

1708/93

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9

"A"

NKQ- C 12R 1/68
C 07H 15/12, 17/00

57.869/SZE

K I V O N A T

Egy
~~szálú~~ számlú, gyűrűs oligonukleotidok

RESEARCH CORPORATION TECHNOLOGIES INC., TUCSON, Arizona,
AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A bejelentés napja: 1992. 03. 26.

Elsőbbsége: 1991. 03. 27. (675,843),

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US92/02480

A nemzetközi közzététel száma: WO 92/17484

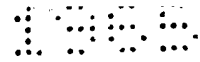
A találmány egyszálú cirkuláris oligonukleotidokat biztosít, melyek mindegyike egy paralell kötésű (P) doménnel és egy anti-paralell kötésű (AP) doménnel rendelkezik, melyeket egymástól hurok domének különítenek el. Az egyes P és AP kötések kielégítő komplementaritással rendelkeznek ahhoz, hogy egy meghatározott ~~cél~~ nukleinsav ~~vel~~ egyik szálához kötődjenek, ahol a P domén paralell módon kötődik a ~~célhez~~ ^{nukleinsavhoz} és az AP domén anti-paralell módon. Továbbá, az egyszálú cirkuláris oligonukleotidok egyszálú és kettősszálú cél nukleinsavakhoz is kötődhetnek. A találmány biztosít ezen oligonukleotidok felhasználására szolgáló módszereket is, valamint az ezen oligonukleotidokat tartalmazó gyógyszerészeti összetételeket is.

8 dbra a d d k l l e p a l
j e l l e m e n t a b s z a r v a s

Jud

1708/93

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY



57.869/SZE

S.P.G. & K.
Budapesti Nemzetközi
Szerzői Iroda
H-1067 Budapest, Daiszihoz u. 10.
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

09828

A

NSKO₆

CIRQ 1/68

COFH 15/12, 17/00

Egy
~~Két~~szálú, gyűrűs oligonukleotidok

RESEARCH CORPORATION TECHNOLOGIES INC., TUCSON, Arizona,
AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Feltaláló:

KOOL Eric T. ROCHESTER, New York,

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A bejelentés napja: 1992. 03. 26.

Elsőbbsége: 1991. 03. 27. (675,843),

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US92/02480

A nemzetközi közzététel száma: WO 92/17484

A találmány az Egyesült Államok kormányának támogatásával jött létre, a GM-46625 számú támogatást a Nemzetközi Egészségügyi Intézet biztosította. Az Egyesült Államok kormánya bizonyos jogokkal rendelkezik a találmánnyal kapcsolatban.

A találmány egyszáлу cirkuláris oligonukleotidokat biztosít, melyek képesek egy cél DNS-hez vagy egy cél RNS-hez kapcsolódni, ezáltal képesek szabályozni a DNS replikációt, az RNS transzkripciót, a fehérje transzlációt és más a nukleinsav templátokat is magukba foglaló folyamatokat. Továbbá, a cirkuláris oligonukleotidok jelölhetők próbákként való alkalmazás céljából egy cél nukleinsav detektálására vagy izolálására. A cirkuláris oligonukleotidok elmozdithatják egy duplex nukleinsav egyik szálát anélkül, hogy előzőleg denaturálnák a duplexet. Továbbá a cirkuláris oligonukleotidok rezisztensek az exonukleázokkal szemben és a célhoz nagyobb szelektivitással és affinitással kötődnek mint a lineáris oligonukleotidok.

A következőkben magadjuk a találmány hátterét

Egy oligonukleotid egy cél nukleinsavhoz hidrogénkötések létrehozásával kötődik, mely kötések a cél és az oligonukleotid bázisai között jönnek létre. Az általános B-DNS hagyományos adenin-timin (A-T) és guanin-citozin (G-C) Watson és Crick bázispárokkal rendelkezik, melyek között sorrendben 2 és 3 hidrogénkötés van. A hagyományos hibridizációs technika a szekvencia specifikus DNS vagy RNS próbák azon képességén alapszik, hogy egy cél nukleinsavhoz a Watson-Crick-féle hidrogénkötéseken keresztül kötődik. Azonban más típusu hidrogénkötődési mód is ismert, melyben egy bázis néhány atomja - melyek nem vesznek részt a Watson-Crick-féle bázis kápzésben - hidrogénkötéseket hozhat létre más nukleotidokkal. Például, a timin (T) kötődhet egy A-T Watson-Crick-féle bázispárhoz az adeninhez kapcsolódó

hidrogénkötéseken keresztül, ezáltal létrehozva egy A-AT bázis triádot. Hoogsteen (1959, Acta Crystallography 12:822) írta le először a T-AT és C-GC bázis triádokban jelenlevő alternatív hidrogénkötéseket. Még később G-TA bázis triádokat, melyekben a guanin hozhat létre hidrogénkötést egy központi timinnel, figyeltek meg (Griffin et al., 1989, Science 245:967-971). Ha egy oligonukleotid egy célhoz mind a Watson-Crick-féle és az alternatív hidrogénkötésekkel képes kötődni, akkor egy rendkívüli módon stabil komplex képződhet, melynek számos in vivo és in vitro felhasználási lehetősége lehet. Azonban ezideig nem jelent meg leírás olyan oligonukleotidról, mely rendelkezik azokkal a szükséges szerkezeti tulajdonságokkal, melyek a Watson-Crick-féle és alternatív hidrogénkötésekkel való célkötődés eléréséhez szükségesek.

Megfigyeltek olyan oligonukleotidokat, melyek nem Watson-Crick-féle hidrogénkötésekkel kötődtek in vitro. Például Cooney et al., (1988, Science 241:456) leirtak egy 27 bázisu egyszáru oligonukleotidot, mely egy kettősszáru nuklinsavhoz nem-Watson-Crick-féle hidrogénkötéseken keresztül kapcsolódik. Azonban ezen típus három száru komplexei nem túl stabilak, mivel az oligonukleotid céljához csupán kevésbé stabil alternatív hidrogénkötésekkel kapcsolódik, pl. egyetlen Watson-Crick-féle kötés nélkül.

Az oligonukleotidokat számos célra használják. Például az oligonukleotidok használhatók próbaként cél nukleinsavakhoz, melyeket szűrőre vagy membránra immobilizáltak, vagy melyek a szövetben vannak jelen. Sambrook et al (1989, Molecular Cloning:

A Laboratory Manual, Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Press, NY)
részletes leírást biztosítanak a hibridizációs technikákról.

Továbbá, nagy az érdeklődés mostanában az oligonukleotidok celluláris nukleinsavak biológiai funkcióinak regulátoraiként való fejlesztése iránt. Ez az érdeklődés a természetesen előforduló komplementer vagy antisense RNS olyan megfigyeléséből ered, hogy néhány sejt a fehérje expresszió szabályozására használja. Azonban az oligonukleotidok biológiai folyamatok in vivo szabályozására való fejlesztését számos régen fennálló probléma akadályozza, ideértve a lineáris oligonukleotid alacsony kötési stabilitását és nukleáz érzékenységét.

Például, a humán c-myc gén transzkripcióját gátolta egy sejtmentes, in vivo kísérleti rendszerben egy 27 bázisu lineáris oligonukleotid, melyet a c-myc promoterhez való kötődéshez terveztek. A gátlást csupán akkor figyelték meg, amikor gondosan ellenőrzött in vitro vizsgálati rendszert használtak, melyben a fiziológias hőmérsékletnél alacsonyabbat alkalmaztak és számos celluláris enzimet eltávolítottak vagy inaktiváltak. Ezekre a körülményekre azért volt szükség, mert a lineáris oligonukleotidok alacsony affinitással kötődnek és igen érzékenyek olyan enzimekkel szemben melyek a DNS lineáris darabjait bontják (Cooney et al.). Egy pre-mRNS transzkript összekapcsolását, mely alapvető a Herpes Simplex virus replikációjához, szintén gátolta egy olyan lineáris oligonukleotid, mely komplementer volt egy acceptor kapcsolódási helyhez. Ebben az esetben egy metilfoszfónát kötést alkalmaztak a lineáris oligonukleotidban nukleáz

rezisztenciájának fokozása céljából. Az ezen kémiaiilag módosított oligonukleotid tenyésztápközeghez való hozzáadása csökkenést okozott a protein szintézisben és a nem fertőzött sejtek szaporodásában, ami valószínűleg toxicitási problémáknak köszönhető magas koncentrációk esetében (Smith et al., 1986 Proc. Natl. Acad. Sci. 83:2787-2791).

Egy másik példában, lineáris oligonukleotidokat használtak humán immunodeficiencia vírus replikációjának gátlására tenyésztett sejtekeben. A retrovirus genom terminális ismétlődéseihez közeli vagy az ezeken belüli helyekkel komplementer és a helyeken belül bizonyos kapcsolási részekkel komplementer lineáris oligonukleotidok voltak a leghatékonyabbak a virális replikáció blokkolásában. Azonban ezekben a kísérletekben a lineáris oligonukleotidok nagy mennyiségeire volt szükség a hatás eléréséhez, feltehetően azért mert ezen lineáris oligonukleotidok alacsony kötési stabilitással rendelkeznek és a nukleázok könnyen kárt tesznek bennük (Goodchild et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5507-5511).

Ennek megfelelően azok az oligonukleotidok, melyek a biológiai folyamatok használható regulátorai, előnyösen bizonyos tulajdonságokkal rendelkeznek. Először is, az oligonukleotid elég erősen kell kötődjön komplementer cél nukleinsavához ahhoz, hogy a kívánt regulációs hatással rendelkezzen. Másodszor általában kívánatos, hogy az oligonukleotid és célja szekvencia specifikus legyen. Harmadszor az oligonukleotid megfelelő felezési idővel rendelkezzen in vivo körülmények között, azért, hogy a kívánt

szabályozást el tudja végezni a sejtben. Azonban az oligonukleotid rezisztens kell legyen olyan enzimekkel szemben, melyek nukleinsavakat bontanak, mint pl. a nuklázok. Negyedszer, az oligonukleotid az egyszálu és a kétszálu célokhoz is hozzá kell tudjon kötődni.

Míg a lineáris oligonukleotidok kielégithetik a szekvencia specifitás követelményeit, a lineáris oligonukleotidok a nukleázokkal szemben érzékenyek és általában kémiai módosításra van szükség biológiai felezési idejük megnövelésére. Az ilyen módosítások megnövelik az oligonukleotid előállítási költségét és toxicitási problémákat is okozhat. Azonkívül a lineáris oligonukleotidok úgy kötődnek, hogy kétszálu komplexet hozzanak létre, olyanokat, melyek a celluláris nukleinsavakban vannak jelen. Következésképpen a celluláris enzimek könnyen módosíthatják és disszociálhatják a kétszálu komplexben a célhoz kötődött lineáris oligonukleotidot. A lineáris oligonukleotidok alacsony kötési ereje és nukleáz szenzitivitása így szükségszerűvé teheti az oligonukleotid nagy koncentrációban való alkalmazását ezáltal az ilyenfajta alkalmazást toxikussá vagy költségessé téve. Továbbá, míg a lineáris oligonukleotidok egy kettős szálu célhoz alternatív hidrogénkötésekkel kapcsolódhatnak (pl. Hoogstein-féle kötés), a lineáris oligonukleotidok nem tudják könnyen disszociálni a kettősszálu célt az egyik szál helyettesítése céljából és így egy sokkal stabilabb Watson-Crick-féle kötési mintát hoznak létre.

Ezenkívül, a megnövekedett kötési erő fokozza a szabályozó

oligonukleotid hatékonyságát. Ezért egy magasabb kötési affinitású oligonukleotid alacsonyabb dózisban alkalmazható. Az alacsonyabb dózis csökkenti a költségeket és csökkenti a toxicitás valószínűségét.

Ennek megfelelően a találmány olyan egyszáлу cirkuláris oligonukleotidokat biztosít, melyek az oligonukleotid cirkularitásának természete miatt, valamint az oligonukleotidon jelenlevő domének miatt nukleáz rezisztensek és erős affinitással és magas szelektivitással kötődnek cél nukleinsavjaikhoz. Továbbá a találmány cirkuláris oligonukleotidjai disszociálhatják a kettősszálu célt és kötődhetnek hozzá anélkül, hogy előzőleg denaturálták volna azt.

A DNS vagy RNS egyszáлу köreinek néhány típusa ismert. Például, néhány természetesen előforduló virális és baktériofág genom szerkezete egyszáлу cirkuláris nukleinsav. A DNS egyszáлу köreit Erie et al. (1987, *Biochemistry* 26:7150-7159 és 1989, *Biochemistry* 28:268-273) tanulmányozták. Azonban ezen cirkuláris molekulák egyikét sem tervezték a cél nukleinsavhoz való kötődéshez. Azonban a találmány bemutat egy olyan újítást, melyet egy alapvető fejlesztés jellemez a tudomány e területén ismert korábbitól eltérően, mivel a cirkuláris oligonukleotidok magas specificitást alacsony vagy nem létező toxicitást és a nukleázokkal szemben a lineáris oligonukleotidokénál erősebb rezisztenciát mutat, míg az egyszáлу vagy kettős szálu cél nukleinsavakhoz való kötődése sokkal erősebb, mint a hagyományos lineáris oligonukleotidoké.

A következőkben megadjuk a találmány összefoglalását

A találmány biztosít egy egyszáлу cirkuláris oligonukleotidot, mely legalább egy paralell kötésű (P) doménnel és legalább egy nem-paralell kötésű (AP) doménnel rendelkezik és van egy hurok doménje az egyes kötő domének között a cirkuláris oligonukleotid létrehozása céljából. Az egyes P és a megfelelő AP domének elegendő komplementaritással rendelkeznek ahhoz, hogy detektálhatóan kötődjenek egy meghatározott nukleinsav cél egyik szálához a P doménnel a célhoz való paralell módon való kötődéssel, az AP domén pedig egy anti-paralell kötéssel kötődik a célhoz. Az elegendő komplementaritás azt jelenti, hogy elegendő számú bázispár létezik a cél nukleinsav és a cirkuláris oligonukleotid P és/vagy AP doménjei között a stabil, pl. detektálható kötés eléréséhez.

