olarak grafiklendi.

(B) BKNF ve BKNF-AS transkriptlerindeki değişiklikler, BKNF-AS demonte edildikten sonra (her bir veri noktası/ mualeme için n = 6) bir süre boyunca değerlendirildi. İnsan 10 BKNF-AS'nin siRNA demontesi, 6 saatten başlayarak ve 72 saate kadar devam ederek BKNF-AS'nin etkili ve tutarlı bir şekilde aşağıya regülasyonunu sağladı. BKNF mRNA seviyeleri, 18 saatte yükseldi, 72 saatten daha uzun süre yüksek kaldı, 96 saatte ön mualeme seviyelerine geri döndü. 48 saatte 15 pikin tutarlı ve tekrarlanabilir olduğu unutulmamalıdır. BKNF-AS demontesi 6 saat sonra başlasa da, BKNF'nin yukarı regülasyonu mualemeden 18 saat sonra başlamıştır. BKNF-AS'nin tükenmesi ile BKNF mRNA'sının artması arasındaki bu zaman gecikmesi, hücrelerin BKNF'yi yukarı regüle etmeden 20 önce antisens transkriptinin uzaklaştırılmasına uyum sağlamak için zamana ihtiyaç duyduğunu gösteren olayların ardışık sırasını gösterir.

(C) BKNF-AS transkriptinin siRNA aracılı demonte edilmesi, ELISA ile ölçülen BKNF protein seviyelerinde bir artışa 25 neden oldu. Hücreler 48 saat boyunca BKNF-AS için 10 nM iki aktif siRNA, karmaşık siRNA veya bir kontrol siRNA ile transfekte edildi. Bu hücrelerin süpernatantları konsantre edildi ve ticari olarak temin edilebilen bir kit kullanılarak ELISA ile BKNF proteini için analiz edildi. 30 BKNF-protein transkriptini hedefleyen siRNA ile BKNF proteini önemli ölçüde artmıştır (muamele başına n = 6, *** =P <0.0001, ** =P <0.001).

(D) Western blotları, BKNF-AS siRNA1 ile protein-kodlayıcı olmayan BKNF-AS'nin demonte edilmesinin, ancak kontrol 35 hedefli olmayan siRNA transkriptinin, beta-aktin

seviyelerini değiştirmeden BKNF protein seviyelerini arttırdığını doğrulamıştır. Toplu olarak, bu veriler BKNF-AS'nin BKNF mRNA ve proteinin ekspresyonunu baskıladığı sens ve antisens BKNF transkriptleri arasında uyumsuz bir ilişki olduğunu göstermektedir. Bu negatif düzenleyici etkinin BKNF-AS demonte edilmesiyle giderilmesi, BKNF mRNA ve protein seviyelerinin artmasına neden olur.

(E) Bknf-AS tükenmesini takiben Bknf'de doza bağlı artışlar: Doz tepkisi deneyleri, 11 farklı konsantrasyon (300 nM ila 5 pM arasında 1: 3 seri seyreltme) mBknf-AntagoNAT9 (veri noktası/ mualeme başına n=6) kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve Bknf mRNA seviyelerinde, 1-300 nM konsantrasyonda bir EC50 6.6 nM ile doza bağlı bir artış gözlenmiştir.

siRNA ile hipokampal nörosferlerin mualemesi

Nörosferlerde fare hipokampal nöral kök hücrelerin kesilmesi: nöronal kök hücreler, P0-P1 fare yavrularının hipokampusundan ayrıldı. Hipokamplar mekanik olarak tekli hücrelere ayrıldı, kısa devirlerle toplandı ve DMEM ve F12'nin bir karışımı içinde büyütüldü, glutamin, antibiyotikler, B27 çözeltisi ve hem EGF hem de FGF'nin 0.001 mM konsantrasyonu içeriyordu. 3-4 gün sonra yüzen nörosferleri oluşmuştur. 100,000 hücre, poli-L-Lizin (PLL) ile kaplanmış 24 kuyucuklu plakalara yerleştirildi. Nörosfer hücrelerinin PLL üzerine kaplanması, farklılaşma sürecini başlatır. Kaplama sonrası üçüncü günde, büyüme faktörleri ortamdan uzaklaştırılmış ve hücrelerin 4 gün daha büyümesi sağlanmıştı (kaplamadan 7 gün sonra). Bu zamana kadar, hücre kültürü, astrositler, nöronlar, oligodendrositler ve bunların progenitörlerinden oluşan sinir hücre soylarının bir karışımını olgun beyin dokusuna daha benzer hale getirdi. Bknf ve Bknf-AS ekspresyonu, yüzen nörosferlerin yanı sıra kaplama sonrası 3 ve 7 gün içinde kültürlerde ölçüldü. Demonte deneyleri, kaplama

sonrası 3 ya da 7 gün sonra ya BKnf-AS transkriptini hedefleyen 50 nM siRNA'lar ya da 20 nM antisens oligonükleotitleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Nöral kök hücreler, toplam 80 µl hacimde immünositokimya haznelerinde (kuyucuk başına 18,000 hücre) de tohumlanır. Daha sonra, aynı protokol kullanılarak, nörosferleri, murin primer hücreler üzerinde Bknf-AS demonte işlevsel etkilerini değerlendirmek için, transfekte edildi. 48-72 saat sonra, hücreler 20 dakika boyunca paraformaldehid (%4) ile sabitlendi ve birkaç kez IX PBS ile yıkandı. FBS ile bloke edildikten sonra, nörosferleri, bir gece boyunca 1: 2000 konsantrasyonda birincil antikor (Monoklonal Tavşan β tubulin III, TUJ1) ile inkübe edildi. Sabitlenen hücreler, ikincil antikor ile inkübe edildi, Alexafluor 568 (keçi anti-tavşan IgG, 2 mg/ ml, 1: 5000 konsantrasyonunda) ile etiketlendi. Çekirdekler Hoechst lekesi ile boyandı. Görüntüler immünofloresan antijen tespit mikroskopisi ile elde edildi.

BKNF-AS'nin AntagoNAT'lerle hedeflenmesi:

AntagoNAT terimi burada, sens- antisens etkileşimlerini inhibe eden tek iplikli oligonükleotit molekülleri tanımlamak için kullanılır (farklı modifikasyonlarla, ek yöntemlere bakınız). Tek iplikli gapmer, oligonükleotitler, 14 nükleotit uzunluğunda, 2'-O-Metil RNA ve/ veya kilitli nükleik asit (LNA) modifikasyonları ile tasarlanmıştır. Bu stratejiyi kullanarak, üst üste binen bölgenin tamamını insan BKNF-AS ve BKNF transkriptleri arasında döşedik ve BKNF mRNA'sını yukarı-regüle edebilen birkaç etkili AntagoNAT belirledik. Üst üste binen bölgenin ilk bölümünü hedefleyen hBKNF-AntagoNAT1 ve hBKNF-AntagoNAT4, en büyük tepkiyi oluşturdu. Veriler, BKNF antisens RNA'sının tek iplikli AntagoNAT'ler tarafından bloke edilmesinin, BKNF mRNA'sında bir artışa neden olmada yeterli olduğunu düşündürmektedir.

Daha sonra tek iplikli gapmer, fare Bknf-AS'ye tamamlayıcı olarak, LNA-modifiye edilmiş, fosforotioat omurga ile uzunluk olarak 15 DNA oligonükleotit (AntagoNAT) 16-nükleotid olarak tasarlanmıştır. İki AntagoNAT (mBknf-AntagoNAT3 ve mBknf-AntagoNAT9), fare N2a hücrelerinde Bknf mRNA seviyelerinde sürekli olarak istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi (Şekil 7).

Şekil 7, insan BKNF-AS transkriptinin hBKNFAntagoNAT ile inhibisyonunu göstermektedir: BKNF-AS transkripti, BKNF mRNA'ya tam tamamlayıcılığı olan 225 nükleotitlik çakışan bir bölge içerir. RNA-RNA etkileşimleri, BKNF'nin antisens transkriptiyle uyumsuz regülasyonundan sorumlu olabilir. BKNF-AS'nin BKNF mRNA'sı üzerindeki düzenleyici rolünü belirlemek için, hem LNA hem de 2'OMe RNA modifikasyonu içeren gapmerler (AntagoNAT'ler), sens ve antisens transkriptleri arasındaki etkileşimi bloke etmek için kullanılmış, çakışan bölge, hBKNF-AntagoNAT'lerin döşemesi ile kaplanmıştır. hBKNF-AntagoNAT'lerin kullanımının BKNF mRNA'sını yukarı regüle ettiği bulunmuştur. BKNF-AS transkriptinin marjinal aşağı regülasyonu gözlemlendi; bu, 2'OMe-RNA'yı bloke eden oligolar için beklenmiyordu. 16 hBKNF-AntagoNAT'ler (her biri aşağıda verilen dizilerle 14-mer) test edildi ve BKNF-AS çakışan bölgenin birinci yarısını bloke etmenin BKNF mRNA'nın yukarı regülasyonu üzerinde daha büyük bir etkiye sahip olduğu bulundu. Spesifik olarak, hBKNF-AntagoNAT1 ve hBKNFAntagoNAT4, BKNF mRNA'nın önemli ölçüde yukarı regülasyonuna neden olmuştur. Sentetik siRNA'ların aksine, antisens oligonükleotitler tek ipliklidir ve uzunlukları daha kısa olabilir; bu nedenle, spesifik olmayan (hedef dışı) bağlanma etkilerini azaltır. Tek iplikli kilitli nükleik asit (LNA) ile modifiye edilmiş oligonükleotitler, modifiye edilmemiş siRNA'lara kıyasla, genellikle in vivo olarak daha etkilidirler. Bknf yukarı regülasyonu nöronal büyümeyi arttırır.

BKNF yukarı regülasyonu nöronal büyümeyi artırır:

Bknf'nin nöronal büyüme ve yetişkin nöroenez 16-17 üzerindeki uyarıcı etkilerini belirten önceki birçok rapor ile tutarlı olarak Bknf-AS transkriptinin demonte edilmesine bağlı olarak endojen Bknf seviyesinde bir artışın, nöronal hücre sayısında artışa ve nörosferlerde kaplamadan 3 ve 7 gün sonra nörit büyümesi ve olgunlaşmasına neden olduğu bulunmuştur (Şekil 5a-d). Bu veriler, antisens RNA'nın inhibisyonuna bağlı olarak endojen Bknf'nin yukarı regülasyonunun, nöronal progenitör hücrelerde nöronal farklılaşmaya neden olduğunu ve ortaya çıkan nöronlarda olgun bir fenotipe neden olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuçlar: Şekil 2, Bknf yukarı regülasyonunun, kaplamadan 3 gün sonra kontrol siRNA (A) ya da Bknf-AS siRNA (B) ile muamele edilmiş olan hipokampal nörosferlerin nöronal dışı büyümesi (A-B), immünohistokimya görüntülerini arttırdığını göstermektedir. (C-D) Nöronal olgunlaşma ve hipokampal nörosferlerde nörit büyümesinin immünohistokimya görüntüleri, kaplamadan 7 gün sonra ya kontrol siRNA (C) ya da Bknf-AS siRNA (D) ile işleminden geçirilmiştir. Hücrelerin Bknf-AS transkriptini hedefleyen siRNA ile muamele edilmesi, nörosferlerin kaplaması sonrası 3 ya da 7 günde nöronal hücre sayısının artışı yanında nörit büyümesi ve olgunlaşmasında artışa neden olmuştur. B-tubulin III kırmızı lekeli, GFAP yeşil lekeli ve DAPI mavi lekeli.