A találmány egy másik megvalósulása biztosít olyan egyszáлу cirkuláris oligonukleotidokat, melyeket egy riporter molekulából származtattunk, a cél nukleinsavhoz való próba biztosítása céljából vagy egy drogból vagy egy másfajta gyógyszerészeti anyagból származtattunk a sejt specifikus drog szállításának biztosítása céljából vagy olyan anyagokból származtattuk, melyek képesek hasítani vagy egyéb módon módosítani a cél nukleinsavat vagy olyan anyagokból, melyek a celluláris felvételt vagy a cél oligonukleotidhoz való kötődését elősegítik.

A találmány egy további megvalósulásában olyan egyszáлу cirkuláris oligonukleotidokat biztosítunk, melyek egy szilárd támasztékhoz kötöttek az oligonukleotiddal komplementer nuklein-

sav izolálása céljából.

A találmány egy megint más megvalósulásában egy olyan részekre osztott kittet biztosítunk, mely a cél nukleinsav detektálására vagy diagnózisára szolgál ideértve legalább egy első tároló részt mely biztosítja a cirkuláris oligonukleotidok bármelyikét.

A találmány egy további megvalósulásában biztosítunk egy a cél nukleinsav detektálására szolgáló módszert, mely magába foglalja egy egyszálu cirkuláris oligonukleotid olyan mintával való kapcsolatba hozását, mely tartalmazza a cél nukleinsavat annyi ideig és olyan körülmények között, mely megfelelő az oligonukleotid-cél komplex létrehozásához valamint a komplex detektálását. Ez a detektálási módszer lehet fluoreszcens energia átvitel.

A találmány egy megint más megvalósulásában egy a DNS az RNS és a fehérje bioszintézisének szabályozására alkalmas módszert biztosítunk. Ebbe a módszerbe tartozik legalább egy cirkuláris oligonukleotid DNS, RNS vagy fehérje nukleinsav templáttal való összehozása olyan körülmények között, mely kielégítő az oligonukleotid templátban található cél szekvenciához való kötődésének eléréséhez, melyet az oligonukleotid célhoz való kötődése követ, a templáthoz való hozzáférhetőség blokkolva van ezért a DNS, az RNS vagy a fehérje bioszintézise szabályozás alatt áll.

A találmány egy további megvalósulásában gyógyszerészeti összetételeket biztosítunk a cirkuláris oligonukleotidok legalább egyikének bioszintézist szabályozó mennyiségét tartalmazó nuk-

leinsav vagy fehérje bioszintézisének szabályozására és egy gyógyszerészetileg elfogadható hordozót.

A találmány egy további megvalósulásában egy az egyszáлу cirkuláris oligonukleotid előállítására szolgáló módszert biztosítunk, mely magába foglalja egy lineáris előkör vég-kapcsolódó oligonukleotidhoz való kötődését az előkör két végének kapcsolódását, valamint a cirkuláris oligonukleotid termék ki-nyerését.

A találmány egy megint más megvalósulásában szál elmozdítás-ra biztosítunk módszert egy kettősszálu nukleinsav célban, úgy, hogy a célt összehozzuk a cirkuláris oligonukleotidok bármelyiké-vel annyi ideig és olyan körülmények között, mely elegendő a cél denaturálására és a cirkuláris oligonukleotid kötésére.

A következőkben megadjuk a találmány rajzainak rövid leírását

Az 1A. ábra a Watson-Crick-féle (anti-paralell domén) AT és GC bázispárok kötési mintáját mutatja. Az 1B. ábra a T-AT, C+GC és G-TA bázis triádokat mutatja, melyek a P, a cél és az AP nukleotidok között jöhetnek létre.

A 2. ábra az egyszáлу cirkuláris oligonukleotidok szintézis-éhez szükséges cirkularizációs reakciót illusztrálja sematiku-san. Egy lineáris előkör oligonukleotid kötődik egy olyan oligo-nukleotidhoz, mely ugyanolyan szekvenciával rendelkezik, mint a cél, pl. egy vég-kapcsolódásu oligonukleotid, az előkör komplex létrehozása céljából. Ligálás után a cirkularizált oligonukleoti-dokat szeparáltuk a vég-kapcsolódásu oligonukleotidoktól.

A 3. ábra a lineáris prekurzoroktól a cirkuláris oligo-

nukleotidokig tartó szekvenciákat mutatja, pl. előköröket (1-3-as a következő szekvencia azonosító számokkal: SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7), célokat (4-es, 5-ös, a következő szekvencia azonosítási számokkal: SEQ ID NO:8, és SEQ ID NO:9), cirkuláris oligonukleotidokat (6-os, 7-es, 8-as és 13-as a következő szekvencia azonosítási számokkal: SEQ ID NO:5-7 és 14) és lineáris oligonukleotidokat (9-12-es és 14-es a következő szekvencia azonosító számokkal: SEQ ID NO:10-13 és 15), melyek a Példákban kerülnek leírásra.

A 4. ábra egy vég-kapcsolódásu-oligonukleotiddal komplexszé tett lineáris előkör szerkezetét mutatja ligálás előtt.

Az 5. ábra a pH hatását mutatja a cirkuláris oligonukleotid:cél komplex képződésre, a T_m mérések szerint. A fekete körök egy 6:4 komplex különböző pH értékeken mért stabilitását mutatják, míg a fekete négyzetek a 7:5 komplexek stabilitását. A 6-os és 7-es cirkuláris oligonukleotidok és a 4-es és 5-ös célok szekvenciáit a 3. ábrában mutatjuk be.

A 6A. ábra a hurok méret komplex képződésre kifejtett hatását mutatja, a két célhoz való kötődés összehasonlításával: egy egyedüli $(dA)_{12}$ cél (négyzetek) és egy 36 nukleotidból álló oligonukleotid cél (körök) összehasonlításával. A 6B. ábra a cél és a kötő domén hosszúságának hatását mutatja a komplex képződésre.

A 7. ábra egy cirkuláris oligonukleotid és egy olyan cél közötti komplex képződését mutatja be, ahol a P és az AP kötő domének lépcsősen helyezkednek el a célon.

A 8. ábra egy fluoreszcens jelölésű kettősszálu cél (SEQ ID NO: 11) egyik szálának vagy egy SEQ ID NO:8 számmal rendelkező lineáris oligonukleotiddal való (pontozott vonal) vagy egy SEQ ID NO:5 számmal rendelkező cirkuláris oligonukleotiddal (folytonos vonal) való helyettesítését mutatja be. A standard helyettesítést a fluoreszcencia erősségében bekövetkezett növekedés mérésével néztük (Y-axis) az idő arányában (X-axis).

A 9. ábra a különböző koncentrációkban a duplex célokra (SEQ ID NO:5) vonatkozó K_{obs} megfigyelt pseudo-elsőrendű sebesség konstansainak pontjait ábrázolja. A sebesség konstansok bizonytalansága 10%-nál nem nagyobb. A megrajzolt görbe egy derékszögű hiperbola, amit a legjobb egybeeséssel hoztunk létre. Az adatok kettős reciprok szerkesztése pl. [cirkuláris oligonukleotid]⁻¹ szemben a $(K_{obs})^{-1}$ lineáris, egy $8.95 \times 10^{-6} \text{ sec} \cdot \text{M}^{-1}$ lejtéssel és egy 39.8 másodperces y-feltartóztatással.

A következőkben megadjuk a találmány részletes leírását.

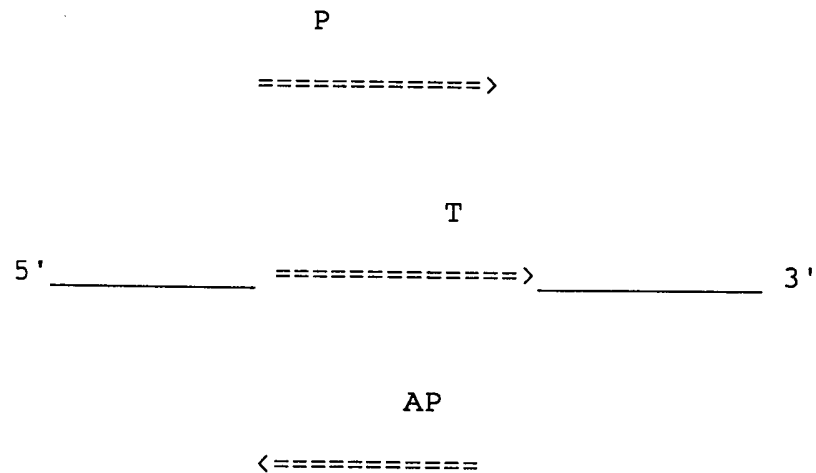
A találmány olyan egyszálu cirkuláris oligonukleotidokkal kapcsolatos, melyek pl. körök, melyek a nukleinsav célokhoz magasabb affinitással és szelektivitással képesek kapcsolódni, mint a megfelelő lineáris oligonukleotidok. Továbbá, mivel ezek a körök képesek felnyitni egy kettős szálu nukleinsav két szálát és képesek ide kötődni, mind az egyszálu, mind a kettősszálu nukleinsavak célként szolgálhatnak a cirkuláris oligonukleotidokkal való kötődéshez.

Továbbá, mivel ezen körök egyszálu, és kettős szálu célok-

hoz való kötődése is erős és szelektív, számos alkalmazási lehetőséget biztosítanak ideértve az olyan biológiai folyamatok szabályozási módszereit, mint a DNS replikáció, az RNS transzkripció, az RNS összeillesztés és felhasználás, a fehérje transzláció és a hasonlók. Hasonlóképpen ezen körök azon képessége, hogy a kettősszálu nukleinsavakat disszociálni tudják és a célzott nukleinsavhoz szelektíven és erősen kötődni képesek, ideálissá teszi ezeket diagnosztikai próbaként, vagy markerekként, hogy lokalizálják, pl. a kromoszómán vagy más DNS vagy RNS molekulákban a specifikus helyeket. Továbbá, ezek a körök hasznosak a komplementer nukleinsavak izolálásában vagy drogok vagy más molekulák sejtekbe való szekvencia-specifikus bejuttatásában.

Előnyösen a találmány egyszálu cirkuláris oligonukleotidjai legalább egy paralell kötésű (P) doménnel és legalább egy anti-paralell kötésű (AP) doménnel rendelkeznek és van egy hurok doménjük az egyes kötő domének között, így egy cirkuláris oligonukleotid jön létre. Továbbá, az egyes P és AP domének elegendő komplementaritást mutatnak egy meghatározott nukleinsav cél egyik szálához való kötődéshez, azáltal, hogy a P domén paralell módon kötődik a célhoz és az AP domén anti-paralell módon kötődik ehhez.

A későbbiekben bemutatott sematikus ábrázolás bemutatja a P és AP oligonukleotid domének egy sorozatának cirkuláris elrendeződését egymáshoz viszonyítva valamint a célhoz kapcsolódva (T, ahogy a későbbiekben jelöljük).



A nyilak az egyes szálak 5'-től 3' irányu orientáltságát jelzik, ahol az 5'vég az egyes domének farkok részénél és a 3'vég a nyilak hegyénél helyezkedik el. Azonban ahogy itt alkalmazzuk, a nukleinsavak paralell módon való kötődése azt jelenti, hogy az 5' - 3' orientáció azonos a komplexben levő az egyes szálak vagy nukleotidok esetében. Ez a fajta kötődés található meg a cél és a P domén között. A találmány szerinti használatban, a nukleinsav anti-paralell módon való kötődése azt jelenti, hogy a komplexben levő két szál vagy nukleotidok 5' - 3' orientációi ellentétes irányban fekszenek, pl. a szálak oly módon helyezkednek el, ahogy az a kettős hélixü DNS-ben a tipikus Watson-Crick-féle bázis pár elrendezésben található.

Ha egynél több P vagy AP kötő domén van jelen, az ilyen kötő doméneket más P és AP doménektől hurok domének szeparálják el, melyek hosszúsága elegendő a sokrészes célokhoz való kötődés biztosításához. Továbbá, ha egy kör sokszoros AP és P doménekkal rendelkezik, a megfelelő célok nem kell, hogy szükségszerűen egy

nukleinsav szálon helyezkedjenek el. Azonkívül egy adott célhoz kötődő cirkuláris oligonukleotid egy hurok doménje lehet egy AP vagy P domén egy második célhoz való kötődéshez amikor a cirkuláris oligonukleotid elszabadul az első céltől.

A találmánnyal egyetértésben a P és AP domének nukleotid szekvenciája meghatározható a nukleinsav cél meghatározott szekvenciájából utalva a bázis párosodás későbbiekben megadott szabályaira. A cél lehet egyszálu vagy kettős szálu és ismert funkciói és szerkezeti tulajdonságai miatt szelektáltuk. Például néhány előnyben részesített cél lehet kódoló régió, replikációs origó, reverz transzkriptáz kötő hely, transzkripciós szabályozó elem, RNS összeillesztési hely vagy riboszóma kötő hely többek között. A cél szelektálható azon képessége alapján is, hogy képes-e egy DNS vagy egy RNS templát detektálására vagy izolálására. Az előnyben részesített célok purinban gazdagok pl. adeninben és guaninban.

A cél DNS vagy RNS nukleotid szekvenciája lehet teljesen vagy részben ismert. Ha a cél nukleotid szekvencia teljesen ismert a P és AP domének szekvenciáját olyan szükséges komplementaritási fokkal tervezzük meg, hogy a kötődés létrejöjjön, ahogy azt ismert eljárásokkal detektálható, pl. a fény abszorpcióban vagy a fluoreszcenciában bekövetkező változások révén. Néhány esetben a cél szekvencia bemutatható egy konszenzus szekvenciával vagy lehet csupán részben ismert. Például egy konszenzus szekvenciával képviselt cél teljes osztályához kötődő cirkuláris oligonukleotidok (körök) biztosíthatók úgy, hogy a cél konszen-

zus szekvenciájából tervezzük meg a P és AP doméneket. Ebben az esetben a célok némelyike pontosan illeszkedik majd a konszenzus szekvenciához, mások rendelkeznek majd néhány nem illeszkedő bázissal, melyek viszont nincsenek elég nagy számban ahhoz, hogy megakadályozzák a kötődést. Hasonlóképpen, ha a cél szekvencia egy része ismert, a tudomány e területén jártas szakember a későbbiekben megadott bázis párosodási szabályokhoz fordulhat az olyan körök megtervezésekor, melyek a célhoz nagyobb affinitással kapcsolódnak mint egy lineáris oligonukleotid, melynek szekvenciája ugyan megfelel a cirkuláris oligonukleotidénak.

Ily módon a találmány olyan körökre is vonatkozik, melyek olyan P és AP doménekkel rendelkeznek, melyek elegendően komplementerek ahhoz, hogy egy olyan nukleinsav célhoz kötődjenek, melyben a P és az AP domének elegendő számu, de nem feltétlenül összes nukleotid pozícióját a cél szekvenciájából határoztuk meg a találmány bázis párosodási szabályaival egyező módon. A meghatározott (azaz ismert) pozíciók száma azon pozíciók száma, mely ahhoz szükséges, hogy elegendő komplementaritást biztosítson a kérdéses oligonukleotidoknak a céljaikhoz való kötődéshez, ahogy az standard eljárásokkal detektálható, ideértve a fény abszorpcióban a kötődés vagy az olvadás hatására bekövetkező változást.

A találmány bázis párosodási szabálya biztosítja a P domén számára, hogy a célhoz oly módon kötődjön, hogy olyan bázis párokat hozzon létre, ahol a P domén és a cél nukleotidok is azonos 5' - 3' orientációjúak. Előnyösen ezek a szabályok kielégítőek olyan mértékben, ami a cirkuláris oligonukleotid céljához

való kötődésének eléréséhez szükséges, pl. a komplementaritás nem szükséges, hogy 100%-os legyen amíg a kötődés detektálható. Azonban a P domén szekvenciájának meghatározásához az általános szabályok a következők:

ha a célban egy pozícióban a bázis egy guanin vagy egy guanin analóg akkor a P egy citozinnal vagy annak egy megfelelő analógjával rendelkezik a megfelelő pozícióban;

ha a célban egy pozícióban a bázis egy adenin vagy egy adenin analóg, akkor a P egy timinnel vagy egy uracillal vagy ezek egy alkalmas analógjával rendelkezik a megfelelő pozícióban;

ha a célban egy pozícióban a bázis egy timin vagy egy timin analóg, akkor a P egy citozinnal vagy egy guaninnal vagy ezek egy alkalmas analógjával rendelkezik a megfelelő pozícióban;

ha a célban egy pozícióban a bázis egy citozin vagy egy citozin analóg, akkor a P egy citozinnal, timinnel vagy uracillal vagy ezek egy alkalmas analógjával rendelkezik a megfelelő pozícióban; és

ha a célban egy pozícióban a bázis egy uracil vagy egy uracil analóg, akkor a P egy citozinnal egy guaninnal, timinnel, vagy egy uracillal vagy ezek egy alkalmas analógjával rendelkezik a megfelelő pozícióban.

A találmány bázis párosodási szabálya biztosítja az AP domén számára, hogy a célhoz oly módon kötődjön, hogy olyan bázis párokat hozzon létre, ahol az AP domén és a cél nukleotidok ellentétes orientációjúak. Előnyösen ezek a szabályok kielégí-

tők olyan mértékig, ami a cirkuláris oligonukleotid céljához való detektálható kötődésének eléréséhez szükséges, pl. a komplementaritás 100%-osnál kisebb lehet. Azonban a bázis párosodási szabályhoz csupán olyan mértékig ragaszkodhatunk, ami az elegendő komplementaritás eléréséhez szükséges a cirkuláris oligonukleotid és célja közötti detektálható kötés létrehozásához.

Igy az AP domén szekvenciájának meghatározásához az általános szabályok a következők:

ha a célban egy pozícióban a bázis egy guanin vagy egy guanin analóg, akkor az AP egy citozinnal vagy egy uracillal vagy ezek egy megfelelő analógjával rendelkezik a megfelelő pozícióban;

ha a célban egy pozícióban a bázis egy adenin vagy egy adenin analóg, akkor az AP egy timinnel vagy egy uracillal vagy ezek egy alkalmas analógjával rendelkezik a megfelelő pozícióban;

ha a célban egy pozícióban a bázis egy timin vagy egy timin analóg, akkor az AP egy adeninnel vagy ennek egy alkalmas analógjával rendelkezik a megfelelő pozícióban;

ha a célban egy pozícióban a bázis egy citozin vagy egy citozin analóg, akkor az AP egy guaninnal vagy ennek egy alkalmas analógjával rendelkezik a megfelelő pozícióban;

ha a célban egy pozícióban a bázis egy uracil vagy egy uracil analóg, akkor az AP egy adeninnel vagy egy guaninnal vagy ezek egy alkalmas analógjával rendelkezik a megfelelő pozícióban.

Egy előnyben részesített megvalósulásban a P, az AP és a

hurok domének egymással nem komplementerek.

Az 1. Táblázat azt foglalja össze, hogy melyik nukleotid képes anti-paralell bázispárokat vagy paralell bázispárokat létrehozni egy meghatározott cél nukleotiddal.

1. TÁBLÁZAT

Cél nukleotid (a)	Anti-paralell domén nukleotid (a)	Paralell domén nukleotid (a)
G	C vagy U	C
A	T vagy U	T vagy U
T	A	C vagy G
C	G	C, T vagy U
U	A vagy G	C, G, T vagy U

(a) vagy egy megfelelő analóg

Két komplementer egyszáлу nukleinsav stabil kettős hélix (duplex) formát hoz létre, ha a szálak kötődnek vagy hibridizálódnak egymással a tipikus Watson-Crick módon pl. anti-paralell GC és AT bázis párokon keresztül. A találmányhoz stabil duplex és stabil triplex képződést értünk el, amikor a P és AP domének elegendő komplementaritást mutattak a cél szekvenciával, a cirkuláris oligonukleotid és a cél molekula közötti stabil kö-

tődés létrehozásához. Stabil kötődés akkor fordul elő, amikor egy oligonukleotid detektálhatóan kötve marad a célhoz a kívánt körülmények között.

A nukleinsavak közötti komplementaritás az a fok, amilyen mértékig az egyik nukleinsav szál bázisai hidrogén kötésekkel vagy bázis párokkal a második nukleinsav szál bázisaihoz kötődnek. Azonban, a komplementaritás néha kényelmesen leírható százalékosan is, pl. az olyan nukleotidok arányaként, melyek bázispárokat hoznak létre a két szál között vagy egy specifikus régióon belül, vagy a két szál doménjein belül. A találmányban a kielégítő komplementaritás azt jelenti, hogy elegendő számú bázispár létezik a cél nukleinsav és cirkuláris oligonukleotid P és/vagy AP doménjei között a detektálható kötődés eléréséhez. Továbbá a P domén és a cél valamint az AP domén és a cél közötti komplementaritás mértéke nem kell, hogy azonos legyen. Ha a képződött bázispárok arányában fejezzük ki, vagy mérjük, a komplementaritás foka a 30-40%-os komplementaritástól a teljes, azaz a 100 %-os komplementaritásig változhat. Általánosságban a komplementaritás teljes mértéke a P vagy az AP domén és a cél között előnyösen legalább 50 %-os. Azonban a P domén céllal való komplementaritása néha kisebb lehet mint az AP domén céllal való komplementaritása, pl. a P domén 30 %-os komplementaritást mutat a céllal, míg az AP domén lényegesen nagyobb komplementaritást mutathat, pl. 50% - 100% komplementaritást.

Továbbá a kérdéses cirkuláris oligonukleotid és megfelelő céljai közötti detektálható kötést biztosító komplementaritási

fok függ azoktól a körülményektől, melyek alatt a kötés létrejön. Jól ismert, hogy a nukleinsav szálak közötti kötés pl. a hibridizáció a két szekvencia közötti eltérés fokán túl más tényezőktől is függ. Az ilyen tényezők közé tartoznak a régió GC tartalma, a hőmérséklet, az ionerősség a formamid jelenléte és a jelenlevő ellentétes töltésű ionok típusa. Ezen körülményeknek a kötésre kifejtett hatása jól ismert a tudomány e területén képzett szakember számára. Továbbá a körülményeket gyakran határozzák meg az alkalmazási módok. Például, ha egy cirkuláris oligonukleotidot alkalmazunk in vivo formamid nem lesz jelen, és az ionok erőssége valamint az ellentétes töltésű ionok típusa és a hőmérséklet a fiziológiai körülményeknek felel meg. A kötési körülmények in vitro manipulálhatók, az oligonukleotidok alkalmazhatóságának optimalizálása céljából. A kötési körülmények megállapítását is magába foglaló mennyiségi és minőségi szempontok átfogó módszerét, mely lehetővé teszi a tudomány e területén jártas szakember számára, hogy a kívánt körülmények közötti használathoz megfelelő oligonukleotidokat szerkesszen, Beltz et al., (1983, Methods Enzymol. 100:266-285) és Sambrook et al., biztosítják.

Igy a találmányhoz, egy a tudomány e területén átlagosan képzett szakember is könnyen tervezhet a kérdéses cirkuláris oligonukleotidok P és AP doménjeihez egy nukleotid szekvenciát, mely elegendő komplementaritást mutat ahhoz, hogy detektálhatóan kötődjön cél szekvenciájához. A szóhasználat szerint a "kötés" vagy a "stabil kötés" kifejezések azt jelentik, hogy az oligo-

nukleotid elegendő mennyisége van a célhoz kötött vagy hibridizált állapotban ahhoz, hogy a kötés detektálható legyen. A kötés a cél:cirkuláris oligonukleotid komplex fizikai vagy funkcionális tulajdonságai alapján detektálható.

Egy cél és egy oligonukleotid közötti kötés a tudomány e területén jártas szakember számára ismert bármely módon detektálható, ideértve mind a funkcionális, mind fizikai kötési vizsgálatokat. Funkcionálisan a kötés úgy detektálható, hogy meghatározzuk, hogy a kötés megfigyelhető hatással van-e a bioszintetikus folyamatokra (pl. DNS replikáció, RNS transzkripció, fehérje transzláció stb.).

A komplementer DNS vagy RNS szálak kötődésének fizikai detektálási módszerei jól ismertek a tudomány e területén és olyan módszerek tartoznak ide, mint a DN-áz I vagy kémiai footprinting gélfuttatás és affinitás hasítási vizsgálatok, valamint a fény abszorpciós detektálási eljárások. Például egy az egyszerűsége és megbízhatósága miatt széleskörűen elterjedt módszer magába foglalja egy a cél nukleinsavat és az oligonukleotidot tartalmazó oldat 220 és 300 nm hullámhosszon a fokozatosan emelt hőmérséklet hatására mért fényabszorpcióban bekövetkezett változásának megfigyelését. Ha az oligonukleotid kötődött céljához, egy hirtelen növekedés figyelhető meg az abszorpcióban egy jellemző hőmérsékletnél, ahogy az oligonukleotid és a cél disszociál vagy megolvad.

Egy oligonukleotid és cél nukleinsava közötti kötést gyakran jellemzik azzal a hőmérséklettel, melyen az oligonukleotid 50

%-a leolvad céljáról. Ez a hőmérséklet az olvadási hőmérséklet (T_m). A magasabb T_m egy erősebb vagy egy sokkal stabilabb komplexet jelent egy alacsonyabb T_m -mel rendelkező komplexhez képest. Egy duplex stabilitása fokozódik a G:C tartalom növekedésével, mivel a G:C bázispár három hidrogén kötéssel rendelkezik, míg az A:T bázispár csupán kettővel. A találmány cirkuláris oligonukleotidjai további hidrogénkötéseket biztosítanak és ezáltal sokkal nagyobb stabilitást, mivel két kötő domén is - a P és az AP domének - elérhető egy egyedüli cél nukleinsavhoz való kötődéshez. Ezért a céljához kötődő cirkuláris oligonukleotid révén létrehozott triplex magasabb T_m -nél kellene, hogy olvadjon, mint egy lineáris oligonukleotid és egy cél által létrehozott duplex.

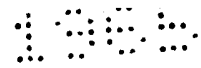
A cirkuláris oligonukleotidok egy nukleinsav célhoz hidrogénkötéseken keresztül kötődnek, melyek a kötő domén nukleotidjai és a cél között jönnek létre. Az AP domén Watson-Crick-féle hidrogénkötéseket létrehozva tud kötődni (1. ábra). A P domén a cél nukleotidokhoz a nem Watson-Crick-féle hidrogénkötések létrehozásával képes kötődni (pl. 1. ábra és 1. Táblázat). Amikor a DNS vagy az RNS különböző szálaiból származó két nukleotid az itt megadott bázispárosodási szabályok szerint hoz létre hidrogén kötéseket egy bázispár vagy egy duplex jön létre. Ha egy AP doménből származó nukleotid és egy P doménből származó nukleotid kötődik ugyanahhoz a cél nukleotidhoz egy bázis triád jön létre.

Egy nukleinsav komplementer cél szálával való paralell domén bázis párosodása termodinamikai szempontból kevésbé előnyös mint a Watson-Crick-féle bázis párosodás; azonban, amikor mind a

paralell és az antiparalell párosodási módok jelen vannak egy egyedüli molekulában igen stabil komplexek jöhetnek létre. Így egy cirkuláris oligomer két ellentétes doménje egy centrális céllal rendelkező komplexet hoz létre, triplex strukturát mutatva, vagy egy hármass helikális komplexet, melyet a kör két hurkos vége köt össze. Például ez az elrendezés lehetővé teszi, hogy négy hidrogénkötés jöjjön létre ha két timin kötődik egy cél adeninhez és 5 hidrogén kötés jöhet létre, ha két citozin kötődik egy cél guaninhoz.

Továbbá a P és az AP domének kötési tulajdonságai miatt a találmány cirkuláris oligonukleotidjai szelektivebbek egy adott céllal szemben, mint a megfelelő lineáris oligonukleotidok. Ehhez a fokozott szelektivitáshoz legalább két tényező járul hozzá. Először, a találmány cirkuláris oligonukleotidjai kétszer kötődnek ugyanahhoz a központi cél szálhoz. Így két domén vesz részt egy cél kiválasztásában. Másodsor, egy C+G-C triádban a citozin protonizációja csak akkor szerencsés, ha ez a triád létrejön és a további proton pozitív töltést ad a triádnak. Ez a pozitív töltés csökkentheti a három foszfodiészter gerinc juxta- pozíciójából adódó negatív töltésű taszítást.