Ozmotik mini pompalar kullanarak mBKNF-AntagoNAT9'nin intraserebroventriküler (ICV) iletimi BKNF-AS'yi demonte eder ve BKNF'yi yukarı regüle eder

Fare çalışmaları: İn vivo deneylerde 10 sekiz haftalık erkek C57BL/ 6 fare kullanıldı. Fareler, 4 hafta boyunca 1.5 mg/ kg/ gün dozdaki Bknf-AS (mBknf-AntagoNAT9) veya kontrol oligonükleotidine (insanda veya farede bulunmayan inert dizi)

karşı yönlendirilmiş sentetik antisens oligonükleotitinin sürekli infüzyonlarını (0.11 mikrolitre/ h) ileten osmotik mini pompalarla deri altından implante edilen dorsal üçüncü ventriküldeki kronik yerleşik kanül ile hazırlandı. Boru, 5 ozmotik mini pompanın çıkış ağzına bağlanmıştır ve muameleler, doğrudan beyne iletilecek şekilde, oturtulan kanüle deri altından tünellenmiştir. İmplantasyondan 5 gün sonra, tüm hayvanlar, arka arkaya beş gün boyunca günlük olarak BrdU (80 mg / kg) intra-peritoneal (İP) enjeksiyonu almıştır. Ameliyat 10 sonrası 28. günde, hayvanlar öldürülmüş ve kantitatif RNA ölçümleri için her fare beyninden üç doku kesilmiştir (hipokampus, frontal korteks ve serebellum).

Bknf-AS'nin demonte edilmesi Bknf'yi in vivo olarak artırır:

mBknf-AntagoNAT9'un C57BL/6 farelerine intraserebroventriküler 15 (ICV) iletimi için osmotik mini pompalar kullanıldı. Daha sonra mBknf-AntagoNAT9 seçildi; bu, Bknf mRNA'nın in vitro olarak artması için yüksek etkinliğine dayalı olarak diğer aktif AntagoNAT'lere göre, Bknf-AS'nin çakışmayan bir bölgesini hedef alıyordu. 28 gün süren sürekli AntagoNAT infüzyonundan sonra, 20 Bknf mRNA seviyeleri, bir inert kontrol oligonükleotiti tarafından değiştirilmeyen seviyelere kıyasla mBknf-AntagoNAT9 ile muamele edilen farelerde üçüncü ventriküle bitişik ön-beyin bölgeleri boyunca artmıştır (Şekil 3a, b). Bknf ve Bknf-AS transkriptleri, üçüncü ventriküle hemen bitişik olmayan bir yapı 25 olan hipotalamusta değişmemiştir (Şekil 3c). Dahası, Bknf-AS'nin AntagoNAT aracılı blokajının Bknf protein düzeylerini artırdığı bulunmuştur (Şekil 3d, e). Bu bulgular, yukarıda açıklanan in vitro verilere karşılık gelir ve Bknf-AS'nin bloke edilmesinin, Bknf mRNA ve protein ekspresyonunun in vivo artışına yol açtığını 30 gösterir.

Fare beyin örneklerinin RNA ekstraksiyonu ve RT-PCR: Fareler 28 gün sonra ötenazi edildi ve beyinleri eksize edildi. Histolojik çalışmalar için her fareden bir yarı beyin %4 formaldehit içinde

gece boyunca tutuldu. Hipokampus, frontal korteks ve serebellumdan alınan RNA kantitatif ölçümü için başka bir yarı beyin eksize edildi. Trizol reaktifinde (Invitrogen, 15596-026) üreticinin protokolüne göre homojenizasyondan sonra RNA ekstrakte edildi. Sulu faz ayrıldı ve numuneleri Qiagen RNeasy kolonları (QIAGEN, 74106) içinden geçirilmeden önce eşit hacimde %70 etanol ilave edildi ve bu RNA numuneleri DNA kontaminasyonunun giderilmesi için kolon altı DNase muamelesine tabi tutuldu. Her bir numunenin 400 ng'si birinci iplik cDNA sentezi için kullanılmış ve RT-PCR ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Yüzdelik değişiklikler, her bir grafikte kontrol farelerine kıyasla, ayrı ayrı dokular için RNA seviyelerinde çizilmiştir.

Sonuçlar: Şekil 3, Bknf-AS'nin in vivo Bknf mRNA ve proteinini regüle ettiğini göstermektedir; (A-C) Ozmotik mini pompalar kullanılarak mBknf-AntagoNAT9 (CAACATATCAGGAGCC) veya kontrol oligonükleotiti (CCACGCGCAGTACATG), 28 günlük bir periyot boyunca, fare beyninin üçüncü ventrikülü içine sürekli olarak infüze edildi (mualeme grubu başına n = 5, * = P < 0.05, ** = P < 0.01, *** = P < 0.001). Bknf-AS'ye karşı yönlendirilen mBknf-AntagoNAT9, ancak kontrol oligonükleotiti, hipokampus (A) ve frontal kortekste (B) Bknf seviyelerinde bir artışa neden olmuştur. Hipotalamusta (C) her iki transkript de, beynin üçüncü ventrikülüne doğrudan bağlı olmayan bir doku için beklendiği gibi değişmemiştir. (D-E) BKNF protein seviyeleri, ELISA ile değerlendirildi ve mBknf-AntagoNAT9 muamelesinin, kontrol oligonükleotitle muamele edilen farelere kıyasla hem hipokampus (D) hem de frontal kortekste (E) BKNF proteininde bir artışa neden olduğunu buldu.

Ozmotik mini pompalar kullanarak mBKNF-AntagoNAT9'nin intraserebroventriküler (ICV) iletimi BKNF-AS'yi demonte eder ve BKNF'yi yukarı regüle eder

BrdU, 5 gün boyunca çalışmanın ilk haftasında mBknf-AntagoNAT9 ile muamele gören farelere enjekte edildi. 28 gün süren sürekli AntagoNAT infüzyonu sonrasında beyin dokularının histolojik incelemesi yapıldı ve sırasıyla Ki67 ve BrdU markörleri kullanılarak nöronal proliferasyon miktarı ve sağkalımı ölçüldü. mBknf-AntagoNAT9 ile muamele edilen farelerde, kontrolle muamele edilen farelere kıyasla Ki67 pozitif (çoğalan) hücrelerde bir artış gözlenmiştir (Şekil 4a, b). Ki67 pozitif hücrelerin sayısı ölçülmüş ve kontrol oligonükleotiti ile karşılaştırıldığında mBknf-AntagoNAT9 ile muamele edilen farelerde hücre proliferasyonunda önemli bir artış bulunmuştur. (Şekil 4c). MBknf-AntagoNAT9 ile muamele edilen farelerde, kontrol oligonükleotit ile muamele edilen farelere kıyasla (Şekil 4d) BrdU birleşiminde (hayatta kalan hücreler) önemli bir artış olmuştur. Kontrol ve mBknf-AntagoNAT9 ile muamele edilen fareler arasında hipokampal hacimde fark yoktu (Şekil 4e). Bu bulgular, Bknf-AS'nin in vivo Bknf seviyelerini düzenlediğini göstermektedir.

Sonuçlar: Şekil 4, Bknf-AS'nin in vivo bloke edilmesinin nöronal sağkalım ve proliferasyonda bir artışa neden olduğunu göstermektedir; (A-B) fareleri mBknf-AntagoNAT9 veya kontrol oligoları ile muamele edilmiştir. 28 günlük sürekli mBknf-AntagoNAT9 infüzyonundan sonra, Ki67 kullanılarak beyin dokularının histolojik incelemesi yapılmıştır. Ki67, hipokampusta proliferen olan hücrelerin markörüdür ve Bknf-AntagoNAT alan farelere kıyasla kontrol oligoları alan farelerde çoğalan hücrelerin sayısında bir artış gözlenmiştir. mBknf-AntagoNAT9 (B) ile muamele edilen farelerde, kontrolle muamele edilen farelere (A) kıyasla Ki67 pozitif hücrelerde (çoğalan hücreler) bir artış olmuştur. (C) mBknf-AntagoNAT9 ile muamele edilen fareler, kontrolle muamele edilen farelere kıyasla Ki67 pozitif hücrelerin sayısında önemli bir artışa sahipti. (D) mBknf-AntagoNAT9 ile muamele edilen farelerde, kontrol oligonükleotit ile muamele edilen farelere kıyasla hayatta kalan

hücrelerin sayısında (BrdU pozitif) önemli bir artış olmuştur. (E) Kontrol ve mBdkf-AntagoNAT9 ile muamele edilen fareler arasında hipokampal hacimde hiçbir farklılık yoktu. Bu veriler (mualeme grubu başına n = 5 *= P <0.05, ***=P <0.001), birlikte, 5 Bknf-AS'nin in vivo Bknf seviyelerini düzenlediğini ve Bknf sens-antisens etkileşimlerinin bloke edilmesinin nöronal soy, proliferasyon ve sağkalımda bir artışa neden olduğunu göstermektedir.

10 Ek olarak, buluşun belirli bir özelliği, çeşitli uygulamalardan sadece biri ile ilgili olarak açıklanmış olabilirken bu özellik, herhangi bir veya belirli bir uygulama için arzu edilen ve avantajlı olabilecek diğer uygulamaların bir veya daha fazla başka özellikleri ile birleştirilebilir.

15

Açıklamanın Özeti, okuyucunun teknik açıklamanın niteliğini hızlı bir şekilde tespit etmesini sağlayacaktır. Aşağıdaki istemlerin kapsamını veya anlamını yorumlamak veya sınırlandırmak için kullanılmayacağı anlaşıyla sunulmuştur.

20

DİZİ LİSTESİ

<110> CURNA, INC.

<110> THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE

25 <120> BEYİN KAYNAKLI NÖROTROFİK FAKTÖR (BKNF) İLE İLİŞKİLİ HASTALIKLARIN

DOĞAL ANTİSENS TRANSKRİPTİNİN BKNF'E İNHİBİSYONU İLE TEDAVİSİ

<130> US61/614,664

<150> US61/614,664

<151> 2012-03-23

<160> 66

5 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4755

<212> DNA

<213> İnsan

<410> 1
cacacacaca cacacacaca cagaacaacat ctctaactaaa aaqaaaagtt gagctttctt 60
agctagatgt gtgtatttagt cagaaaaaac caaggagttga agcgttttag agaactgcag 120
gagataaagt ggaactctga tatggagagc atttgaatc gacttaaatg ttttttaat 180
gctgaacttt tactttctt cctcaccac cccatctctt tcttgacctt agcccccagc 240
atagacacat cctcacaatg accatctcc accatctctt cctttccag atagacacac 300
cctttccagt tctgcacac cctgctatc atcagacac cctgaacttg cagccctcag 360
tctctctctt tctctctctt atgactatg gctgctctt tctgctctt gctctctt 420
cctgctctt cctgctctt atgctctt tctgctctt tctgctctt tctgctctt 480
tctgctctt cctgctctt atgctctt cctgctctt tctgctctt tctgctctt 540
tctgctctt atgctctt atgctctt cctgctctt tctgctctt tctgctctt 600
cctgctctt tctgctctt atgctctt cctgctctt tctgctctt tctgctctt 660
cctgctctt atgctctt cctgctctt tctgctctt tctgctctt tctgctctt 720
cctgctctt atgctctt cctgctctt tctgctctt tctgctctt tctgctctt 780
cctgctctt atgctctt cctgctctt tctgctctt tctgctctt tctgctctt 840
cctgctctt atgctctt cctgctctt tctgctctt tctgctctt tctgctctt 900
cctgctctt atgctctt cctgctctt tctgctctt tctgctctt tctgctctt 960
cctgctctt atgctctt cctgctctt tctgctctt tctgctctt tctgctctt 1020
cctgctctt atgctctt cctgctctt tctgctctt tctgctctt tctgctctt 1080
cctgctctt atgctctt cctgctctt tctgctctt tctgctctt tctgctctt 1140
cctgctctt atgctctt cctgctctt tctgctctt tctgctctt tctgctctt 1200

tccatggac ttggagagc gtgaatggc ccaagccagc tccagaggc ttgacaacat 1260
 tggctgacac ttccgaacac gtgacagaag agctg.tgga tggaggaccag aaacttccgc 1320
 ccaatgaaga aaacaa.aag gacgcagact tglacacgc cagggtgatg ctacagtagtc 1380
 aactgccttc ggagcctcct cttctcttcc tgcctggagga atacaaaaat tacctagatg 1440
 ccgcaaacat gtccatgagg gtcccgctgc actccgacc cgcgcgcga ggggagctga 1500
 ggcctgctga cagtattagt cagtccgtaa cgcgcgcga caaaaagact gcactggaca 1560
 ttgcctggct gacgctcaca gtccctgaac agctccctgt atcgaacgc caactgacgc 1620
 aactctctc cagatccac cactctcc cgcctccac aactgacgc tgcgcgcga 1680
 tagtcaatg cactatgct cccctctgc tccctccac ggcctacgt cgcgcgcga 1740
 ctatggatag caacagaga atggcgctgc gathatag gatagact ttatggatag 1800
 gacacgga cactcaagc ggaagtagt ggcctatgt tgcctagat gattatatt 1860
 ggcacaaa ttatctat gctatctac ctcaagcga caattctca gctacgaaa 1920
 aaataatt atgacatga tglacaaag aagttatc agacatgtg ttccacatc 1980
 taattatg aaagtcac gacagagc gaacatgta ttgggcaca ac.taaaaag 2040
 ttgcaatc atccctgat atg.tg.gg .t.tg.tg.tg ttgcacagaa ctgaaaaat 2100
 aaaaagtaa aaaaaaat aaattgctg ctgtttta ttggaattga taataaactg 2160
 tctctctc gaaaacaga aaaaacacac acacacaca caaaaattt aacaaaaaca 2220
 ttccgttac atctagaca gtaactatc tgcctcttg tactactata tctctttac 2280
 tgcctctac ttccatcct gttggatcc acatctgc aactgctgt tgcctctct 2340
 ttactgctt caggaatgga gacgaagga tatctttc ttgctttgt atctttctt 2400
 cgtttgtt ttctctctt cctctctcc aggaatgac gacgggcaa caattctcc 2460
 atctctct ctggcgata aagataat ttgctgtgt tgaagatgt tgcctatgt 2520
 atctgtga tagaagtg ataaaaat aggtacatga caaaaaat gctctctct 2580
 caatctgt gacacatc cagggatgc ctctctctt ggggttgtt cagagtaagc 2640
 ttcttctg ggaaggact atg.ttgctc agacacac cttctctct ctctctctct 2700
 ggcctctc ttg.tt.ttt taaggagga aaaa.cagc ggcgcctct aaa.t.t.t.t 2760
 ccaatgctg gaacag.tg acacattg ccacacac acactctc agcatggag 2820
 aacagctatt ttttttaga acagaaaaa caaaaaata acccaaat gaacattatt 2880
 tttatcag agtcaacatt tgggtaaac aggcctaag ttaaaaaaa ctcatgtga 2940
 ggttaacaa tgcctttaa caaaaagta gacccctga tcaacccaga aacactaga 3000
 tccgaacgt cctccactt gcaactgac tgcactgac ccccaactg gacactatgt 3060

aggaatagaa ttgattatga ggaatagaa tgaattatga ggaatagaa ttgattatga	3120
ggaatagaa atggaataga ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa	3180
ttggaataga ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa	3240
ttggaataga ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa	3300
ttggaataga ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa	3360
ttggaataga ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa	3420
ttggaataga ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa	3480
ttggaataga ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa	3540
ttggaataga ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa	3600
ttggaataga ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa	3660
ttggaataga ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa	3720
ttggaataga ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa	3780
ttggaataga ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa	3840
ttggaataga ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa	3900
ttggaataga ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa	3960
ttggaataga ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa	4020
ttggaataga ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa	4080
ttggaataga ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa	4140
ttggaataga ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa	4200
ttggaataga ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa	4260
ttggaataga ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa	4320
ttggaataga ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa	4380
ttggaataga ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa	4440
ttggaataga ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa	4500
ttggaataga ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa	4560
ttggaataga ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa	4620
ttggaataga ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa	4680
ttggaataga ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa	4740
ttggaataga ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa ggaatagaa	4755

<210> 2

<211> 4302

<212> DNA

<213> Ev faresi

60
120
180
240
300
360
420
480
540
600
660
720
780
840
900
960
+20
380
140
200
260
320
380
440
500
560
620
680
740
800
860

tagtactctg ttttactgct ttcgacttct gatagcgttg gaattaaaac aatgtcaagg	1920
tgctgttgtc attgctttac tggcgttaagg gacggggaat gggaggggta gatttctgtt	1980
tgttttgtgt tttattttgt ttgtttgttt gttttgtttt ttagttccac ccggagtagg	2040
gatggagaaa atttcttcac tatccattct gggtgataaa gcgttacatt tgtatgttgt	2100
aaagatgttt gcaaaatcca atcagatgac tggaaaacaa ataaaaatta aggcaactga	2160
ataaaatgct cacactccac tgcccattgat gtatctccct gggtcccccctc agctcactct	2220
tctggcatgg gtcagggaaa attgctttta ttggaagac cagcatttgt tcaaagcata	2280
ctctttccct cccctccccc attttggctc cttctttttg ttttgtttta agaaagaaaa	2340
ttaagtgtcg cgttttaaaa tattttacta ctgctacaaa cagatgaaca atgtgtgtca	2400
ttttatgaca ctcatggaaa acagtgtttt ttttttacc taaagaaaaa caaataaaaa	2460
taaccacaaa tatttctttt ttaaaaggca taaatattgg gtaaatgtta atatggccta	2520
acagtgtttg cagataaaaq ttattgtata caccacagata cttagataag agcagggatc	2580
cacactgcca ttgaatatgg actgaatggc cctgcggagg ctaagtggag ctgacatact	2640
atttctctggc agtgcaggag gaatttctga gtggccatcc taaggctctag gatggaggtg	2700
gggaatggta cttgagacat tcctaaggga aggcctggaa gcacccttca ggcagggctc	2760
tggaaatgat tgtcaagttg cttaggcctt ctgctttaag tgccctacatt acctaacagt	2820
gctcaagagg ttctcgattg gagaaccaca ctcaaatcca tttatagcct ccacccatt	2880
tctaataaat tgtgtataaa gttggattaa cctggagcaa ctttggatcc aaatatggca	2940
cagcaataat gatattaatg cagcatgatg ggaaatgttt gctgtgaaga gaattgattt	3000
gctttgagct tagacttcag gaagcctagg ttttttattt ttttattttt gagacatttt	3060
ggtaaaagga aaaaaagaaa acaaacaaac aaacaaacaa aaccagaaaa agcatcaaaa	3120
ctcaggcaga atgagcaatg tctgaaaggg ctagaaaaac aagacatagc aaggtgcttt	3180
cactgtgaaa gagacaagaa cacaggagga aatattgctt cagtgaagag cacagacggc	3240
tcctgccaat ttattacaag agtcccgctt gtactttacc ctttgggggtt agaagtcaag	3300
ttggaagcct gaatgaatgg acccaatgag aactagtgtt aagcccatth ccctagtcag	3360
gtttttttca agcgtgaatg tgttagtggt tactctcctg ggttcctgag catcagaaaa	3420
aaaaaaaaaa agaggcaaac aatcgcttca tcttaggagt ggaaaggaaa cagaagtgga	3480
cgtcgcgtgt gactcagga gtgaagatac catcagcaaa tagtttcttt tttgttcatt	3540
cgttcccttc gagttagcct gtcttttgga ataccactga atatgctgtt tttgaaagac	3600
ttcatgtagc atagattgtt ttgtgccgtt taccaaatla acctttgtca tcgtttttta	3660
acctattcag gaatgcttgg aatatctgct ctatgttaac tttttgcagc ttcattctga	3720

aagacattat ttaacacagt acaagacatc cctccacaat cctccactac tgcacagcac 3780
 aggtcattta ctacacatca cagtcacatc cagcaattgt gacgtcacatg cctcagcctc 3840
 ttaacacata cagacacaca cagacacata cagtcacatc acattgcactc cagctttctt 3900
 tcttcaatct tctctctctt ctctctctctt cctctctctt cctctctctt tctctctctt 3960
 tctctctctt cctctctctt cctctctctt cctctctctt cctctctctt cctctctctt 4020
 cctctctctt cctctctctt cctctctctt cctctctctt cctctctctt cctctctctt 4080
 gt cta cta tgg caagat ataa ttaac aagtaacaa agaaaaaa ta atagat 4140
 ta agtat ataa acaat atgt atgt aaaaatgggt at aaaaat caaatatca 4200
 gaagt atc gtaaatatg gtat ataa agtaacaa ttaaatata ataatagat 4260
 taatataga atcttaatg ttttaaaa tttttaaa gt 4300

<210> 3

<211> 1279

<212> DNA

<213> Insan

<400> 1
 atcgcagagat cagcaagctg cccgagctgg cgcgcgcggc caccagccac ttcctctcc 60
 tgcctctgta tgaagaagga tctgtttgct tccctctgct ccatgattgt aaatttccctg 120
 aggcctcctc cgcctgcac cctcagctac accaacttat cctcagctca ctccagctac 180
 cctcagctac cagcctacac cagcctacac cagcctacac cagcctacac cagcctacac 240
 tgcctcctc ccaactcctt cctcagctac cctcagctac cagcctacac cagcctacac 300
 cctcagctac cagcctacac cctcagctac cctcagctac cctcagctac cctcagctac 360
 tgcctcctc cctcagctac cctcagctac cctcagctac cctcagctac cctcagctac 420
 cctcagctac cctcagctac cctcagctac cctcagctac cctcagctac cctcagctac 480
 tgcctcctc cctcagctac cctcagctac cctcagctac cctcagctac cctcagctac 540
 tgcctcctc cctcagctac cctcagctac cctcagctac cctcagctac cctcagctac 600
 tgcctcctc cctcagctac cctcagctac cctcagctac cctcagctac cctcagctac 660
 atgaagggaa ttaactcaca cagataaat gaactcattg aggtgagcac tgcattctag 720
 gcaaatgatg acctctctg ttcctctgct tgcagctaa aagttacaca cctgaaaag 780
 atactgaac agatttcta aatgcttcat ttttggag caccatgtt gactacat 840
 atactgaac tgccttcta atactcctt aactacacg aaactcctc atactcctc 900
 agctcctac cagctacac cagctcctac cctcagctac aaactcctc atactcctc 960
 taaatcctc cagctcctc agctcctc atactcctc cagctcctc atactcctc 1020
 agctcctc tgcctcctc atactcctc cagctcctc tgcctcctc atactcctc 1080

tgtataaact taaaatagtt ccacatacat aatgctttta gtgtcataat acttactact	1140
ggctctatatt taccaacatt tatcacattt tacaaaatga agtagaagaa aaaaaagaca	1200
acgactttat ggccctggaa ttccagtaat ggtgaccaac atgtttttaa ttccagtaaa	1260
ggttatgggtt acatttcaa	1279