A lineáris oligonukleotidoktól eltérően a találmány cirkuláris oligonukleotidjai elmozdithatják a kettős szálú cél egyik szálát olyan körülmények között, ahol a kettősszálú cél denaturációja termodinamikai szempontokból nem kedvező. A lineáris oligonukleotidok nem rendelkeznek azzal a képességgel, hogy elmozdítsák egy duplex egyik szálát. Például, egy kettősszálú cél



felezési ideje egy komplementer lineáris oligonukleotid jelenlétében kb. 58 perc, olyan hosszú, hogy a lineáris oligonukleotid kevésbé használható a duplex cél egyik szálának elmozdítására. Azonban egy kettős szálú cél felezési ideje a találmány cirkuláris oligonukleotidjainak jelenlétében csupán 30 sec. Ezért a találmány cirkuláris oligonukleotidjai nemcsak arra használhatók, hogy az egyszálú cálokat kössék, hanem arra is, hogy kettős szálú célt kössenek. Ennek megfelelően, mivel mind az egyszálú, mind a kettősszálú nukleinsavak szolgálhatnak a cirkuláris oligonukleotidok céljaiként ezek a cirkuláris oligonukleotidok jobban hasznosíthatók, mint a lineáris oligonukleotidok. Például a találmány cirkuláris oligonukleotidjai a biológiai folyamatok jobb szabályozói in vivo és jobb in vitro diagnosztikai próbák mint a megfelelő lineáris oligonukleotidok.

Ha a nukleinsav templát tulnyulik a központi három szálú cél:kör komplexen, egy P vagy egy AP domén kötődhet duplexként a hármass standard komplex bármelyik oldalához. Ily módon egy cél:cirkuláris oligonukleotid komplex lehet részben kettősszálú és részben hármass szálú, ahol a kettős szálú részek P:cél duplexek lehetnek, kötött AP nukleotidok nélkül, vagy AP:cél duplexek kötött P nukleotidok nélkül. Ez az elrendezés egy lépcsős elrendezés.

Az összes P domén, AP domén és cél rendelkezhet függetlenül 2 - 200 nukleotiddal, előnyösen 4 - 100 nukleotiddal. A leginkább előnyben részesített hosszúság 6 - 36 nukleotidot jelent.

A P és AP doméneket hurok domének választják el, melyek



függetlenül rendelkezhetnek kb. 2 - 2000 nukleotiddal. Az előnyben részesített hurok hosszúság 3 - 8 nukleotid, a leginkább előnyben részesített 5 nukleotid hosszú.

A találmány szerint a hurok domének nem kell, hogy nukleotid bázisokból álljanak. A nem nukleotid-hurkok a cirkuláris oligonukleotidok előállítását olcsóbbá tehetik. Még jelentősebb, hogy a nem-nukleotid hurkokkal rendelkező cirkuláris oligonukleotidok sokkal ellenállóbbak a nukleázokkal szemben, ezért hosszabb biológiai felezési idővel rendelkeznek, mint a lineáris oligonukleotidok. Továbbá, a töltéssel nem rendelkező hurkok, vagy a pozitív töltésű hurkok elősegíthetik a kötődést megszüntetve a negatív töltésű taszítást a hurok és a cél között. Továbbá, a töltés nélküli, vagy a hidrofób nem-nukleotid hurkokkal rendelkező cirkuláris oligonukleotidok könnyebben átjutnak a celluláris membránokon, mint a nukleotid hurkokkal rendelkező cirkuláris oligonukleotidok.

Az itt szemléltettek szerint a nem-nukleotid hurok domének alkil láncokból polietilén glikol vagy oligoetilén glikol láncokból vagy más láncokból állhatnak a szükséges szterikus vagy hajlékonysági tulajdonságokat biztosítva, melyek összeegyeztethetők az oligonukleotid szintézissel. Ezen láncok hossza megegyezik kb. 2-2000 nukleotid hosszával, előnyösen 3 - 8 nukleotid hosszúságúak. Ezen láncok esetében a legelőnyösebb lánchosszuság 5 nukleotiddal egyezik meg.

A nem-nukleotid hurok domének előnyben részesített láncai polietilén glikol vagy oligoetilén glikol láncok. Előnyösen az

oligoetilén glikol láncok 5 nukleotid hosszúságú lánchoz hasonló láncokból állnak, pl. előnyösen egy pentaetilén glikol, egy hexaetilén glikol vagy egy heptaetilén glikol láncból.

A cirkuláris oligonukleotidok egyszáru DNS-ak vagy RNS-ak, nukleotidjaiban guanin (G), adenin (A), timin (T), citozin (C) vagy uracil (U) bázisokkal, vagy bármely olyan nukleotid analóggal mely képes hidrogén kötések létrehozására paralell vagy anti-paralell módon. A nukleotid analógok közé tartoznak a következők: pseudocitidin, izopseudocitidin, 3-aminofenil-imidazol, 2'-O-metil-adenozin, 7-deazadenozin, 7-deazaguanozin, 4-acetilcitidin, 5-(karboxi-hidroxilmetil)-uridin, 2'-O-metilcitidin, 5-karboximetilaminometil-2-tioridin, 5-karboximetilamino-metiluridin, dihidrouridin, 2'-O-metiluridin, 2'-O-metil-pseudouridin, beta,D-galaktozilqueozin, 2'-O-metilguanozin, inozin, N6-izopentetiladenozin, 1-metiladenozin, 1-metil-pseudouridin, 1-metilguanozin, 1-metilinozin, 2,2-dimetilguanozin, 2-metiladenozin, 2-metilguanozin, 3-metilcitidin, 5-metiluridin, N6-metil-adenozin, 7-metilguanozin, 5-metilamino-metiluridin, 5-metoxiaminometil-2-tiouridin, beta-D-mannosilqueosin, 5-metoxikarbonilmetiluridin, 5-metoxiuridin, 2-metil-tio-N6-izopentetiladenozin, N-(9-beta-D-ribofuranozil-2-metiltiopurin-6-il)-karbamoil) treonin, N-(9-beta-D-ribofuranozilpurin-6-il)-metilkarbamoil)treonin. Ha lehetőség van rá vagy ribóz vagy dezoxi-ribóz alkalmazható ezekkel az analógokkal. Alfa-anomerikus konformációban levő nukleotid bázisok is alkalmazhatók a találmány cirkuláris oligonukleotidjaiban.

Az előnyben részesített nukleotid analógok nem módosított G, A, T, C és U nukleotidok; pirimidin analógok alacsonyabb alkil, alacsonyabb alkoxi, alacsonyabb alkilamin, fenil, vagy alacsonyabb alkil helyettesítésű fenil csoportokkal a bázis 5-ös pozíciójában, és purin analógok hasonló csoportokkal a bázis 7-es vagy 8-as pozíciójában. A különösen előnyben részesített nukleotid analógok az 5-metilcitozin, az 5-metiluracil, a diaminopurin és a ribóz vagy a dezoxiribóz helyett 2'-O-metilribóz egységekkel rendelkező nukleotidok. Ahogy a találmányban alkalmazzuk az alacsonyabb alkil, az alacsonyabb alkoxi és az alacsonyabb alkilamin 1-6 szénatomot tartalmazhat és lehet egyenes vagy elágazó láncu. Ezek közé a csoportok közé a következők tartoznak: metil, etil, propil, izopropil, butil, izobutil, terciér butil, amil, hexil és a hasonlók. Az előnyben részesített alkil csoport a metil csoport.

A cirkuláris oligonukleotidokat először lineáris oligonukleotidokként hozhatjuk létre és ezután alakíthatók át kör alakúvá. A lineáris oligonukleotidokat a DNS vagy RNS oligonukleotidok előállításánál ismert számos eljárás bármelyikével elő lehet állítani. Például ilyen eljárások közé tartoznak az enzimatiszintézis és a kémiai szintézis.

A DNS oligonukleotid szintézis enzimatiszintézis módszerei gyakran alkalmazzák a Klenow-féle, a T7, a T4 a Tag vagy az E. coli DNS polimerázokat a Sambrook et al. által leírtak szerint. Az RNS oligonukleotid szintézis enzimatiszintézis módszerei gyakran alkalmazzák az SP6, a T3 vagy a T7 RNS polimerázt a Sambrook et al.

által leírtak szerint. Reverz transzkriptáz szintén alkalmazható az RNS-ből történő DNS szintézishez (Sambrook et al.). Az oligonukleotid enzimatis éelőállításához egy olyan templat nukleinsavra van szükség, mely vagy kémiaailag szintetizálható vagy mRNS-ként genom DNS-ként, klónozott genom DNS-ként, klónozott cDNS-ként vagy más rekombináns DNS -ként nyerhető. A DNS oligonukleotid szintézis enzimatis módszerei közül néhányban szükség lehet további primer oligonukleotidokra, melyek kémiaailag szintetizálhatók. Végül a lineáris oligonukleotidok PCR technikákkal is előállithatók ahogy azt pl. Saiki et al. (1988, Science 239:487) leírják.

A lineáris oligonukleotidok kémiai szintézise jól ismert a tudomány e területén és oldat vagy szilárd fázisu technikákkal végezhető el. Továbbá meghatározott szekvenciával rendelkező lineáris oligonukleotidok beszerezhetőek a kereskedelembe is, vagy előállithatók a számos különböző eljárás bármelyikével, ideértve a foszforamidit, a foszfit triészter, a H-foszfónát és foszfortriészter módszereket, melyek automatizált szintézises módszerek. A választott szintézises módszer függhet a kívánt oligonukleotid hosszúságától és az ilyen jellegű választások a tudomány e területén átlagosan képzett szakember képességein belül vannak. Például a foszforamidit és foszfit triészter módszer 175 vagy még több nukleotidot tartalmazó oligonukleotidokat hoz létre, míg a H-foszfónát módszer a 100-nál kevesebb nukleotidból álló oligonukleotidok esetében működik jól. Ha módosított bázisok fordulnak elő az oligonukleotidban, és előnyö-

sen, ha módosított foszfodiészter kötéseket alkalmazunk, akkor a szintetikus eljárások megváltoztathatók szükségszerűen az ismert eljárásoknak megfelelően. Ebben a tekintetben Uhlmann et al. (1990 Chemical Reviews 90:543-584) tájékoztatást nyújt és körvonalaz olyan eljárásokat, melyek a módosított bázisokkal és módosított foszfodiészter kötésekkel rendelkező oligonukleotidok előállítására alkalmasak.

A szintetikus lineáris oligonukleotidok poliakrilamid gélelektroforézissel vagy a számtalan kromatográfiás módszer bármelyikével tisztíthatók, ideértve a gélkromatográfiát és a HPLC módszert. Egy nukleotid szekvencia hitelesítésére az oligonukleotidok alávetethetők az ismert eljárások bármelyikével végzett DNS szekvenálásnak ideértve a Maxam és Gilbert-féle szekvenálási módszert, a Sanger-féle szekvenálási módszert, a kapilláris elektroforetikus szekvenálási módszert, a vándorló pont szekvenálási eljárást, vagy a Hybond papirhoz kötött oligonukleotidok szelektív kémiai degradációs eljárását alkalmazva. A rövid oligonukleotidok szekvenciái analizálhatók plazma deszorpciós tömeg spektroszkópiával vagy gyors atom bombázással (McNeal, et al., 1982, J.Am.Chem.Soc. 104:976; Viari et al., 1987, Biomed. Environ. Mass Spectrom. 14:83; Grotjahn et al., 1982, Nuc.Acid Res. 10:4671). Az RNS oligonukleotidokhoz is beszerezhetőek szekvenálási módszerek.

A találmány számos módszert biztosít a cirkuláris oligonukleotidok lineáris prekursorokból (pl. előkörökből) történő előállítására, ezek közé tartozik az a módszer, melyben egy előkört

szintetizálunk majd hozzákapcsoljuk egy vég kötődésű oligonukleotidhoz, és az előkör két végét csatlakoztatjuk. Egy oligonukleotid két végének csatlakoztatására szolgáló bármely módszert megfontolunk a találmányban, ideértve az olyan kémiai módszereket, melyek pl. olyan ismert párosító anyagokat alkalmaznak, mint a BrCN, N-cianoimidazol $ZnCl_2$, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid és más karboimidek és karbonil diimidazolok. Továbbá, egy előkör végei kapcsolhatók egy 5'foszfát és egy 3'hidroxi, vagy egy 5'hidroxi és egy 3'foszfát kondenzálásával.

A találmánnyal összhangban egy egyszerű egylépéses kémiai módszert is biztosítunk a kérdéses cirkuláris oligonukleotidok vagy körök előkörökből való megszerkesztéséhez. Egy olyan oligonukleotidot szerkesztünk meg, mely a cél nukleinsav szekvenciájával azonos szekvenciával rendelkezik; ez a vég-kapcsolódású oligonukleotid. Egy DNS vagy egy RNS lineáris előkört szintetizálunk kémiai vagy enzimatis uton és foszforiláljuk az 5' vagy a 3' végén, ismét vagy kémiai vagy enzimatis uton. Az előkört és a vég-kapcsolódású oligonukleotidot összekeverjük és kettős száluvá tesszük, így létrehozva egy olyan komplexet, melyben az előkör 5' és 3'vége szomszédos, ahogy azt a 2. ábra is mutatja. Előnyben részesített, ha az előkör végei egy kötő doménen belül található és nem a hurok doménben, előnyösen az anti-paralell kötő doménen belül a paralell doménen belüli elhelyezkedés helyett. Továbbá, előnyös, ha az előkör az 5'-foszfát helyett egy 3'-foszfáttal rendelkezik. A komplex képződés után, a végek egy

kondenzációs reakción mennek keresztül pufferolt vizes oldatban, mely kétvegyértékű fém ionokat és BrCN-t tartalmaz kb pH=7.0 értéken. Egy előnyben részesített megvalósulásban a puffer imidazol-Cl 7.0 pH értéken olyan kétvegyértékű fém ionokkal, mint a Ni, Zn, vagy a Co. Nikkel a leginkább előnyben részesített kétvegyértékű fém. A kondenzáció kb 6-48 óra elteltével következik be 4-37 C hőmérsékleten való inkubálás után. Más kétvegyértékű fémek, mint a Cu, Pb, Ca és Mg szintén használhatók.

Az RNS cirkularizáció más módszerével előnyösen a hurok doménben levő megfelelő nukleotid szekvenciákat egy RNS oligonukleotidba építjük be, az ön-összeépülés elősegítése céljából, mivel a cirkuláris termék a megfelelő körülmények között jön létre (Sugimoto et al., 1988, Biochemistry 27:6384-6392).

Az enzimatikus körzárás szintén alkalmazható DNS ligáz vagy RNS ligáz használatával az enzim számára megfelelő körülmények között.

A cirkuláris oligonukleotidok templatjaiktól denaturáló gélelektroforézissel vagy olvasztással különíthetők el, melyet gélelektroforézis követ, vagy más megfelelő kromatográfiás vagy elektroforézises módszerrel. A kinyert cirkuláris oligonukleotid ezután tovább tisztítható standard technikákkal, ahogy a találmány módszereiben való alkalmazáshoz szükséges.