<210> 4

<211> 1478

<212> DNA

<213> Insan

<410> 4

aacggagaga- cagggaaggcg gcggagtgcg ccggcggggc caccaggcac ttcccccacc	60
tgcccctgta tgaagaagga cgtgcttgct ccccccggcg ccctgactg- aaatttcctg	120
aggccctcctc agccctgcag aactcggggt ataggccatgt gactgacctc cgtccaaagaa	180
tatgttaaga aaaagtgtg agtcggcttt tagggctaga gcaatgtatc ttaggtccac	240
ttaagggaagc tgttagagatg agtccaaagca gggaaacagc aagagccccc caggtccacc	300
agttatctatc tatgtccctc ccaacatgtc attccactgc ccttccctac caccgcacga	360
atccatctcaa ctaggaagga ataggaaggc ccccaacagc attgacctac caggtccccc	420
ctggaactatc ccaactctac gtccctatcc ttttctctac tgggaacacac ttctctatcc	480
tccttcacac cgccttcac cagcgtgctg cagcgtgctg cagcgtgctg cagcgtgctg	540
gacacgacac tgggacacac cagcgtgctg cagcgtgctg cagcgtgctg cagcgtgctg	600
accttcacac cagcgtgctg cagcgtgctg cagcgtgctg cagcgtgctg cagcgtgctg	660
ctggaagtg- caacgtgggt ccaacgtgg- cgtgcaacaa gactggcg- aagcccaagg	720
ccctggcgag gtagcgctc cccgggaact aatcgctac cgcacccagc tcctggcaact	780
gtagcgctc cccactgcaa actacggagc ggtlaaaga cgcctccac cccatttctc	840
atctaacctc acacacctc tttgatgagc ctatggagaa acaggtcttc ctatcaccta	900
aaggtgggag tacaaacaat ccaagccctg tccaggacaa ttaggcaata cctatcaaaa	960
ctatcacatg ttttccctg tgaacagaca attccacttc tgggaataat tgacagatat	1020
agtgacctac atacacactg atgtacatgt cctgtctatc tactatctac tgaacacac	1080
agtgacctac atgtacatgt atgtacatgt cctgtctatc tactatctac tgaacacac	1140
agtgacctac atgtacatgt atgtacatgt cctgtctatc tactatctac tgaacacac	1200
tccttcacac cgccttcac cagcgtgctg cagcgtgctg cagcgtgctg cagcgtgctg	1260
tccttcacac cgccttcac cagcgtgctg cagcgtgctg cagcgtgctg cagcgtgctg	1320
tccttcacac cgccttcac cagcgtgctg cagcgtgctg cagcgtgctg cagcgtgctg	1380
tccttcacac cgccttcac cagcgtgctg cagcgtgctg cagcgtgctg cagcgtgctg	1440

aaataattaa attaaaaata accaatttat taacaaaa

1478

<210> 5

<211> 1437

<212> DNA

<213> Insan

<410> 5

atggagagaa cagggaaggag ggggaggggg aggaaggagaa tttttttttt	60
tgggtttgga tgaagaaggga agtgggttggc aaaaatggag ttatggatga aaattttatg	120
aggccttcctc agccttgccag aactggctag agcaatgtat cttaggcctca cttaagggaag	180
ctgtagagat gagcccaagg agggaaacca gaagaacccc ccagggtcac cagttggttg	240
ttggctccctt acaaacatgt ccttcaagtg gctaatctta caacagcaca aattcaatca	300
accccaaaagc gaagcagcagc ctcccaagcc atttgcctac tgcctatcac cctcagcctg	360
taccagctctg cctccttatt atttctctcc cagggaagac ccttctcttc cctcctccac	420
agctctctca tcaactgtc caaactgtcc gccaatgacc tccagcctct tgacctcccc	480
tggggttcctt tggggttcctt cggggttcctt tggggttcctt caactgggga tttttttttt	540
tggggttcctt gggggttcctt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	600
ggggttcctt tttttttttt gttttttttt agtgggttcctt gggggttcctt gggggttcctt	660
ggggttcctt caactgggga tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	720
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	780
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	840
gtataaatga atcatttgag gtgaagacag cactttagga aaatgaagac ttctttggtt	900
ccattggttt gaaagtaaaa gttacacaca ttgaaaagac attgaaaagc attttccaaa	960
tgtttcattt ttgggaagca ccaatgttga cctacatcac agtttaaatg gttttaaaat	1020
atccttttaa zataaagcaa acttccagct acttaactcc ccttgccttg gttttgaaag	1080
gttttgaaag tttttgaaag atttctgttc tttttgttta aaaaatctga tttttgaaag	1140
tgtttgaaag tttttgaaag tttaaacact gttttgaaag cttttttctc tttttgaaag	1200
tttttgttg tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	1260
tttttttttt tttttttttt gttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	1320
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	1380
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	1437

<210> 6

<211> 2322

<212> DNA

<213> ĩnsan

<410> 6
aagggagag- cagggaagtg gctgagtg-g cggccggggc cagcaggcac ttcccccac 60
tgcctt-gta tgaagaagga tgtgtttgtt ccccttggt ccatgattg- aaatttcctg 120
agggcccttc agccctgcag aatgggggtt aaggccatg- gactgactt- cgtccaaaga 180
tatgtaaaga aaaagtgttg agtcggcttt tagggctaga gcaatgtatc ttaggtcac 240
ttaaggaaac tgtagagatg agcccaagca gggaaacacg aacagccccc caggtccacc 300
agtgtgttgt tggctcccta caaacatgtc attcaagtgc caatcttac aacagacaaa 360
attcatctaa ctatgaagga ctatgaagga ccccaacgac ctatgaatct caggtccccc 420
ctgacatgtc ccaatcttat gtctcttatc tcttcttat taggcctaac tttcttggtc 480
tcatccatca cctcttctct ctctgtcttc aacgtctcat ccatgtcttg caaccccttt 540
gtacatggct- tggggctatc- caggtctctc- aggtctctat- gggtctgct- atcaggagat- 600
atctctctat- agcagagag- caggtctctc- tctctgtg- atctctgtct- caggtctctg- 660
atctctctat- caggtctctc- cctctctct- cctctctct- aggtctctct- gttctctct- 720
tcatgaaag- tcaattgtt- gagaagtcag aacatttc- cgtgagaaga tccatctggg 780
cattgaaaca gaaccacatg ctccccagac cagcaacgac gactacaaa taccctctg 840
tcaactctac ttgagtaaga aagctttcaa caaggctc- agtgctcaaa tgccttcaa 900
aaaaatcgtg gtgacacaaa atctctctct tagcaacca acagaatccc ttcaagcct 960
ctggtctctg- caccctatgc- caggtgactt- ggcacccac- cacttgcct- gttcttcggg 1020
aagtggtcta aggggttaag atgtgacttg aaaaagaaag- tagaacaaga tcatctcaaa 1080
tctctctca- cgtctctctt- cagcaacgac- attctctcc- cctctgacgc- cagcaacgctg 1140
ctccctctct- cctctctct- cctctctct- cctctctct- cctctctct- cctctctct- 1200
aaccaagccc- cctctctct- ctctctct- gctctctct- aacccacct- cctctctct- 1260
ggctctctg- ctgactctc- aggtctctc- gactctctc- ctctctct- ctctctct- 1320
atctctct- aggtctct- cctctctct- ctctctct- ctctctct- ctctctct- 1380
gctctctct- ctctctct- ctctctct- ctctctct- ctctctct- ctctctct- 1440
gctctctct- ctctctct- ctctctct- ctctctct- ctctctct- ctctctct- 1500
aatctctct- ctctctct- ctctctct- ctctctct- ctctctct- ctctctct- 1560
atctctct- ctctctct- ctctctct- ctctctct- ctctctct- ctctctct- 1620
aatctctct- ctctctct- ctctctct- ctctctct- ctctctct- ctctctct- 1680
tctctctct- ctctctct- ctctctct- ctctctct- ctctctct- ctctctct- 1740
aatctctct- ctctctct- ctctctct- ctctctct- ctctctct- ctctctct- 1800
aatctctct- ctctctct- ctctctct- ctctctct- ctctctct- ctctctct- 1860

atataggtgc atatgtacaa aatgatggaa agctctctgg tatatattag taagtataa	1920
aacaaggtgt aaaatagtgt atatatggct actacctttt gttttaaaaa tgggggaaaa	1980
tgggtggagct tgcgggtgagc cgagatcgctg ccactgcact ccagcctggg cgacagagcg	2040
agactccgtc tcaaaaaaaaa aacaggggtgg ggtggggggg aaataatagt acatactcat	2100
atttacctgt atctatataa aacacactat caaggattca caagaaacta atacaaatga	2160
tcacottata gatgggtatgt attgggggat actgaggtga gcaggggtata agtggggcaa	2220
gacttttcag tgtaaaacttc ttttaaatTT ttttttgatt tttgaataat gtaaattaac	2280
tgtcaaataa ttaaattaaa aataaccaat ttattaacaa aa	2322

<210> 7

<211> 2036

<212> DNA

<213> Insan

<400> 7	
atcgcgagat caggaaggtg gccgagtgtg tcgcgcgggc catcaggcac ttctccttc	60
tgcctcttqta tgaagaagga tgtgtttgtc tccctctgtg ccatgattgt aaatttcctg	120
aggcctcttc agccctgcag aactggctag agcaatgtat cttaggtca cttaaaggaag	180
ctgtagagat gagcccaagg agggaaacca gaagagcccc ccaggctcac cagttgtttg	240
ttggctccct acaaacatgt cattcaagtg gctaatttta caacagcaca aattcatcta	300
accagaaaga gaagaggagg ctccaaaggc acttgactac tgagcatcac cctggacgtg	360
tacaagtctg cgtccttatt gttttcttca ttgggcccga cttctctggtc ctcatccaac	420
agctcttcta tcacgtgttc gaaagtgtca gccaatgatg tcaagcctct tgaacctgcc	480
ttgggcccac tcacgtcttc cagagtccca tgggtccgca cacctggaga tactctatta	540
tagcaaagaa gaaagataat ttcattgagc catcctgttt tacagcacc cacaagaatcc	600
cttcaaagcc tcgtggtctg acacctatg ctacgtgact tgtgacctat ccatttgtea	660
tgttcttcgg gaatgtggct aaggggctaa gatgtgactt gaaaagaaag gtagaacaag	720
atcatctcaa atttattatc aaggaatagt tcagaaaacg acttcagacc acagagacag	780
cagaacagat ggtccggcat ggatagagca tcagacactc acagactgtg ccaacaagag	840
ccatcgagtc aaaacagcca aaggaaggag ggtcatggaa tgggttctct cacaccaaac	900
tgatgccacg aggccttcag catgaataac aaaggcaacc agaccacaa gccatactga	960
gtggatacaa aacctatacc taggttgaca tcccaaagt gtgtggcaag ttagatgatg	1020
atggcacaaa agacagaaca ccttgcttct ggccattgtc agctcttgga agagagcaca	1080
cttttagagg agcagctgca aggagcctga gaacaaaact ggaaatgtct gttatgaaag	1140
ccttcacagg aaattctgca agtggcaacg tgggtccatt ccgtgtgtgt cactagagct	1200

aaagcaagac	actagccata	gtaaagcaag	gtttccactg	aaactaatct	gtacactgac	1260
ccagctcttg	ccactatgac	gtattcccaa	tgcacactac	agatcagaga	gcatcacagc	1320
cttccatctt	caaacacagc	agattcttcc	ctcctgctga	gtcaccaatg	acaaacaaac	1380
ccaaaggagc	ccattctctt	ctttggccat	taattgagatg	aaaggcaatt	actcacatag	1440
tataaatgac	ccatttgagc	tgatgactgc	cttttgggac	aatgactgact	ctcttggctc	1500
ctttggtctg	caagtaaaag	taacacacac	tgaatagcac	ctgaatagac	cttctctaat	1560
gcttcatctt	ctggatgcac	caatgctgac	ctactacaa	tgttaaaagg	cttcaaaaac	1620
tcaccttaca	ataaaggaaa	cttccagcta	ctaactcagc	cttgaatggg	ctatgaaagg	1680
cttccaaagt	atgtgaaaaa	ctactgtta	cttgccttaa	aaaatgtgat	gtctaaagat	1740
gttcgaatg	ctctaatgct	tcaaaacatg	tacgtaagcc	ttgtttatct	ggaaatcatt	1800
ctctctctgt	ctatccattt	ataaatagaa	aatgttctgt	aataacttaa	aatagttcca	1860
catacataat	gcttttagtg	tcataataac	tactactggt	ctatattcac	caacatttat	1920
caatcttccc	acaaacaaat	agcagacaaa	aaagacacac	actctatgac	actggaatcc	1980
caatcatgct	gcacacacac	ctttcaactc	caataaaagt	tatgattaca	cttccac	2036