A találmány szemlélteti a kérdéses oligonukleotid származtatását, vagy kémiai módosítását olyan kémiai csoportokkal, melyek elősegítik a celluláris felvételt. Például egy koleszterol

egység oligonukleotidhoz való kovalens kötődése 5-10-szeresére fokozhatja a celluláris felvételt, mely viszont 10-szeresére növelheti a DNS kötődést (Boutorin et al., 1989 FEBS Letters 254:129-132). Celluláris receptorokként más ligandumok is hasznosíthatók lehetnek a celluláris felvétel fokozásához, pl. az inzulin, transferrin és mások. Hasonlóképpen, az oligonukleotidok poli-L-lizinnel való származtatása segítheti a sejtek által történő oligonukleotid felvételt (Schell, 1974, Biochem. Biophys. Acta 340: és Lemaitre et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:648). Bizonyos fehérje hordozók szintén elősegítik a celluláris felvételt, ideértve pl. a szérum albumint, a nukleáris fehérjéket, melyek a mag felé irányuló transzporthoz szükséges jelekkel rendelkeznek, és virális, vagy bakteriális fehérjéket, melyek képesek áthatolni a sejt membránon. Ezért a fehérje hordozók hasznosak, ha kapcsolatban vannak, vagy kötődnek a találmány cirkuláris oligonukleotidjaival. Ennek megfelelően a találmány szemlélteti a kérdéses cirkuláris oligonukleotidok olyan csoportokkal való származtatását, melyek elősegítik a celluláris felvételt; az ilyen csoportok közé tartoznak a következők: szénhidrogének és nem-poláris csoportok, koleszterol, poli-L-lizin és fehérjék, akár csak más aril vagy szteroid csoportok és polikationok, melyek analóg előnyös hatással rendelkeznek, mint pl. a fenil vagy naftil csoportok, quinolin, antracén vagy fenantracén csoportok, zsírsavak, zsíralkoholok és sesquiterpének, diterpének és szteroidok.

A találmány továbbá szemlélteti a kérdéses oligonukleotidok

olyan anyagokkal való származtatását, melyek hasítani képesek, vagy módosítani tudják a cél nukleinsavat vagy más nukleinsav szálakat, melyek kapcsolatban állnak a céllal vagy melyek annak közelében találhatóak. Például virális DNS vagy RNS tehető a megsemmisítés céljává anélkül, hogy kárt okoznánk a celluláris nukleinsavban azáltal, hogy a cél nukleinsavval komplementer cirkuláris oligonukleotidot adunk, mely kötődik egy anyaghoz, mely a kötődésen keresztül hasítani tudja vagy inaktívává tudja tenni a virális DNS-at vagy RNS-at. A nukleinsavakat rongáló anyagok - melyeket a találmány a hasítási vagy módosító aktivitásuk miatt szemléltet - közé tartoznak pl. az RNS és DNS nukleázok, a ribozimek, melyek hasítani tudják az RNS-at, az azidoproflavin, az akridin, az EDTA/Fe, a kloroetilamin, az azidofenacil és a fenentrolin/Cu. Uhlmann et al. (1990, Chemical Reviews 90: 543-584) további információt biztosítanak az ilyen anyagok használatáról, valamint olyan oligonukleotid származtatási módszereket, melyek a kérdéses cirkuláris oligonukleotidok használatához adaptálhatók.

A kérdéses cirkuláris oligonukleotidok olyan csoportokkal való származtatása, melyek elősegítik a celluláris felvételt vagy a cél kötését, valamint a nukleinsav rongáló anyagokkal vagy drogokkal való származtatás elvégezhető a tudomány e területén képzett szakember számára ismert eljárások bármelyikével. Továbbá, a kívánt csoportok hozzáadhatók a nukleotidokhoz, az oligonukleotidok szintézise előtt. Például ezek a csoportok köthetők a T vagy a C 5-pozícióihoz és ezek a módosított T és C

nukleotidok használhatók a találmány cirkuláris oligonukleotidjainak szintetizálásához. Továbbá, a szelektált nukleotidok származtatása lehetővé teszi a csoport cirkuláris oligonukleotid szelektált doménjébe való beépítését. Például, bizonyos esetekben előnyös, ha a csoportokat a hurokba építjük be, ahol a csoport nem hat a kötésre, vagy az AP vagy P doménbe, a cél nukleinsav hasításának vagy módosításának elősegítése céljából.

A találmánnyal összhangban, a cirkuláris oligonukleotidok foszfodiészter gerincének módosítását szintén szemléltettük. Az ilyen módosítások elősegíthetik a sejtek oligonukleotid felvételét, vagy meghosszabbíthatják az ilyen nukleotidok biológiai felezési idejét. Például, a cirkuláris oligonukleotidok sokkal gyorsabban juthatnak be a sejtbe, ha az internukleotid foszfátról a negatív töltést eltávolítjuk. Ezt úgy érhetjük el, hogy a foszfát negatív töltésű oxigénjét egy metil csoportra, egy aminra cseréljük vagy ha a foszfodiészter kötést egy foszfortriészter kötésre cseréljük úgy, hogy a negatív töltésű foszfát oxigénhez egy alkil csoportot adunk. Másik megoldásként, a foszfát atomok közül - melyek résztvevői a normális foszfodiészter kötésnek - egyet vagy többet lecserélünk. Például NH-P, CH₂-P vagy S-P kötések hozhatók létre. Ennek megfelelően a találmány foglalkozik a metilfoszfonát, a foszforotioát, a foszforoditioát, a foszfortriészter és a foszfor-boron kötések alkalmazásával (Sood *et al.*, 1990, J. Am. Chem. Soc. 112:9000). A foszfodiészter csoport siloxán, karbonát, acetamidát, vagy tioéter csoportokkal helyettesíthető. Ezek a módosítások szintén fokozhatják a kérdéses

oligonukleotid nukleázokkal szembeni rezisztenciáját. A módosított foszfodiészter kötésű oligonukleotidok szintézisére szolgáló módszerekről Uhlmann et al., adnak áttekintést.

A nem-nukleotid hurkokkal rendelkező cirkuláris oligonukleotidok az ismert módszerek bármelyikével előállíthatók. Például, Durand et al. (1990, *Nucleic Acids Res.* 18: 6353-6359) szintetikus módszereket biztosítanak a nem-nukleotid láncok DNS-hoz való kötéséhez. Az ilyen eljárások általában adaptálhatók egy lineáris oligonukleotid prekursor automatizált szintézisének lehetővé tételéhez, melyet ekkor a találmány cirkuláris oligonukleotidjának előállításához lehet felhasználni. Általánosságban, a standard DNS szintézisben a nukleotidokkal reakcióba lépő csoportok, pl. a foszforamidit, H-foszfónát, dimetoxitritil, monometoxitritil és a hasonlóak a nem nukleotid láncok végeihez helyezhetők és a P és AP domének végeinek megfelelő nukleotidok ezekhez köthetők.

Továbbá, különböző nukleotid cukrok építhetők a találmány oligonukleotidjaiba. Például, RNS oligonukleotidok alkalmazhatók, mivel az RNS:DNS hibridek sokkal stabilabbak, mint a DNS:DNS hibridek. További kötési stabilitás biztosítható a találmány cirkuláris oligonukleotidjaiban való 2'-O-metil ribóz alkalmazásával. Foszforamidit kémia alkalmazható az RNS oligonukleotidok szintetizálásához a leirtak szerint (Reese, C.B. In: Nucleic Acids & Molecular Biology; Springer-Verlag: Berlin, 1989; Vol. 3, p. 164; és Rao et al., 1987, *Tetrahedron Lett.* 28:4897).

Az RNS 2'-O-metil-oligoribonukleo-szakaszok és a DNS oligo-

nukleotidok szintézise csupán kevésben tér el. Az RNS 2'-O-metiloligonukleotidok az amidit, H-foszfónát vagy foszfotriészter módszerek kisebb változtatásaival állíthatók elő (Shibahara et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15: 4403; Shibahara et al., 1989, Nucleic Acids Res. 17:239; Anoue et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15:6131).

A találmány egy másik megvalósulásában, a cirkuláris oligonukleotidok felgyorsíthatják a kettősszálu nukleinsav célok disszociációját. Ezért a kettős szálu nukleinsav célokat nem kell kitenni denaturáló körülmények közé, a szóbanforgó cirkuláris oligonukleotidokhoz való kötődést megelőzően. Így a cirkuláris oligonukleotidok kötődhetnek mind az egyszálu, mind a kétszálu nukleinsav célokhoz szélesebb variációju körülmények között, előnyösen fiziológiai körülmények között. A találmány cirkuláris oligonukleotidjai néhány nagyságrenddel gyorsabbak a duplex nukleinsav szálak elmozdításának gyorsításában, mint a megfelelő lineáris oligonukleotidok.

A jelen találmány ezért egy eszközt biztosít egy kettősszálu nukleinsav cél egyik szálának elmozdítására a kérdéses cirkuláris oligonukleotidok egyikével anélkül, hogy ezt megelőzné a kettősszálu nukleinsav cél denaturációja. Így a találmány biztosít egy a kettősszálu nukleinsav célban előforduló egyik szál elmozdítására szolgáló módszert, azáltal, hogy a célt kapcsolatba hozzuk a kérdéses cirkuláris oligonukleotidok egyikével egy meghatározott ideig és olyan körülmények között, melyek lehetővé teszik a cirkuláris oligonukleotid célhoz való kötődését. A

kérdéses cirkuláris oligonukleotidok célja lehet egy kettősszálú nukleinsav, akár RNS, vagy DNS, mely nem esett át denaturáláson pl. hőkezelés vagy alkalikus pH-nak való kitevés alkalmazása következtében.

Az alkalmazás szerint, a szátlelmozdításhoz szánt nukleinsavak jelen lehetnek egy organizmusban, vagy egy olyan mintában, mely tartalmaz egy tiszta vagy nem-tiszta nukleinsav készítményt, egy szövet darabban, egy prokariótában vagy egy eukarióta kenetben, egy kromoszóma tömegben és hasonlókban. Továbbá, a jelen cirkuláris oligonukleotidokkal végzendő szátlelmozdításhoz használt nukleinsav célok magukba foglalnak virális, bakteriális, gomba, vagy emlős nukleinsavakat.

A találmánynak megfelelően, a cél szál elmozdítással való denaturálásához hatékony körülmények, melyek ezután lehetővé teszik a kötődést, magukba foglalják a megfelelő cirkuláris oligonukleotid - cél nukleinsav arányt. Ezenkívül, a találmányban való alkalmazás szerint a megfelelő cirkuláris oligonukleotid : cél arány kb 1:100, előnyösen 1:50.

Továbbá, az alkalmazás szerint, az oligonukleotiddal végzett szál elmozdítással elért kettősszálú nukleinsav denaturálásához hatékony idő a találmány szerint kb 1 perc - kb. 16 óra.

Egy cirkuláris oligonukleotid egy duplex céllal először a P doménhez való kötődéssel kapcsolódhat. Az ilyen P doménhez való kötődés juxta pozícióba hozza az AP domén nukleotidjait, hogy versenyezzenek a cél nukleotidhoz való Watson-Crick-féle kötés létrehozásáért. Ez a P domén elő-kapcsolódás, melyet az AP domén

nukleotid Watson-Crick-féle kötésért való versenye követ, létrehozhatja a cirkuláris oligonukleotidok által létrehozott szál elmozdításban megfigyelt gyorsítás bázisait.

Összefoglalva, a találmány cirkuláris oligonukleotidjai három fontos tulajdonsággal rendelkeznek, melyek lehetővé teszik a szál elmozdítást. Először is, a cirkuláris oligonukleotid rendelkezik az előkapcsolódás képességével, mely magas helyi koncentrációt eredményez. Másodsor, a cirkuláris oligonukleotid tartalmaz egy második (AP) kötő domént, mely versenyez egy duplex komplementer szálához való kötődésért. Végül pedig, a cirkuláris oligonukleotid nagyobb affinitással kötődik mint a duplex elmozdított szála, ezért a reakciót teljessé teszi.

A találmány foglalkozik a kérdéses cirkuláris oligonukleotidok alkalmazhatóságának variációival, melyek ezek szelektív és stabil egyszálu és kettősszálu célokhoz való kötődési tulajdonságai miatt vált lehetségessé. A felhasználási lehetőségek közé tartoznak az ezekre való korlátozás nélkül a következők: szilárd támasztékhoz kötött meghatározott szekvenciájú cirkuláris oligonukleotidok használata komplementer nukleinsavak affinitásos izolálásában; a kérdéses oligonukleotidok alkalmazása polimeráz lánc reakciókban (PCR) való szekvencia specifikus stop szignálok biztosítása céljából; drogok, drog analógok, vagy más gyógyászati anyagok cirkuláris oligonukleotidokhoz való kovalens kapcsolása a sejt típus specifikus drog szállítás lehetővé tétele számára; a cirkuláris oligonukleotidok detektálható riporter molekulával való jelölése a komplementer cél nukleinsavak loka-

lizációjának, mennyiségi meghatározásának vagy azonosításának céljából; valamint a cirkuláris oligonukleotidok celluláris vagy virális nukleinsav templáthoz való kötődése és az ezen templát által irányított bioszintézis szabályozása.

Az cirkuláris oligonukleotidok olyan szilárd támasztékokhoz kapcsolhatók, mint a szilikagél, cellulóz, nylon, valamint más természetes és szintetikus anyagokhoz, melyeket a gyöngy, szűrő és oszlopkromatográfiás gyanta előállításához szoktak használni. A nukleinsavak ilyen szilárd támasztékokhoz való kapcsolódási eljárásai jól ismertek; bármely ismert kapcsolódási eljárás a találmány megfontolásának tárgyát képezi. Egy a szilárd támasztékhoz kapcsolt cirkuláris oligonukleotid egy komplementer nukleinsav izolálására használható. A komplementer nukleinsav izolálása elvégezhető az oligonukleotid:szilárd támaszték kromatográfiás eljárásokban használt oszlopába való beültetésével. Az egyéb izolálási módszerek az oligonukleotid:szilárd támaszték oszlopba való beültetése nélkül végezhetőek el, pl. a szűrési módszerek használatával. A cirkuláris oligonukleotid:szilárd támaszték például a teljes celluláris vagy virális RNS-ből való poli(A)⁺ mRNS izolálására használható egy P és AP domén poli(dT) vagy poli(U) szekvenciával rendelkező cirkuláris oligonukleotid létrehozásával. A cirkuláris oligonukleotidok ideálisan megfelelnek az ilyen típusu alkalmazásokhoz, mivel nukleáz rezisztensek és nagyon erősen kötődnek a cél nukleinsavakhoz.