<210> 8

<211> 2364

<212> DNA

<213> Insan

<400> 3

gcaatgctg	ctaggaaacg	cgaaagaaag	aaagagagac	taaggaaagtg	gacgagagtg	60
tcgctggggc	catacaggac	cttctcctcc	tcctcttgta	tpaagaagga	tgtcttttgt	120
tcctcttgta	caatgatgt	aaattctctg	agcctctctc	agcctctcag	aaatggggct	180
atagctcatg	gacgatctt	cgtccaaaga	tatgtaaaga	aaaagcttg	agtgggctt	240
taagacacga	gaatgctc	ctagctccc	ctaaagcaga	tgtgacatg	agcccaacga	300
agcgaacacg	agacacccc	caagctcacc	acttgatttg	tgcctccta	caacacatc	360
actcaantag	ctaattctac	ccacacacac	attcactcac	ccgaacacg	agcagagacc	420
taacaaagga	ctatgctact	gtaatctctc	ctggaacttg	caatgctctg	gtacttactg	480
ctctctctct	ctgggagaga	cttctgctct	ctctctctct	gctctctctc	ctggtgctct	540
caatgctctg	caatgctctg	ctggtctctc	gtaatctctc	ctgggagaga	ctggtgctct	600
agagtcacat	gggctggcac	caatggagat	actcacttat	agcgaagag	aaatgaaatt	660
ctatggagac	ctctgctctc	ctggtctctc	ctctctctct	ctggtctctc	ctctctctct	720
caatctctct	agggctctc	ctggtctctc	ctggtctctc	ctggtctctc	ctggtctctc	780
aaatctctct	ctggtctctc	ctggtctctc	ctggtctctc	ctggtctctc	ctggtctctc	840

taagaaacaga gaactaacaa tttccctctca tccacccctac tcttgcctaga taactttctca	900
ttaaggtccta agtgtcaaca tcccttfaan aacaaatcgtc gttccaccaa tctcttcttt	960
ttaataaccta atagatccct ttcaagcct cttgtgtctgc caccctctgc taactgaact	1020
gtgacatct cactgtctct gthctctggg atgtgtgtga aggggtctag ctgtgtctgt	1080
aaagaaagg tagaataaga tctctctaaa tctctctctc aggtctaght ctgtctctgt	1140
ttccagacaa ctgagatagt agatctgttg gtcctgggtg gatctgctgt ctgtctctct	1200
tagatctgt caacacagagt cctctgagca aaataagctaa aggtctgtgt gtcctgtgt	1260
gggttctctc aaacaaact gctctctaga ggcctctaga atctctctaa aggtctctaa	1320
gaacacacag ctatctgtgt cgtctctaaa acctctctct aggtctctaa ctctctctgt	1380
ctgtctctgt tagatctga tggcctctaaa gacagacac cttgtctctgt gctctctct	1440
gtctctctga gtagctctac tttctctgtg gctctctga ggtctctgt aacaaactgt	1500
gaaatctct tttctctgt cttctctgtg aattctctga ggtctctgt ggtctctct	1560
ctctctctct tttctctgt gctctctctc atctctctgt tctctctctgt tttctctctgt	1620
aaactctct tttctctgt cctctctctc aactctctgt tttctctctgt gctctctctgt	1680
ctctctctgt tttctctgt cctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctct	1740
gtgtctctgt agatctgtgt tttctctctc tttctctgt ggtctctctc ctctctctgt	1800
ctgtctctgt ctctctgtgt tttctctctc tttctctgt tttctctgt tttctctgt	1860
agctctctgt ctctctgtgt tttctctctc tttctctgt tttctctgt tttctctgt	1920
agctctctgt ctctctgtgt tttctctctc tttctctgt tttctctgt tttctctgt	1980
agctctctgt ctctctgtgt tttctctctc tttctctgt tttctctgt tttctctgt	2040
agctctctgt ctctctgtgt tttctctctc tttctctgt tttctctgt tttctctgt	2100
agctctctgt ctctctgtgt tttctctctc tttctctgt tttctctgt tttctctgt	2160
agctctctgt ctctctgtgt tttctctctc tttctctgt tttctctgt tttctctgt	2220
agctctctgt ctctctgtgt tttctctctc tttctctgt tttctctgt tttctctgt	2280
agctctctgt ctctctgtgt tttctctctc tttctctgt tttctctgt tttctctgt	2340
agctctctgt ctctctgtgt tttctctctc tttctctgt tttctctgt tttctctgt	2364

<210> 9

<211> 3136

<212> DNA

<213> Insan

<400> 9

ctgcataaag atttcttctac agggctcttt aaaactgtct atttctaaga ggtctctctc 60

actacaggta aaaggaaatt cctctctctc tagggctctc caggatctct tctctctctc 120

caacttctct	caactgctct	caacttaaga	actcaactgc	cccgccctac	caactagcta	180
taagaaccca	caaacctctc	ccctgttctc	ctctatccgc	ggaacttacc	caaacctcca	240
caactctctc	caacttctct	ctctctctcc	aacgtctcgc	ctcagctctc	caactccttt	300
ttgggtgggt	gactthgtca	gttngcaacc	ctctgtgtg	ttaacttgc	tttgggtgt	360
tttctgtgtt	gactthgtgg	gtgtgtgtgc	gtgtctttaga	aactthgtgt	tttctthgtg	420
tttgggtgtg	gactthgtgt	gggtacttgc	ttctcttca	ttctctttaga	cttctgggtgt	480
ggaagctctg	gttcccaaaa	cccgggccgc	gggtcttgc	aaatcactta	gggtcaatga	540
aaagtatccc	tttcccttga	gggtacttgc	cccggtgagc	ttctgagctc	attactatgc	600
agagagagga	ggtgtcttgc	gttaagagga	gggtcagagc	gggtgttct	tttgggtctt	660
tgtatctctt	aaatttgtgt	acttgtgtgt	aaagacaact	taaagacccc	caaaaaactc	720
tgtttctata	gataagaaat	ctgagctctc	agagagagtc	tgttctgccc	aacatctcca	780
aggaacagct	cccggtctcc	ttgtctctaa	ctgtatctgc	agatcaggaa	ggtgtgtcag	840
ttctatctct	ccctccctcc	gaacttccc	ccctccctcc	ttctatctga	ttgttctctt	900
ttcttctctt	tttctctcca	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	caactctctg	960
gttctctccc	cttctctcca	ctctctctct	agctctctgc	aaatcaactg	gttctctctg	1020
cttthgtggg	tttgggtctg	ttctthgtgc	ttctthgtgc	tttthgttaga	gttgggtctt	1080
gggtgggtca	cttgggtgga	cttctgggtc	caactthgtg	tttthgtgtt	cttcaaaaaa	1140
tttctctcca	gttgtctctt	tttctctcca	cttctctctt	tttctctcca	gttgggtggt	1200
aggtctccaa	gggtcttgc	tttgggtct	caacttggac	gttctctgc	cttgggtctt	1260
attgttctt	tttcttgggt	gttcttctgc	gttctctcc	aaagctctt	cttctctctg	1320
ttctgaaagt	tttctctctg	gttctctctc	tttctctcc	gttcttgggt	cttctctctt	1380
ctctgagctc	caattgtgtc	gttctctctg	agatctctca	ttatgtctaa	gaagaaagct	1440
aatttctatt	aggtctctct	tttctctgta	tttctctctt	aaatcaaggt	aaatctctca	1500
tttctctctt	taattgtgtt	tttctctctt	actatctctc	aaagtctctt	gttctgagct	1560
ttctgaactc	ttctctctgc	aggtctctct	tttctctctc	aaatctctca	cttctctctc	1620
aggtctctca	cttctctctc	caacttctcc	cttctctctc	cttctctctc	tttctctctt	1680
ttctctctct	cttctctctc	caactctctt	caactctctt	cttctctctca	caactctctt	1740
cttthgtgga	cttctctgga	cttctctctt	gttctctgga	tttctctctt	gttctctggt	1800
tttctctgga	cttctctctg	tttctctctt	gttctctggt	gttctctggt	tttctctgga	1860
cttctctgga	gttctctgga	gttctctctt	caactctctt	gttctctgga	gttctctgga	1920
aggtctctca	cttctctgga	gttctctctt	gttctctgga	gttctctgga	gttctctgga	1980
cttctctgga	gttctctctt	gttctctgga	gttctctgga	gttctctgga	gttctctgga	2040

gaatgggttc	ttccatacca	aattgatgac	cagagggccc	cagcaagaa	aacaaagcca	2100
accagaccca	caagccatcc	cgaggggaca	caaaaacctc	accagggctg	acaccccaaa	2160
tggtgaggc	aagctagatg	atgagggaac	aaaagacaga	acacclggc	tcgggcattt	2220
gtcagctctt	ggaagagagc	acacttttag	aggagcagct	gcaaggagcc	tgaacaacaa	2280
actggaaatg	tctcttatga	aagccttcac	aggaaattct	gcaagtcgca	actggggctc	2340
attcctgtgt	tgtcaataga	cttggcgcaa	gcccctggcc	atcgtgaggc	agcctttcca	2400
ctggaactaa	tctgtacact	gcacccgccc	ctggaactgt	gcctgtgttc	caacgcaacc	2460
tacgcatcag	atacaagact	gtcacaattc	tattctccac	ctattctcac	caactctctt	2520
tgtcagctct	ctgggaacac	acgtcttctc	accactaac	gttgggagca	caacccaattc	2580
agccttggtg	cagggtatct	aggtatctac	tatcaaacac	atacctgctc	tctccttggtg	2640
atccagccac	tctacctctg	ggatcctg	ctgctctctg	gtgctctctg	atacctgctc	2700
ggatagctct	ctggtctctc	ctggtctctc	ctggtctctc	gtggtctctc	gtggtctctc	2760
ggctacacac	ttctgtctc	aaaaggggg	aaaaggggg	agcttgaggc	gagccgagat	2820
cgctgctctg	caacccagcc	gggggggagc	agcgagacac	cgctcctaaa	aaaaaacagg	2880
g-gggg-ggg	gggggaaac	agacacac	ccatacttac	cgctacatc	ataaacacac	2940
ctatcaagga	ttcacaagca	actaatacac	atgacacac	tatagatggc	atgtattcgg	3000
ggatactgag	gtgagcaggg	tataagtggc	gcaagactct	tcagtgtaaa	ctctcttctaa	3060
actttacttt	gatttttcaa	taacttaaat	taactctcaa	ataattaaat	taaaaataac	3120
tactttctta	ctacac					3180