A kérdéses cirkuláris oligonukleotidok más alkalmazási

lehetőségei a polimeráz lánc reakciós (PCR) technológia területén található. A PCR technológia a primer kötő helyként alkalmazott két ismert nukleinsav szekvencia közötti nukleinsav templátban kódolt kettősszálu DNS fragment szintetizálására biztosít módszereket. Bizonyos esetekben kívánatos, hogy az egyszálu DNS fragmentet a kettősszálu fragment létrehozása előtt vagy után hozzuk létre. Ez elvégezhető pl. a találmány egy cirkuláris oligonukleotidjának a primer kötő helyek egyikéhez való kötésével vagy a primer kötő helyek között fekvő helyhez való kötésével.

A találmány foglalkozik a cirkuláris oligonukleotidok olyan alkalmazásával, melyben drogokat irányítunk specifikus cél sejtek ellen. Az ilyen irányítás lehetővé teheti bizonyos sejttípusok szelektív szétrombolását vagy erősítését pl. tumoros sejtek szaporodásának gátlása érhető így el. A különböző sejttípusok különböző géneket expresszálnak így egy bizonyos mRNS koncentrációja nagyobb lehet az egyik sejttípusban mint a másikban, az ilyen mRNS cél-mRNS a sejt típus specifikus drog szállításban, melyet drogokhoz vagy drog analógokhoz kötött cirkuláris oligonukleotid végez. A cél mRNS-at nagy koncentrációban tartalmazó sejteket a drogszállítás célpontjaivá tesszük azáltal, hogy a sejthez egy a cél mRNS-val komplementer droghoz kovalensen kapcsolódó cirkuláris oligonukleotidot adunk.

A találmány foglalkozik a kérdéses cirkuláris oligonukleotidok jelölésével, egy cél nukleinsav detektálására szolgáló próbaként való alkalmazásához. A jelölt cirkuláris oligonukleotid

próbák a cél nukleinsav szövetben, kromoszómákban vagy nukleinsavak keverékében való lokalizációjához, mennyiségi meghatározásához vagy detektálásához való diagnosztikai és analitikai hibridizációs eljárásokhoz használhatók. A találmány cirkuláris oligonukleotid próbái alapvető fejlődést képviselnek a lineáris nukleinsav próbákhoz képest, mivel a cirkuláris oligonukleotidok elmozdithatják a kettősszálu nukleinsav egyik szálát, valamint, mert az oligonukleotidok két kötő doménnel rendelkeznek, melyek nem csupán megnövekedett kötési stabilitást, de nagyobb szekvenencia szelektivitást is biztosítanak a cél:oligonukleotid interakcióban.

Egy cirkuláris oligonukleotid jelölése elvégezhető egy riporter molekulához kötött nukleotid kérdéses cirkuláris oligonukleotidba való beépítése révén. A riporter molekula a találmány szerinti alkalmazásban egy olyan molekula vagy atom, mely kémiai természete révén egy azonosítható jelet biztosít a cirkuláris oligonukleotid detektálását lehetővé téve. Ez a detektálás lehet mennyiségi vagy minőségi. A találmány foglalkozik bármely általánosan használt riporter molekulával, melyek közé a következők tartoznak: radionuklidek, enzimek, biotinok, pszoralének, fluorofórok, kelát képződésen átesett nehézfémek, és a luciferin. A leggyakrabban alkalmazott riporter molekulák akár enzimek, fluorofórok, vagy radionuklidek, melyek azokhoz a nukleotidokhoz kapcsolódnak, melyek a cirkuláris oligonukleotid szintézisben részt vesznek. Az általánosan alkalmazott enzimek közé a következők tartoznak: torma peroxidáz, alkalikus foszfatáz, glükóz

oxidáz, és béta-galaktozidáz, többek között. A specifikus enzimekkel együtt alkalmazott szubsztrátokat általában megválasztjuk, mert egy detektálható színű termék jön létre a szubsztrátra ható enzim működése során. Például a p-nitrofenil foszfát megfelelően alkalmazható alkalikus foszfatáz konjugátumokkal, a torma peroxidázhoz 1,2-feniléndiamint, 5-aminoszaliciles savat, vagy toulidint alkalmaznak általában. Az így létrehozott próbák egy specifikus DNS vagy RNS cél detektálásában alkalmazhatók pl. Southern analízisben, Northern analízisben, in situ szövet darabhoz vagy kromoszóma tömeghez való hibridizációhoz és más analitikai vagy diagnosztikai eljárásokhoz. Az ilyen hibridizációs próbákat alkalmazó módszerek jól ismertek, és az ilyen módszerekre biztosítanak példákat Sambrook és munkatársai.

A találmány cirkuláris oligonukleotidjai bármely ismert detektálási vagy diagnosztikai eljárással egyetértésben alkalmazhatók, mely egy próba cél nukleinsavhoz való hibridizációjára alapul. Továbbá, a találmány cirkuláris oligonukleotidjai bármely olyan hibridizációs eljárásban alkalmazhatók, mely mennyiségileg meghatároz egy cél nukleinsavat, pl. egy mintában levő cél nukleinsav és a jelen oligonukleotidok egyikéhez való jelölt nyomjelző cél közötti kompetitív hibridizációval. Továbbá, a cirkuláris oligonukleotid próba előállításához és egy ilyen próba hibridizációs eljárásban való alkalmazáshoz szükséges reagensek egy kitben kerülhetnek kereskedelmi forgalomba.

A kit lehet rekeszekre osztott a használat megkönnyítése céljából és tartalmazhat legalább egy első rekeszt, mely egy

cirkuláris oligonukleotid előkör prekursorának előállításához biztosít reagenseket, legalább egy második rekeszt, mely az előkör riporter molekulával való jelöléséhez biztosít reagenseket, legalább egy harmadik rekeszt, mely az előkör cirkularizációjához biztosít reagenseket, valamint legalább egy negyedik rekeszt, mely a jelölt cirkuláris oligonukleotid izolálásához biztosít reagenseket.

Ezenkívül a találmány biztosít egy templát nukleinsav izolálására szolgáló kitet is. Egy ilyen kit rendelkezik legalább egy első olyan rekesszel, mely biztosít egy olyan cirkuláris oligonukleotidot, mely komplementer a templáton belül levő céllal. Például, a templát nukleinsav lehet celluláris és/vagy virális poli(A)⁺ mRNS és a cél lehet a poli(A)⁺ farok. Azonban a találmány cirkuláris oligonukleotidjai - melyek hasznosak a poli(A)⁺ mRNS izolálásában - a poli(dT) vagy a poli(U) P és AP domén szekvenciáival rendelkeznek.

Azonkívül, a találmány biztosít olyan kiteket, melyek akkor hasznosak, amikor egy betegség diagnózisa egy specifikus, ismert cél nukleinsav detektálásától függ. Ilyen nukleinsav célok lehetnek pl. egy virális nukleinsav egy extra vagy egy hiányzó kromoszóma vagy gén, egy mutáns celluláris gén vagy kromoszóma, egy aberrálan expresszált RNS vagy mások. A kit lehet rekeszekre osztott, hogy tartalmazzon legalább egy első olyan rekeszt, mely biztosít egy riporter molekulához kötött cirkuláris oligonukleotidot és legalább egy második rekeszt, mely a riporter molekula detektálásához biztosít reagensket.

A találmány egy aspektusa egy DNS egy RNS vagy egy fehérje bioszintézist szabályozó módszert biztosít azáltal, hogy a kérdéses cirkuláris oligonukleotidok közül legalább egyet kapcsolatba hozunk ezen DNS, ezen RNS, vagy ezen fehérje nukleinsav templátjával olyan mennyiségben és olyan körülmények között, melyek kielégítőek az oligonukleotid(ok) templátban levő célszekvenciához való kötődésé(i)nek biztosításához. Az oligonukleotid(ok) és a cél közötti kötődés gátolja a templáthoz való hozzáférést ezen keresztül pedig szabályozza a nukleinsav vagy a fehérje bioszintézisét. A templáthoz való hozzáférés gátlása megvédi a bioszintézises folyamatban résztvevő proteineket és nukleinsavakat a templáthoz való kötődéstől, a templáton való mozgástól, vagy a templátban kódolt szignálok felismerésétől. Másik megoldásként, ha a templát egy RNS, a szabályozás együtt járhat a templát szelektív lebontásának lehetővé tételével. Például, a kérdéses cirkuláris oligonukleotidok által kötött RNS templátok érzékenyek az RN-áz H-val való lebontással szemben, és a szelektált RNS templát RN-áz H-val való degradációja így szabályozhatja a templát alkalmazását a bioszintézises folyamatokban.

A találmány szerinti alkalmazásban egy nukleinsav vagy egy fehérje bioszintézise magába foglal celluláris és virális folyamatokat, mint pl. a DNS replikációt, a DNS reverz transzkripciót, az RNS transzkripciót, az RNS összeállítást, az RNS poliadenilációt, az RNS transzlokációt és a fehérje transzlációt és olyanokat, melyek a DNS, az RNS és a fehérje termeléséhez vezetnek, és magába foglal egy a bioszintetikus folyamatok néhány fázisában

szereplő nukleinsav templátot.

A találmány szerinti alkalmazásban, a bioszintézis szabályozása magába foglalja a bioszintézis gátlását, megállítást, fokozását, felgyorsítást vagy elhalasztást. A szabályozás lehet direkt vagy indirekt, pl. egy DNS, RNS vagy fehérje bioszintézisét szabályozhatjuk közvetlenül egy cirkuláris oligonukleotid ezen DNS, RNS vagy fehérje templátjához való kötésével; vagy másik megoldásként a bioszintézis szabályozható indirekt módon azáltal, hogy az oligonukleotidot kötjük egy második templáthoz, mely az első DNS, RNS vagy fehérje bioszintézisében szerepet játszó fehérjét kódol.

A nukleinsav templátok lehetnek RNS-ak vagy DNS-ak és lehetnek egyszáluak vagy kettősszáluak. Míg a találmány cirkuláris oligonukleotidjai a templátban jelen levő cél csupán egyik szálához kötődnek, a kettősszálu templátok nyitva vannak a bioszintetikus folyamatok során, ezért elérhetőek lesznek a kötődéshez. Ezenkívül a találmány cirkuláris oligonukleotidjainak P doménje kötődhet egy kettős szálu célhoz és az AP domént olyan pozícióba hozhatják, hogy versengjen a cél nukleotidhoz való Watson-Crick-féle kötésért.

Egy a DNS templátról való DNS replikációt olyan fehérjék közvetítik, melyek egy replikációs origóhoz kötődnek, ahol kinyitják a DNS-at és megindítják a DNS szintézist a DNS templát mentén. A DNS replikáció találmánnyal összhangban való gátlásához olyan cirkuláris oligonukleotidokat szelektálunk, melyek egy vagy több célhoz kötődnek egy replikációs origóban. Az

ilyen kötődés megakadályozza azon fehérjék templáthoz való hozzáférhetőségét, melyek részt vesznek a DNS replikációban. Ezért a DNS replikáció kezdése és folytatása gátolt. A DNS replikáció gátlásának egy másik módszereként a DNS replikáció közvetítésében részt vevő fehérjék expresszióját gátoljuk pl. a transzkripciós vagy a transzlációs szinten.

Az RNS templátról való DNS replikációt egy RNS régiójához kötött reverz transzkriptáz közvetíti, mely egy nukleinsav primerhez kötődik maga is. Az RNS templátról való DNS replikáció gátlásához a reverz transzkriptáz vagy a primer kötődése gátolható egy cirkuláris oligonukleotid primer kötő helyhez való kötésével ily módon gátolva a helyhez való hozzáférést. Továbbá a DNS replikáció gátlása előfordulhat egy cirkuláris oligonukleotid RNS templátban levő helyéhez való kötésével, mivel az ilyen jellegű kötés gátolhatja ehhez a helyhez valamint a downstream helyekhez, pl. a cél vagy a kötő hely 3' oldalán levő helyekhez való hozzáférhetőséget.

Az RNS transzkripció elindításához az RNS polimeráz felismeri majd kötődik a DNS templáton levő specifikus start szekvenciákhoz vagy promóterekhez. Az RNS polimeráz kötődése felnyitja a DNS templátot. Vannak további transzkripciós szabályozó elemek, melyek szerepet játszanak a transzkripcióban és melyek a DNS templáton helyezkednek el. Ezek közé a transzkripciós elemek közé tartoznak az erősítő szekvenciák, az upstream elhelyezkedő aktiváló szekvenciák, represszor kötő helyek és mások. Az összes ilyen promóter és transzkripciós szabályozó elem egymagában vagy

kombinációkban a találmány cirkuláris oligonukleotidjainak célját képezi. Az ezen helyekhez kötődő oligonukleotidok blokkolhatják az RNS polimeráz és a transzkripciós faktorok templáthoz való hozzáférését, és ezen keresztül szabályozzák, azaz fokozzák, vagy csökkentik az RNS termelését, különösen az mRNS-ét és a tRNS-ét. Továbbá, a találmány oligonukleotidjai irányulhatnak a DNS templát kódoló régiójára vagy a 3'-nem-transzlált régiójára, ezáltal a transzkripció idő előtti terminációját okozva. A tudomány e területén képzett szakember számára könnyű a fenti cél szekvenciákhoz oligonukleotidokat tervezni ezen szabályozó elemek ismert szekvenciájából, a kódoló régió szekvenciákból és a konszenzus szekvenciákból.

Az RNS transzkripció fokozható, pl. egy cirkuláris oligonukleotid negatív transzkripciós szabályozó elemhez való kötésével, vagy egy olyan fehérje bioszintézisének gátlásával, mely represszálhatja a transzkripciót. A negatív transzkripciós szabályozó elemek közé tartoznak a represszor helyek vagy az operátor helyek, melyekben egy represszor fehérje kötődik és blokkolja a transzkripciót. A represszor vagy operátor helyekhez kötődő oligonukleotid blokkolhatja a represszor fehérjék kötő helyeikhez való hozzáférhetőségét, és ezen keresztül fokozza a transzkripciót.