<210> 10

<211> 906

<212> DNA

<213> Ev faresi

<400> 10

cgctgtctca	atataatcta	tacaacataa	atccactatc	ttcccccttt	aatggtcagt	60
gtacatacac	aggaagtgtc	tatccttatg	aatcgccagc	caattctctt	tttgcctatcc	120
atagtaaggg	cccgaacata	cgattgggta	gttcggcatt	gcgagttcca	gtgccttttg	180
tctatgcccc	tgcagccttc	cttgggtgta	cccatgggat	tacacttggc	ctcgtagaaa	240
tactgcttca	gttggccttt	ggataccggg	actttctcta	ggactgtgac	cgtcccgcac	300
gacatgtcca	ctgcagctct	tttatctgcc	gctgtgaccc	actcgcta	actgtcacac	360
acgctcagct	ccccacggcg	ggcagggtcg	gagtggcgcc	gaaccctcat	agacatgttt	420
gcggcatcca	ggtaattttt	gtattcctcc	agcagaaaga	gtagaggagg	ctccaaaggc	480
acttgactgc	tgagcatcac	ccgggaagtg	tacaagtcgc	cgctccttat	gttttcttcg	540

	ttggggccgaa ccttctgggc ctcattccagc agctcttcga tgacgtgctc aaaagtgtca	600
	gccagtgatg tcgtcgtcag acctctcgaa cctgccctgg gccattcac gctctccaga	660
	gtcccatggg tcgcacacc tgggtaggcc aagttgcctt gtcctgggac gtttacttct	720
	ttcatgggcg ccgccttcat gcaaccgaag tatgaaataa ccatagtaag gaaaaggatg	780
	gtcatcactc ttctcacctg gtggaactgt gggaaggaag cagagacaga cacagaacag	840
5	gtagaactt ctttctcggg gacagcatgt ggccatctg cttcaataat ttaatttaaa	900
	aaaaaa	906
	<210> 11	
	<211> 992	
	<212> DNA	
	<213> Ev faresi	
	<410> 11	
10	agctgcttca ctacacacta caaacataaa aacaaactaac taccctctta caaggttaag	60
	gtacataaac aggaagctc tatcctttag aatggccagc caattctctt ttgcctatcc	120
	atagtaaggg ccgaacata cgattgggta gttggccatt gccagttcca gtgcctcttg	180
	tcctatgcctc tgcagcctc ctgggtgtaa cccatgggat tacccttggc ctgcctagaaa	240
	tactgactca atagacatt aatcccgagc acttctctcc ggcctgagac cgtcccgccc	300
	gaactgccc ctgcctctt cttatctgac gctgcccac acccgctaac cctctacac	360
	acgtcagct ccacagggc cccacagccc agatggccc gacccctcat agactgctt	420
15	gagggatcca ggtactctt gttctctctc agggatgaga gttggggggg ctccctcagga	480
	ttctgactga ttgggctcc cctgggtggg tcttggttag aggtctcttg gttctctctg	540
	tgggtccgga cctctctgta ctctctctgg agctctctga ttggtctgctc ctctctgga	600
	gtcagtgatg ttgctgctg aactctcgaa ctctgctgg gctccctcc gtctctcaga	660
	gtcccaagg ttggcctcc cggcaggcc aagttgctc ctgctcaggc gttctctctc	720
	tccatggggg ccgccttcat gcaaccgaag tatgaaataa ccatagtaag gaaaaggatg	780
20	gtcatcactc ttctcacctg gtggaactgt gggaaggaag cagagacaga cacagaacag	840
	gaaggctggc tccagctcca tccctcctg cccagcttcc gaagttctgg gaacacaca	900
	tgacacata tgcacagctc tccctctga aatcaggc ccagatag tggcagccc	960
	tattctctc ttgagataga atgctccccc aa	990

<210> 12
<211> 43
<212> DNA
<213> Yapay Dizi

5 <223> Antisens oligonükleotid

<400> 12
ararcrarar arcrrararcr urgrgrurgr argrcrcrur grg 43

<210> 13
<211> 44

10 <212> DNA
<213> Yapay Dizi

<220>
<223> Antisens oligonükleotid

<400> 13
15 rurgrargrc rcrurararg rarurarcra rururgrcru rcru 44

<210> 14
<211> 44
<212> DNA
<213> Yapay Dizi

20 <220>
<223> Antisens oligonükleotid

<400> 14
rgrurgrcru rgrururgru rarargraru rurargrcrc rare 44

<210> 15

<211> 44
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 5 <223> Antisens oligonükleotid
 <400> 15
 rararurgra rcrarurgru rururgrura rgrgrgrarg rcrc 44
 <210> 16
 <211> 23
 10 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> Antisens oligonükleotid
 <400> 16
 15 cmcmagmgmu gmungmcgmg mac 23
 <210> 17
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 20 <220>
 <223> Antisens oligonükleotid
 <400> 17
 cmcmaumgmg gmamcmucmu mgg 23
 <210> 18
 25 <211> 23

	<212> DNA	
	<213> Yapay Dizi	
	<220>	
	<223> Antisens oligonükleotid	
5	<400> 18	
	amgmagmcmg umgmamaumg mgg	23
	<210> 19	
	<211> 23	
	<212> DNA	
10	<213> Yapay Dizi	
	<220>	
	<223> Antisens oligonükleotid	
	<400> 19	
	cmcmcamang gmcmanngmu muc	23
15	<210> 20	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Yapay Dizi	
	<220>	
20	<223> Antisens oligonükleotid	
	<400> 20	
	amamgamumg cmumungamc mau	23
	<210> 21	
	<211> 23	
25	<212> DNA	

	<213> Yapay Dizi	
	<220>	
	<223> Antisens oligonükleotid	
	<400> 21	
5	cmamuumgmg cmumgmacma mcu	23
	<210> 22	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Yapay Dizi	
10	<220>	
	<223> Antisens oligonükleotid	
	<400> 22	
	umumcg mama cmamcmgumg mau	23
	<210> 23	
15	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Yapay Dizi	
	<220>	
	<223> Antisens oligonükleotid	
20	<400> 23	
	amgmaamgma gmcumgumu mgg	23
	<210> 24	
	<211> 23	
	<212> DNA	
25	<213> Yapay Dizi	
	<220>	

	<223> Antisens oligonükleotid	
	<400> 24	
	amungamgm amcmcmagma maa	23
	<210> 25	
5	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Yapay Dizi	
	<220>	
	<223> Antisens oligonükleotid	
10	<400> 25	
	gmumucmgmg cmcmcmamu mga	23
	<210> 26	
	<211> 23	
	<212> DNA	
15	<213> Yapay Dizi	
	<220>	
	<223> Antisens oligonükleotid	
	<400> 26	
	amgmaamama cmamamuama mgg	23
20	<210> 27	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Yapay Dizi	
	<220>	
25	<223> Antisens oligonükleotid	

	<400> 27		
	amcmgcmamg amcmumugmu mac		23
	<210> 28		
	<211> 23		
5	<212> DNA<213> Yapay Dizi		
	<220>		
	<223> Antisens oligonükleotid		
	<400> 28		
	amcmgumcmc amgmngumg mau		23
10	<210> 29		
	<211> 23		
	<212> DNA		
	<213> Yapay Dizi		
	<220>		
15	<223> Antisens oligonükleotid		
	<400> 29		
	gmcmucmamg umamgmucma mag		23
	<210> 30		
	<211> 23		
20	<212> DNA		
	<213> Yapay Dizi		
	<220>		
	<223> Antisens oligonükleotid		
	<400> 30		
25	umgmccmumu umgmgmagmc mcu		23

	<210> 31	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Yapay Dizi	
5	<220>	
	<223> Antisens oligonükleotid	
	<400> 31	
	cmcmucmumu cmumcmuumu mcu	23
	<210> 32	
10	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> Yapay Dizi	
	<220>	
	<223> Antisens oligonükleotid	
15	<400> 32	
	cccggtatcc aaaggc	16
	<210> 33	
	<211> 16	
	<212> DNA	
20	<213> Yapay Dizi	
	<220><223> Antisens oligonükleotid	
	<400> 33	
	gtattagcga gtgggt	16
	<210> 34	
25	<211> 16	

<212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> Antisens oligonükleotid
 5 <400> 34
 gtctatgagg gttcgg 16
 <210> 35
 <211> 16
 <212> DNA
 10 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> Antisens oligonükleotid
 <400> 35
 cctcctctac tcttttc 16
 15 <210> 36
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 20 <223> Antisens oligonükleotid
 <400> 36
 ggcaggttcg agaggt 16
 <210> 37
 <211> 16
 25 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi

<220>
 <223> Antisens oligonükleotid
 <400> 37
 ttccttccca cagttc 16

5 <210> 38
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 10 <223> Antisens oligonükleotid
 <400> 38
 cggttgcatg aaggcg 16

<210> 39
 <211> 16
 15 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> Antisens oligonükleotid
 <400> 39
 20 tggctggcga ttcata 16

<210> 40
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 25 <220>

<223> Antisens oligonükleotid

<400> 40

caacatatca ggagcc

16

<210> 41

5 <211> 16

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Antisens oligonükleotid

10 <400> 41

tgtattccca gaactt

16

<210> 42

<211> 56

<212> DNA

15 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> Antisens oligonükleotid

<400> 42

rurarurgrg rururaruru rurcrarura rcrururerg rgrururgre rarurg

20

56

<210> 43

<211> 56

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

25 <220>

<223> Antisens oligonükleotid

<400> 43

rargrararg rurarararc rgrurcra rcrgrgrarc rarargrgc rararc

56

<210> 44

5 <211> 56

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Antisens oligonükleotid

10 <400> 44

rarurururc rurarcrga rgrarcra rargrurgru rararurcra rcraru

56

<210> 45

<211> 56

15 <212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Antisens oligonükleotid

<400> 45

20 rurarargrg rarcrgcrg rgrarcruu rgrurarcra rcrururcra rgrgrg

56

<210> 46

<211> 56

<212> DNA

25 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> Antisens oligonükleotid

<400> 46

rargrarara rgrarararg rururcrura rarcrcrurg rururcrurg rurgru

56

<210> 47

5 <211> 16

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Antisens oligonükleotid

10 <400> 47

gatttcagag ccgcag

16

<210> 48

<211> 16

<212> DNA

15 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> Antisens oligonükleotid

<400> 48

gacacatcca tcccag

16

20 <210> 49

<211> 16

<212> DNA<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Antisens oligonükleotid

25 <400> 49

cctcgatcatg tctgtg

16

<210> 50
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi

5 <220>
 <223> Antisens oligonükleotid
 <400> 50
 cttgaattgt ttgta 15

10 <210> 51
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> Antisens oligonükleotid

15 <400> 51
 agttgcaaga gttgg 15

20 <210> 52
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> Antisens oligonükleotid
 <400> 52
 atctgttctg ctgtc 15

25 <210> 53
 <211> 15

	<212> DNA	
	<213> Yapay Dizi	
	<220>	
	<223> Antisens oligonükleotid	
5	<400> 53 catattcttg gacga	15
	<210> 54	
	<211> 15	
	<212> DNA	
10	<213> Yapay Dizi	
	<220><223> Antisens oligonükleotid	
	<400> 54 tgtgctgttg taaga	15
	<210> 55	
15	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> Yapay Dizi	
	<220>	
	<223> Antisens oligonükleotid	
20	<400> 55 tgacagagga gtatt	15
	<210> 56	
	<211> 38	
	<212> DNA	
25	<213> Yapay Dizi	

<220>

<223> Antisens oligonükleotid DİZİ KİM. NO: 11'in ters tamamlayıcısı

<400> 56

5 rgrgrcrurc rarcrcrarg rururgruru rurgruru 38

<210> 57

<211> 38

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

10 <220>

<223> Antisens oligonükleotid DİZİ KİM. NO: 12'in ters tamamlayıcısı

<400> 57

rgrcrararu rgrurarurc rururargrg rcrurcra 38

15 <210> 58

<211> 38

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

20 <223> Antisens oligonükleotid DİZİ KİM. NO: 13'ün ters tamamlayıcısı

<400> 58

rgrcrurara rurcrurura rcrararcra rgrcrarc 38

<210> 59

25 <211> 38

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Antisens oligonükleotid DİZİ KİM. NO: 14'ün ters tamamlayıcısı

5 <400> 59

rurcrercru rarcrarara rcrarurgru rcraruru 38

<210> 60

<211> 50

<212> DNA

10 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> Antisens oligonükleotid DİZİ KİM. NO: 41'in ters tamamlayıcısı

<400> 60

15 rgrcrararc rcrgrararg rurarurgra rararurara rcrerarura 50

<210> 61

<211> 50

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

20 <220>

<223> Antisens oligonükleotid DİZİ KİM. NO: 42'nin ters tamamlayıcısı

<400> 61

rgrcreruru rgrurercrg rurgrgrarc rgrururura rcrurercru 50

25 <210> 62

<211> 50

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

5 <223> Antisens oligonükleotid DİZİ KİM. NO: 43'ün ters
tamamlayıcısı

<400> 62

rgrgraruru rarcrarcru rurgrgrurc rurcrgrura rgrarararu 50

<210> 63

10 <211> 50

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

15 <223> Antisens oligonükleotid DİZİ KİM. NO: 44'ün ters
tamamlayıcısı

<400> 63

rgrgrararg rurgrurararc rarargrurc rcrgrcrgru rcr crurura 50

<210> 64

<211> 50

20 <212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Antisens oligonükleotid DİZİ KİM. NO: 45'in ters
tamamlayıcısı

25 <400> 64

rcrargrara rcrargrgru rurargrara rcrurururc rurururcru 50

<210> 65

<211> 25

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

5 <220>

<223> Deney Dizisi

<400> 65

gcacacctgg agatactcta ttata

25

<210> 66

10 <211> 25

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

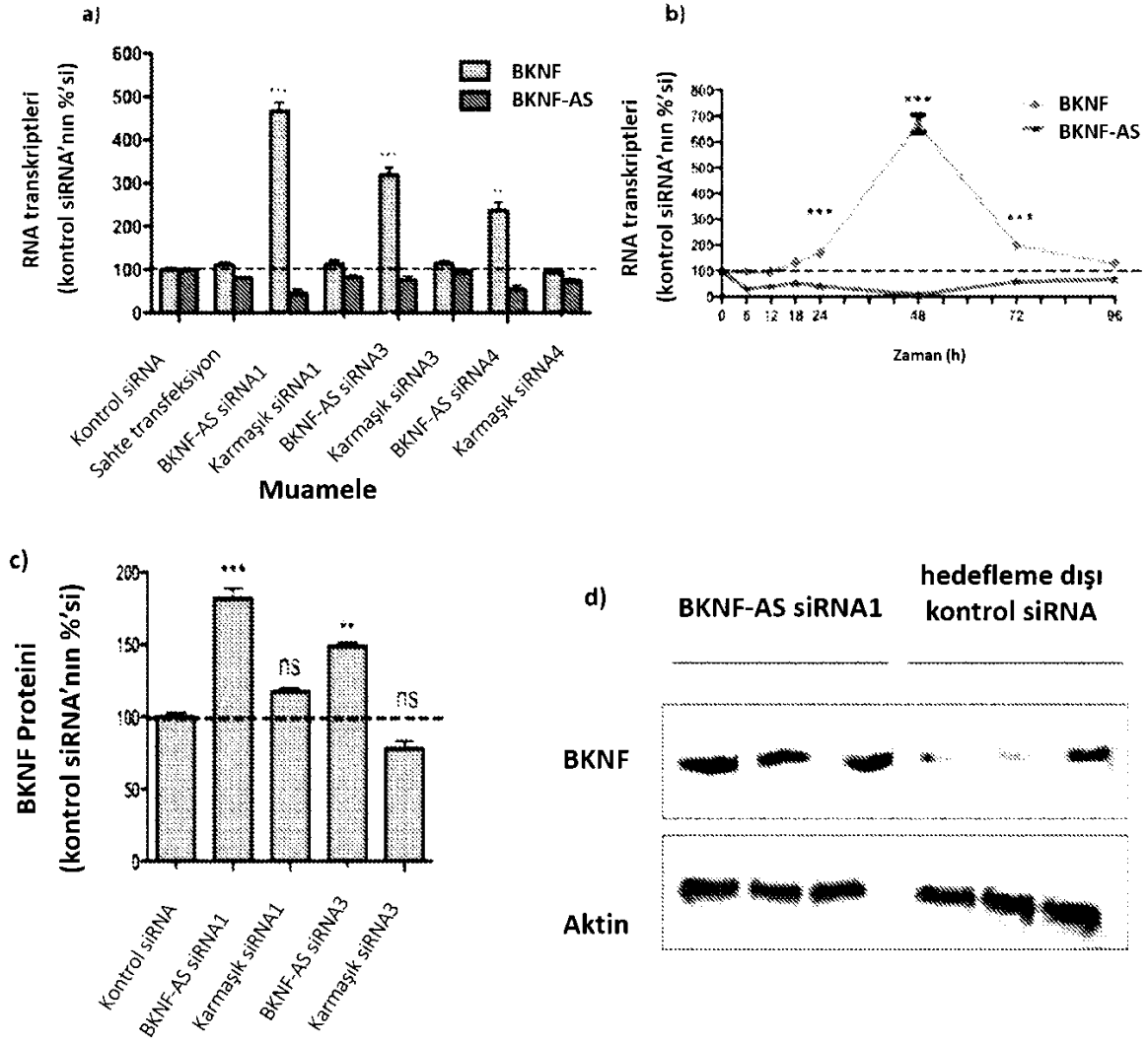
<220>

<223> Deney Dizisi

15 <400> 66

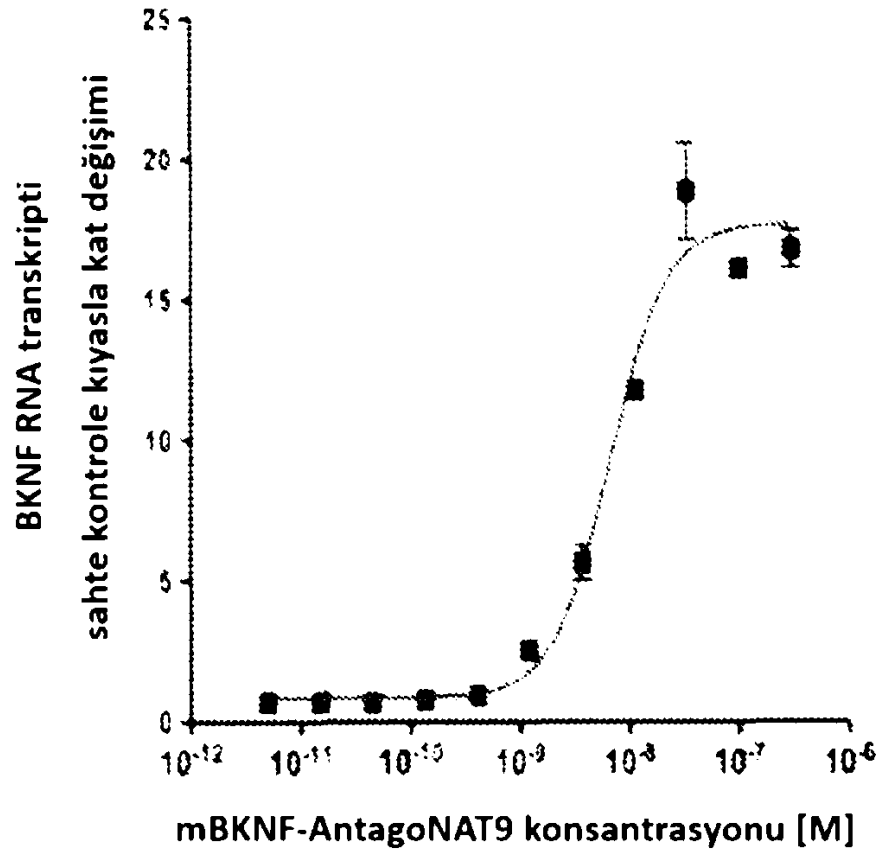
cctgcagaat ggacctggaat taaa 25

ŞEKİL 1

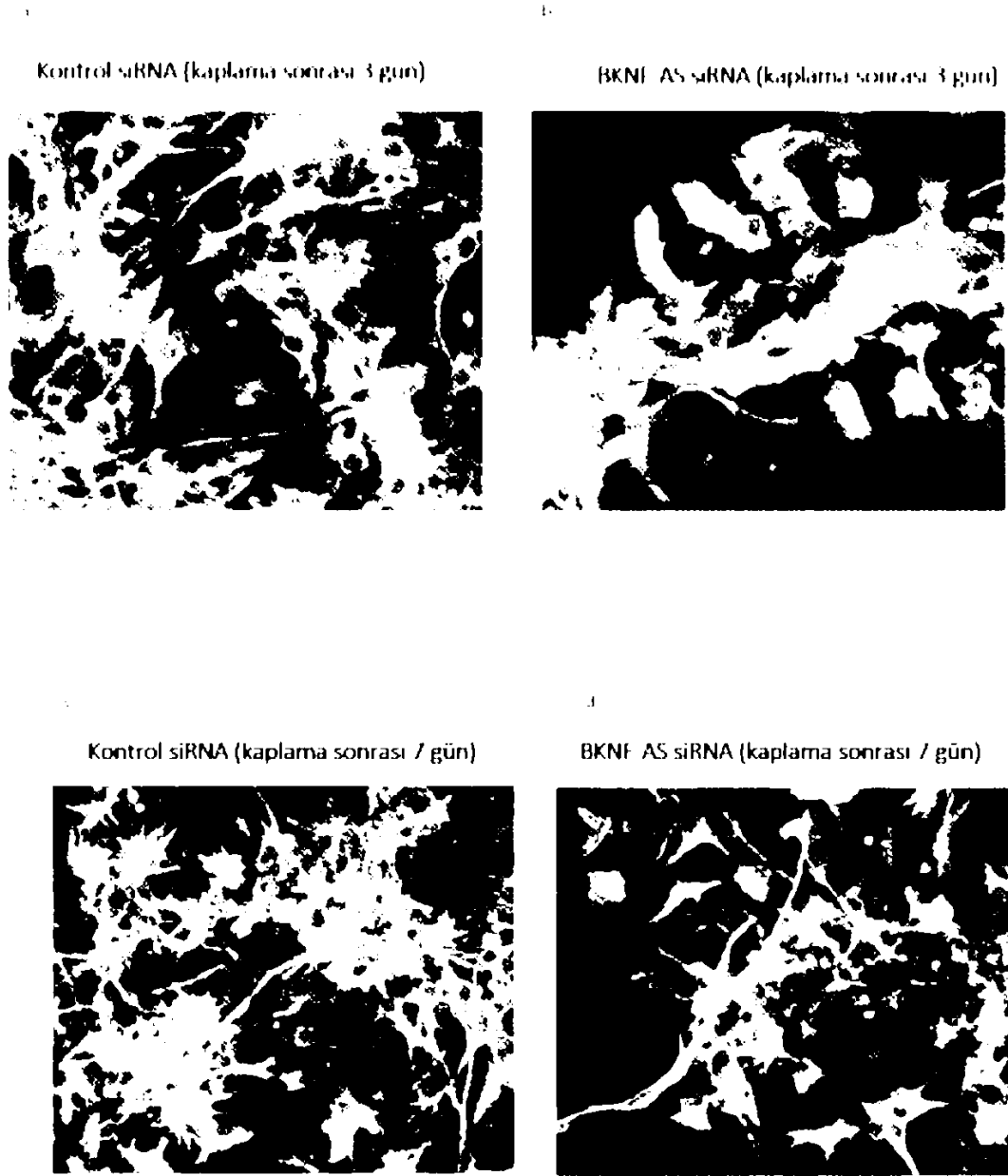


**ŞEKİL 1
DEVAMI**