Az eukarióta sejtekben előállított primer RNS vagy pre-mRNS számos érési folyamaton megy keresztül, mielőtt a citoplazmában transzlokálódik a fehérje transzlációhoz. A nukleuszban a pre-mRNS-ről intronok távolítódnak el az összeállítási reakciókban.

Az mRNS 5'vége úgy módosul, hogy az 5' sapka szerkezetet vegye fel, így stabilizálva az mRNS-at. Számos bázis is változáson esik át. Az mRNS 3' végén bekövetkező poliadeniláció -úgy véljük - a nukleuszból való kiszállítódással jár együtt. A találmány cirkuláris oligonukleotidjai blokkolhatják ezen folyamatok bármelyikét.

A pre-mRNS templátot a nukleuszban ribonukleoproteinek állítják össze, melyek az összeállítási pontokhoz kötődnek és a pre-mRNS-ban az intron elágazási pont szekvenciákhoz. Az 5' és 3' összeállítási pontok és az intron elágazási pontok konszenzus szekvenciái ismertek. Például, a ribonukleoproteinek összeállítási pontokhoz való kötésének gátlása, vagy az intron 5' végének az intron elágazási ponthoz való kovalens kötődésének gátlása blokkolhatja az összeállítást. A pre-mRNS templát érése ezért blokkolható az ezen helyekhez való hozzáférhetőség kivédésével, azaz, a találmány cirkuláris oligonukleotidjait köthetjük egy 5' összekötő helyhez, egy intron elágazási ponthoz, vagy egy 3' összekötő helyhez. Egy specifikus pre-mRNS templát összeállítása gátolható a cirkuláris oligonukleotidok olyan szekvenciákkal való használatával, melyek komplementerek a specifikus pre-mRNS összeállítási helyel(helyekkel) vagy az intron elágazási ponttal. Egy további megvalósulásban, az egymással összefüggő, összegyűjtött pre-mRNS templátok összeállítása gátolható, az olyan szekvencia változatokkal rendelkező cirkuláris oligonukleotidok keverékével, melyek együtt alkalmazva, komplementerek az összeállítási helyek és az intron elágazási pontok szekvenciáinak kívánt csoportjá-

val.

A poliadeniláció magába foglalja egy pre-mRNS felismerését és egy specifikus RNS endonukleázzal történő hasítását specifikus poliadenilációs helyeknél, melyet a poli(A) farok pre-mRNS 3' végéhez való hozzáadása követ. Azonban ezen lépések bármelyike gátolható a kérdéses cirkuláris oligonukleotidok megfelelő helyekhez való kötésével.

Ugy tűnik, hogy eukarióta sejtekben az RNS nukleuszból a citoplazmába való transzlokációjához egy poli(A) farokra van szükség. Így a találmánnyal összhangban egy olyan cirkuláris oligonukleotidot terveztünk, mely kötődik a poli(A) farokhoz, és ezáltal gátolja a poli(A) farokhoz való hozzáférést és gátolja az RNS transzlokációt. Egy ilyen oligonukleotidhoz mind a P és az AP domén tartalmazhat kb 10-50 tiamin maradékot, előnyösen kb. 20 maradékot. Az oligonukleotid P és AP domén különösen előnyben részesített hosszúságai kb 6-12 tiamin maradékot jelentenek.

A fehérje bioszintézis azzal kezdődik, hogy a riboszómák kötődnek egy RNS templáthoz, melyet az aminosav lánc elkezdése és meghosszabítása követ az mRNS transzlációs "olvasásá"-n keresztül. A fehérje bioszintézis vagy transzláció így gátolható a templáthoz való hozzáférhetőség gátlásával, a kérdéses cirkuláris oligonukleotidot használva a templát mRNS-ban levő célokhoz való kötődéshez. A találmány által figyelembe vett ilyen célok közé tartoznak a riboszóma kötési helyek (Shine-Delgarno szekvencia), az 5'mRNS sapka hely, az iniciációs kódon és a fehérje kódoló szekvenciák helyei. Van a fehérjéknek olyan osztálya, mely oszto-

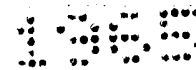
zik a nukleotid szekvencia homológ doménjein. Így az ilyen osztályba tartozó fehérjék bioszintézisének gátlását úgy érhetjük el, hogy a homológ fehérje doméneket (a kódoló szekvencián keresztül) a kérdéses cirkuláris oligonukleotidok célpontjaivá tesszük.

A bioszintézis bármely fent említett eljárással történő szabályozása számos alkalmazási lehetőséget jelent. Például, genetikai rendellenességek javíthatók ki a mutáns vagy túltermelt fehérjék termelésének gátlásával, vagy az alul-expresszált fehérjék termelésének fokozásával, olyan gének expresszállása gátolható, melyek a sejt proliferációt szabályozó faktorokat kódolnak, így a rák terjedése szabályozható és virálisan kódolt funkciók gátolhatók a virális fertőzések leküzdése céljából.

A genetikai rendellenességek néhány típusa, mely kezelhető a találmány cirkuláris oligonukleotidjaival, magába foglalja az Alzheimer kórt, az arthritis néhány típusát, a sarlósejtes anemiát és másokat. Számos virális fertőzés kezelhető a találmány cirkuláris oligonukleotidjainak használatával, melyek közé a következők tartoznak: az influenza, rhinovirus, HIV, herpes simplex, papilloma virus, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, adenovirus, vesticular stomatitis virus, rotavirus és többek között a respirációs szincitia virus által okozott fertőzések. A találmány szerint állati és növényi virális fertőzések szintén kezelhetők a kérdéses oligonukleotidok alkalmazásával.

A c-myc gén egy olyan génre példa, mely szerepet játszik a sejt proliferációjában. A c-myc expresszió gátlását bemutatták in

vitro egy olyan lineáris oligonukleotid használatával, mely komplementer volt a c-myc transzkripció start helytől 115 bázispárral upstream irányban elhelyezkedő céllal (Cooney et al., 1988, Science, 241:456-459). A SEQ ID NO:1 és SEQ ID NO:2 szekvencia azonosítási számú cirkuláris oligonukleotidok, ahogy a későbbiekben leírtuk, komplementerek a c-myc promoterral sorrendben a -131 - -120 és a -75 - -62 nukleotidoknál és ezeket a találmánnyal összhangban a c-myc expresszió gátlására biztosítjuk. Ahogy a SEQ ID NO:1 és SEQ ID NO:2 leírásainál használtuk, az N bármely nukleotid vagy nukleotid analóg lehet.



SEQ ID NO:1

1

N C T C C C C G C C C T C N

N N

N N

N N

N C T C C C C A C C C T C N

SEQ ID NO:2

1

N T C T T T T T T C T T T T C N

N N

N N

N N

N T C T T T T T T C T T T T C N

A humán immunodeficiencia vírus (HIV) egy olyan retrovirus, mely a szerzett immunhiány szindrómát okozza (AIDS). A találmány cirkuláris oligonukleotidjai eszközt biztosítanak ezen vírus replikációjának blokkolására, anélkül, hogy károsan hatnának a normális celluláris replikációra a HIV-vel fertőzött emberekben. A retrovirális genom egy egyedüli, hosszú transzkriptként íródik át, melynek egy része összeállításra kerül a virális köpeny fehérjéket kódoló RNS létrehozása céljából. A HIV fertőzés

gátlását úgy lehet elérni, hogy a HIV genomon belüli számos régióhoz kapcsolódó oligonukleotidokat tervezünk. Ezen régiók közé tartoznak a genom replikációjára irányuló funkciókat (pl. a pol vagy reverz transzkriptáz funkció), vagy a gén expressziót szabályozó funkciókat (pl. a tat, rev vagy más funkciók) kódoló régiók. Azonban a lineáris oligonukleotidokkal végzett korábbi munkák azt sugallták, hogy az összeépítési helyek, a poli(A) addíciós szignálok, a sapka vagy kezdő kódon helyek, és a riboszóma összeépülésben részt vevő helyek különösen hatékonyak lehetnek az eukarióta fehérje expresszió gátlásában. Továbbá, a retrovirális genom terminális strukturái szintén kiváló célpontjai a retrovirus termelés gátlásának, nemcsak azért, mert ezek a szerkezetek olyan szabályozó régiókat kódolnak, melyek a transzkripció és a replikáció sebességét befolyásolják, hanem, mert ezek a szerkezetek ismétlődnek és így lehetővé teszik, hogy az oligonukleotid kötődjön és blokkolja az egyes ismétlődő szakaszokhoz való hozzáférést.

Ennek megfelelően, a találmány biztosít két cirkuláris oligonukleotidot, melyek a SEQ ID NO:3 és a SEQ ID NO:4-ben kerülnek bemutatásra, ahol az N bármilyen nukleotid vagy nukleotid analóg és az Y egy pirimidin vagy egy pirimidin analóg lehet. A SEQ ID NO:3 komplementer egy HIV-1 összekötő hellyel (6039-52 nukleotidok), míg a SEQ ID NO:4 a tat gén egy részével komplementer (5974-88 nukleotidok). A SEQ ID NO:3 cirkuláris formáját az alábbiakban mutatjuk be, melyben az 1-es számú nukleotid a P doménben levő első nukleotid pl. az első sorban levő első T az

első bázisnak felel meg.

```

      1
      N T T T C Y T C G T T C G T C N
      N                                     N
      N                                     N
      N                                     N
      N T T T C G T C A T T C A T C N
  
```

A SEQ ID NO:4 cirkuláris formáját az alábbiakban mutatjuk be, ahol az 1-es nukleotid szám a P domén első nukleotidját jelenti.

```

      1
      N T C C T T C T T C Y C C T C T N
      N                                     N
      N                                     N
      N                                     N
      N T C C T T C T T C G C C T C T N
  
```

A SEQ ID NO:3 és a SEQ ID NO:4 cirkuláris oligonukleotidok gátolhatják a HIV fertőzést mind in vitro és in vivo. A cirkuláris oligonukleotid HIV fertőzés elleni hatékonyságának in vitro szkrinelésében a tudomány e területén képzett szakember számára lehetőség nyílik az oligonukleotid:cél kötés stabilitásának igazolására és az in vivo hatásosság és a kötési stabilitás felbecsülésére. Az in vitro gátlás megfigyeléséhez, a cirkuláris

oligonukleotidokat hozzáadhatjuk egy a HIV-vel fertőzött megfelelő sejtvonal szaporodási tápközegéhez. A sejtek előkezelhetők a cirkuláris oligonukleotidokkal, vagy a cirkuláris oligonukleotidok adhatók a fertőzéssel egyidőben vagy a HIV fertőzés után a sejtekhez. A fertőzés előtti vagy utáni hozzáadás lehetővé teszi annak a meghatározását, hogy vajon a kérdéses oligonukleotid sorrendben megelőzheti-e vagy csak gátolja a HIV fertőzést.

A HIV fertőzés gátlásának vagy a replikáció gátlásának mértéke számos vizsgálati módszerrel becsülhető meg, ezek közé tartoznak: az oligonukleotiddal kezelt sejtek fertőzés utáni túlélési arányának a becslése a kezeletlen sejtek túléléséhez viszonyítva, a képződött szincitiák számának becslése a kezelt és a kezeletlen HIV fertőzött sejtekben, és a kezelt és a kezeletlen sejtekben termelt virális antigén mennyiségének meghatározása.

A cirkuláris oligonukleotidok hatásosságának in vivo vizsgálata elvégezhető egy megfelelő állat gazdában, pl. transzgenikus egerekben, vagy csimpánzokban. A HIV antigének szintjei megfigyelhetők, a cirkuláris oligonukleotidok HIV replikációra kifejtett hatásának becslése céljából, és így lehetőség nyílik a betegség folyamatának követésére. Másik lehetőségként, AIDS-es vagy ARC-s humán önkéntesek kezelhetők a kérdéses cirkuláris oligonukleotidokkal, mivel az oligonukleotidok nem tűnnek citotoxikusnak. Ezen önkéntesek betegség státusza felmérhető annak meghatározása céljából, hogy a kérdéses oligonukleotidok mennyire hatásosak az AIDS fertőzés kezelésében és megelőzésében.

A találmány egy további megvalósulásában gyógyszerészeti

összetételeket biztosít, melyek tartalmazzák a kérdéses cirkuláris oligonukleotidokat egy gyógyszerészetileg elfogadható hordozóval együtt. Előnyösen, a kérdéses oligonukleotidokat kb. 0.1 ug - 100mg/kg test súly/nap terápiásan hatékony mennyiségben biztosítjuk, még előnyösebben kb. 0.1 ug - kb.10 mg/kg testsúly/nap mennyiségben a nukleinsához való kötődés céljából, a találmány által biztosított módszerekkel összhangban. A dózisok könnyen megállapíthatók a tudomány e területén átlagosan képzett szakember számára és a kérdéses gyógyszerészeti összetételben kerülhetnek formulázásra.

A találmány szerinti alkalmazásban a "gyógyszerészetileg elfogadható hordozó" a következőket foglalja magába: bármely és az összes oldószert, diszperziós közeget, burkolószereket, baktériumellenes és gombaellenes anyagokat, izotoniás és abszorpciót késleltető anyagokat és hasonlókat. Az ilyen anyagok és közegek gyógyszerészetileg aktív szubsztanciaként való alkalmazása jól ismert a tudomány e területén. Bármely hagyományos tápközeg vagy anyag, mely kompatibilis az aktív alkotórészrel, megfontolás alá esik a terápiás összetételben való használat szempontjából. Kiegészítő aktív alkotórészek is beépíthetők az összetételbe.

A kérdéses oligonukleotidok helyileg vagy parenterálisan, pl. intravénásan, intramusculárisan, intraperitoneálisan, szubkután, vagy intradermálisan, vagy ha megfelelően védve vannak a kérdéses oligonukleotidok adhatók orálisan. A kérdéses oligonukleotidok lehetnek krémbe oldatba, vagy szuszpenzióba ágyazottak a

helyi alkalmazáshoz. Az orális alkalmazáshoz az oligonukleotidok zselatin kapszulába zárással védhetőek. Az oligonukleotidok lehetnek liposzómákba vagy polietilén glikollal módosított liposzómákba ágyazva a parenterális alkalmazáshoz. További szubsztanciák liposzómákba való beépítése pl. specifikus célsejteken talált membrán fehérjékkel szemben reaktív antitestek, segíthetik az oligonukleotidokat a specifikus sejttípusokhoz való irányulásban.

A liposzóma hordozóban való helyi és parenterális alkalmazás az előnyben részesített alkalmazás.