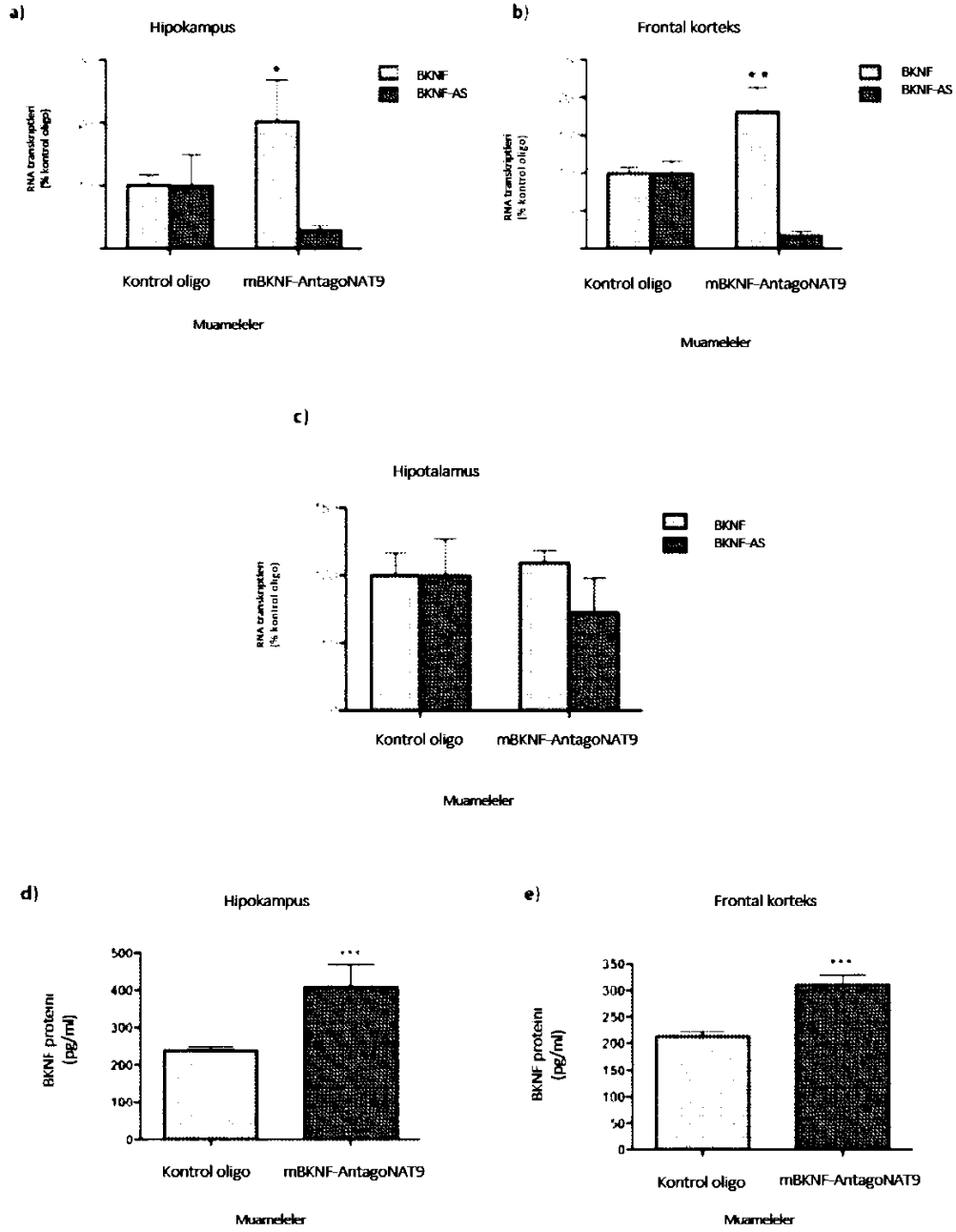
e)



ŞEKİL 2



ŞEKİL 3



ŞEKİL 4

Kontrol oligonükleotit

a)

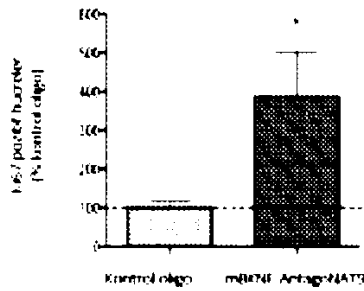


b)

mBKNF- AntagoNAT9

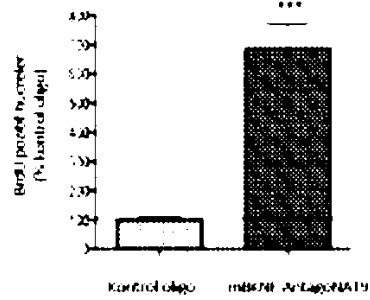


c)



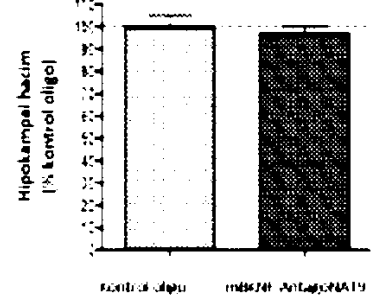
Hippokampus

d)



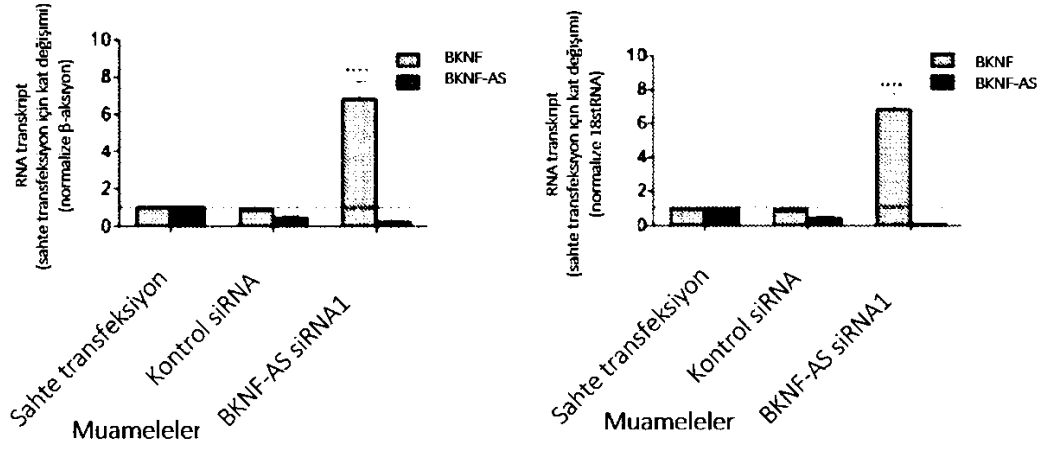
Dentate Gyrus

e)

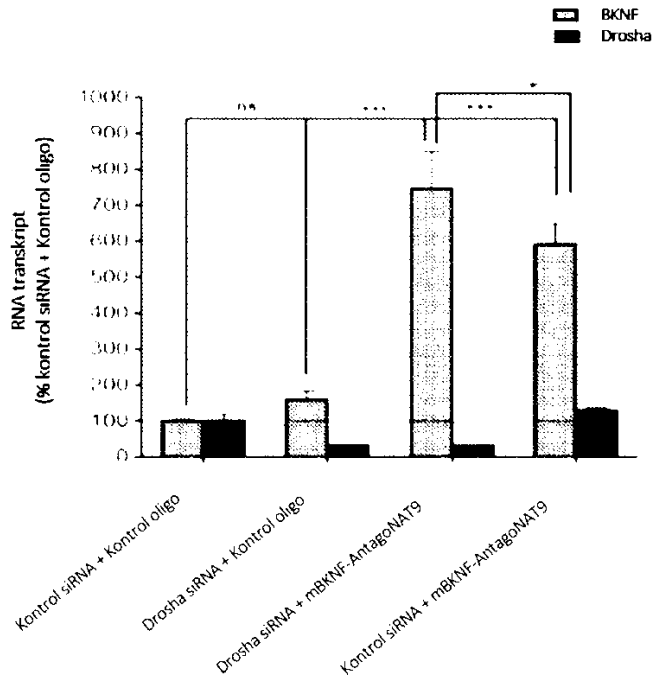


Hippokampus

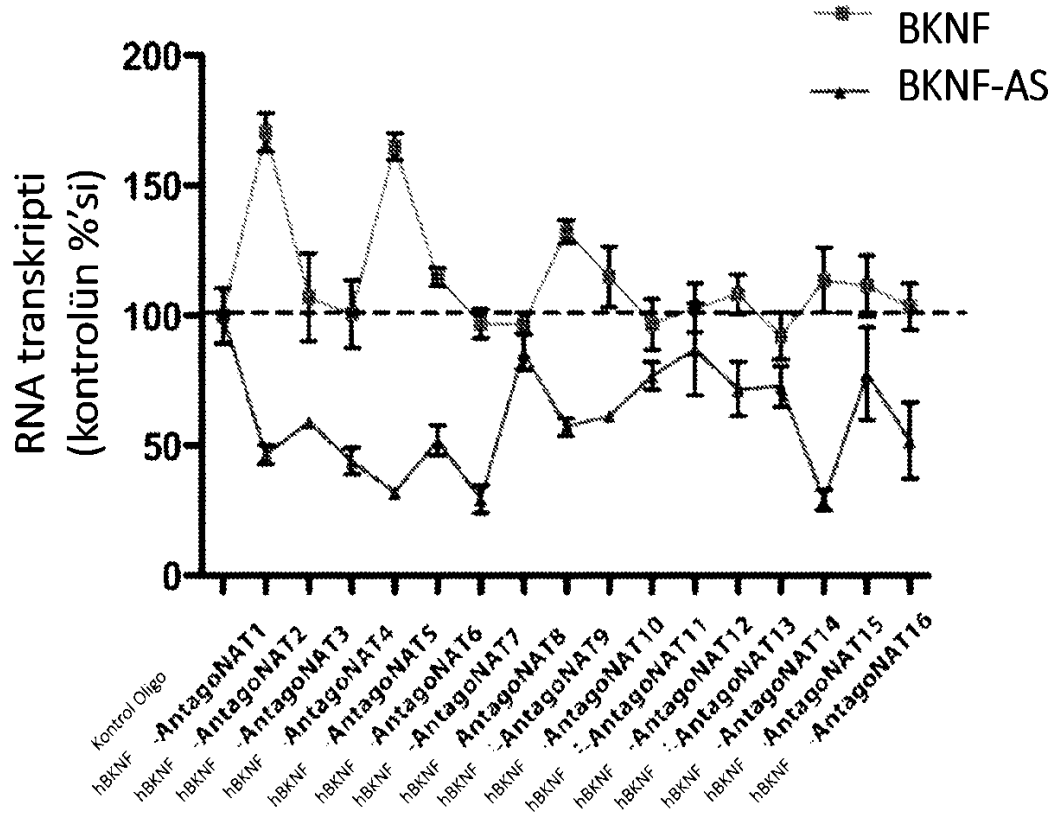
ŞEKİL 5



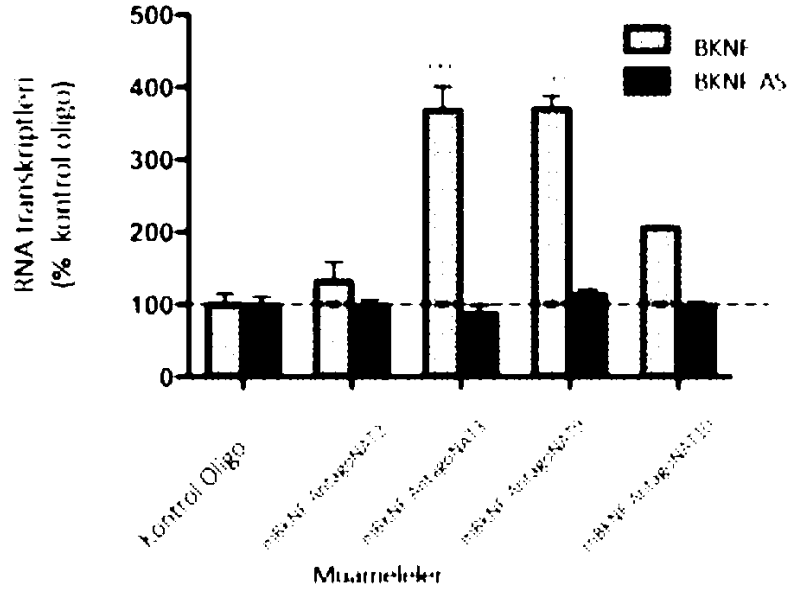
ŞEKİL 6



ŞEKİL 7



ŞEKİL 8



ŞEKİL 9