A következő példák tovább szemléltetik a találmányt.

1. Példa

Oligonukleotidok cirkularizációja vég kapcsolódásu oligonukleotid felhasználásával

A találmánynak megfelelően egy egyszerű egylépéses kémiai módszert fejlesztettünk ki körök lineáris prekursorokból (előkörökből) történő megszerkesztéséhez. Egy DNS oligonukleotidot szerkesztettünk meg, mely a végső cél szekvenciájával azonos szekvenciával rendelkezett, ez a vég kapcsolódásu oligonukleotid. Ezután egy előkör oligonukleotidot hoztunk létre, majd kémiai úton foszforiláltuk az 5' vagy a 3' végeken. Ahogy az a 2. ábrán látható az előkört és a vég-kapcsolódásu oligonukleotidot összekevertük és hagytuk, hogy olyan komplex képződjön, melyben a végek szomszédosak. Cianogén bromidot, imidazol puffert és egy kétvegyértékű fémet adtunk hozzá. A 6-48 óráig tartó inkubálás

után a keveréket dializáltuk, liofileztük és a termékeket 20%-os poliakrilamid gélelektroforézises denaturálással szeparáltuk. Az UV fényel történő megvilágítás fefedte a főbb sávokat, melyek együtt vándoroltak az előkörrel és a vég-kapcsolódású oligonukleotiddal, valamint egy új termékkel, mely egy kissé lassabban vándorolt, mint az előkör. Nem figyeltünk meg terméket ha a vég-kapcsolódású oligonukleotidot nem adtuk hozzá a keverékhez, vagy ha az 5'- vagy a 3'-foszfát csoport hiányzott az előkörről. A fő sávokat kimetszettük és eluáltuk a gélből, dializáltuk a sók eltávolítása céljából és mennyiségi meghatározásnak vetettük alá 260 nm hullámhosszon való abszorbancia méréssel. Az 1-es és a 2-es előkörökkel való reakciókhoz (SEQ ID NO:5 és SEQ ID NO:6 sorrendben), a 4-es, és az 5-ös vég-kapcsolódású oligonukleotidokat használva (SEQ ID NO:8 és SEQ ID NO:9, sorrendben) a 6-os és a 7-es köröket kaptuk 40%-os és 58%-os hozamokkal, sorrendben. Ezen molekulák szekvenciái és más oligonukleotidok a 3. ábrán kerültek bemutatásra.

A 6-os és a 7-es termékek cirkuláris szerkezetét igazolta, az hogy rezisztenciát mutatott a 3' exonukleázos emésztéssel és az 5' defoszforilációval szemben olyan körülmények között, melyben a lineáris előkör teljesen megsemmisült vagy defoszforilálódott. Ennek megfelelően, a T4 DNS polimeráz 3' exonukleáz aktivitása hasította az 1-es és 2-es lineáris előköröket a 6-os és a 7-es köröket azonban nem. A lineáris előköröket megjelöltük az 5' végükön ^{32}P -ral, majd cirkularizáltuk őket. A reakció után a cirkuláris termékek inertek voltak a borju alkalikus fosz-

fatázzal szemben, míg az előkörök teljesen felszabadították a ^{32}P jelölést. A körök kicsivel lassabb gél mobilitása az előkörökéhez viszonyítva megegyezett a cirkularizáció előfordulásával. A következőkben megadjuk a cirkularizáció optimális körülményeit.

Számos paramétert optimalizáltunk a cirkuláris termék hozamának fokozása céljából, ezek közé tartozik az oligonukleotid és az előkör koncentrációja, a hőmérséklet, a reakció idő, a fém, a fém koncentrációja, a BrCN koncentráció és a pH. A kifejlesztett cirkularizációs körülmények biztosítása egy legalább kétszeres cirkuláris termék képződést eredményezett a tudományban használt korábbi körülményekhez képest, melyben két egyszáлу oligonukleotidot kapcsoltak össze (Luebke *et al.*, 1989, J. Am. Chem. Soc. 111:8733 és Kanaya *et al.*, 1986, Biochemistry 25:7423).

Ezek a kifejlesztett körülmények a következők:

50 μM előkör
55 μM végkapcsolódású oligonukleotid
100 mM NiCl_2
200 mM imidazol-HCl (pH 7.0)
125 mM BrCN
25 C, 36 óra

Azonban a körré való záródás hatékony volt a következő körülmények között is:

3-200 uM előkör

3-300 uM végkapcsolódású oligonukleotid

10-500 mM NiCl₂

50-500 mM imidazol-HCl

20-200 mM BrCN

Más fémek (Zn²⁺; Mn²⁺; Co²⁺; Cu²⁺; Pb²⁺; Ca²⁺; Mg²⁺) szintén működtek a Ni²⁺ helyett. Továbbá a reakció pH érzékeny.

A továbbiakban megadjuk az AP és P domének zárását.

Egy kör AP doménben való záródása feljebbvaló volt a P doménben való záródásnál. A 2-es és a 3-as előkörök (SEQ ID NO:6 és SEQ ID NO:7, sorrendben) cirkularizációjának összehasonlítása ugyanazon vég-kapcsolódású oligonukleotid körül (pl. 5, SEQ ID NO:9), azt mutatta, hogy a 7-es kör (a SEQ ID NO:6-tal rendelkezett) 58%-ban jött létre ha az AP doménben záródott (pl. a 2-es előkört használva) és csupán 35%-ban jött létre, ha a P doménben záródott (pl. a 3-as előkört használva).

A következőkben leírjuk a kondenzáló reagenseket

Két általánosan használt reagenst alkalmaztunk a DNS és az RNS kémiai ligálása során, a BrCN/imidazol/NiCl₂-ot és az 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimidet (EDC) (Kanaya et al., 1986, *Biochemistry* 25:7423 és Ashley et al., 1991, *Biochemistry* 30:2927). Ezért ezeket a reagenseket közvetlenül hasonlítottuk össze egy előkör 6-os cirkuláris oligonukleotidhoz való

ligálásának hatásosságában (3. ábra, és SEQ ID NO:5) egy dA₁₂ (SEQ ID NO:8) vég-kapcsolódású oligonukleotidot használva.

A BrCN/imidazol/NiCl₂-ot a megadott optimális körülmények között használtuk azzal az eltéréssel, hogy a ligálási hatékonyságot 4 és 25 C hőmérsékleten is megfigyeltük. Az EDC-t 200 mM koncentrációban használtuk 20 mM MgCl₂-vel, 50 mM MES-sel (pH 6.0) 4 és 25 C hőmérsékleten 4 napig tartó inkubáció mellett.

A BrCN sokkal hatékonyabb volt 4 C hőmérsékleten, 95% cirkuláris terméket eredményezett, míg az EDC csupán 55 %-ot. Azonban 25 C hőmérsékleten mind az EDC, mind a BrCN 95% terméket eredményezett. Tehát a BrCN sokkal hatékonyabb alacsonyabb hőmérsékleten, de az EDC és a BrCN egyenlő eséllyel használható 25 C hőmérsékleten. Azonban a BrCN rendelkezik egy további előnyvel az EDC-vel szemben, mivel a BrCN-nel való ligáláshoz 24 órára vagy kevesebbre van szükség, míg az EDC-vel való ligáláshoz kb 4 napra.

A következőkben leírjuk az 5' vagy a 3' foszfát használatát

Eltérő ligációs körülmények között egy 3'-foszfát 5'-OH-val való kapcsolása több ligált terméket eredményezett, mint az 5'-foszfát 3'-OH-val való kapcsolása (Ashley et al.)

Ezért az 5'-foszfát vagy a 3'-foszfát előkörökkel történő 6-os cirkuláris oligonukleotiddá való százalékos konverziót (3. ábra) összehasonlítottuk:

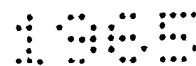
TTTTTTTTTTTTT
C C
A A
C C
A A
C C
TTTTTT TTTTTT

HO OPO3=

TTTTTTTTTTTTT
C C
A A
C C
A A
C C
TTTTTT TTTTTT

=O3PO OH

A cirkularizációs reakciót dA₁₂ vég-kapcsolódású oligonukleotidot használva végeztük a megadott optimális körülmények között, azzal az eltéréssel, hogy 5 nmol előkört és vég-kapcsolódású oligonukleotidot használtunk. A terméket UV fényben tettük láthatóvá a gélelektroforézissel végzett denaturálással



való szeparálát követően.

A cirkuláris terméké való konverzió 60%-os volt (+,-5%), ha az 5'-foszfát jelen volt és 95%-os , ha a 3'-foszfát volt jelen. Nem figyeltünk meg növekedést a hozamban, ha megnöveltük a reakcióidőt, vagy ha megnöveltük a reagens koncentrációkat.

Ennek megfelelően a 3'-foszfát alkalmazása inkább megnöveli a cirkularizációt, mint az 5'-foszfát alkalmazása.

2. Példa

A cirkuláris oligonukleotidok a cél nukleinsavakhoz nagyobb affinitással kötődnek, mint a lineáris oligonukleotidok

A 6-os és 7-es (SEQ ID NO:5 és SEQ ID NO:6, sorrendben) körök céljaikhoz való kötődési affinitását úgy határoztuk meg, hogy összehasonlítottuk a cirkuláris és a lineáris komplexek olvadási hőmérsékletét. Az oldatok az oligonukleotidot és a célt (3 μ M mindegyik) 1:1 arányban tartalmazták 100 mM NaCl₂-ben és 10 mM Tris-HCl-ben (pH, 7.0). A keverési görbék (melyeket 260 nm hullámhosszon mértünk) megerősítették, hogy 1:1 arányban képződtek a komplexek. A komplexek szabadenergiáját ($-\Delta G_{37}$) az olvadási adatokból nyertük, egy két-lépéses görbe-illesztési módszert használva (Petersheim, et al., 1983, Biochemistry 22:256).

Az eredmények azt mutatták, hogy a cirkuláris oligonukleotidok céljaikhoz sokkal erősebben kötődnek, mint a lineáris előkörök vagy a Watson-Crick komplementer cél méretű oligonukleotidok

(2. Táblázat). Például a 4-es cél (SEQ ID NO:8) cél méretű Watson-Crick komplementerével olyan duplexek hozott létre, melynek T_m értéke 37,1 C volt, míg az 1-es előkör:4-es cél komplex (pl. SEQ ID NO:5, mely a SEQ ID NO:8-hoz kötődik) 44.7 C T_m értékkel rendelkezett. Összehasonlításképpen, az 1-es előkör szekvenciájával megegyező szekvenciával rendelkező 6-os kör a 4-es célhoz egy 57.5 C T_m értékkel kötődött és a kötődés szabadenergiája 8.6 kcal/mol volt, sokkal előnyösebb, mint a megfelelő Watson-Crick duplex. A megfelelő asszociációs konstans 37 C hőmérsékleten $6 \times 10^{11} M^{-1}$ -en, mely 6 nagyságrenddel nagyobb mint a Watson-Crick duplexek esetében. Hasonló hatást figyeltünk meg a 7-es kör (SEQ ID NO:6) 5-ös célhoz (SEQ ID NO:9) való kötődésekor; ezen komplex T_m értéke 62.3 C, míg a megfelelő Watson-Crick duplex 43.8 C hőmérsékleten olvadt meg. Ezek az adatok azt jelzik, hogy a cirkuláris oligonukleotidok erősebben kötődnek egy célhoz, mint a lineáris oligonukleotidok.

A kötési tulajdonságok abban az esetben való meghatározásához, amikor a cél szekvencia egy hosszabb szekvenciába van beágyazva, egy 36 nukleotid hosszúságú oligonukleotidot szintetizáltunk egy 12 bázisu célszekvenciával (mely megfelelt a 4-es célnak) a közepén. Az olvadási vizsgálatok felfedték, hogy a 6-os kör sokkal erősebben kötődött ehhez a hosszabb oligonukleotidhoz, mint ahhoz a célhoz mely a kör kötő doménjével megegyező méretű volt: a 6-os kör 4-es céllal való T_m értéke 59.4 C volt, míg a beágyazott célt magába foglaló 36 bázisu oligonukleotid T_m értéke 63.4 C volt. Ezért a beágyazott célokkal rendelkező körök kötési

ereje nagyobb volt, mint azoké, melyek a kötő domén méretű célokat foglalták magukba.

A 6-os kör RNS célhozvaló kötődési affinitásának teszteléséhez szintetizáltuk az rA_{12} oligoribonukleotidot és meghatároztuk a 6-os kör rA_{12} -vel való T_m értékét. A 6-os kör rA_{12} -vel való T_m értéke 58.3 C volt az 57.8 C T_m értékű dA_{12} -höz viszonyítva. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a körök az RNS célokhoz ugyanolyan erősen, ha nem erősebben kötődnek, mint a DNS célokhoz.

II. TÁBLÁZAT

oligonukleotid:

cél	komplex	T_m , C	$-G_{37}$ (kcal/mol)
-----	---------	-----------	----------------------

	3' -TTTTTTTTTTTTT	37.1	8.1
	5' -AAAAAAAAAAAAA		
	3' -TTCTTTTCTTTC	43.8	10.3
	5' -AAGAAAAGAAAG		
	TTTTTTTTTTTTT		
	C C		
	A A		
1:4	C AAAAAAAAAAAAA C	44.7	10.5
	A A		
	C C		
	TTTTTT TTTTTT		
	OPO3=		

TTCTTTTCTTTC
 C C
 A A
 3:5 C AAGAAAAGAAAG C 47.0 10.8
 A A
 C C
 TTCTTT TCTTTC

OPO3=

A II. Táblázat folytatása

TTTTTTTTTTTTT
 C C
 A A
 6:4 C AAAAAAAAAA C 57.4 16.7
 A A
 C C
 TTTTTTTTTTTTT

TTCTTTTCTTTC
 A A
 7:5 C AAGAAAAGAAAG C 62.3 16.4
 A A
 C C
 TTCTTTTCTTTC

3. Példa

A cirkuláris oligonukleotidok sokkal szelektívebben kötődnek a célhoz, mint a lineáris oligonukleotidok

A cirkuláris oligonukleotidok szekvencia szelektivitásának meghatározása céljából egy sorozat cél oligonukleotidot hoztunk létre egy változó bázissal. Egy kör ezen célokkal való komplex képzésének kötési energiáját mértük és a helyes szekvencia és a nem illeszkedő szekvencia közötti szabadenergia eltérésekből határoztuk meg a szelektivitást. A cirkuláris szerkezettel nyert szelektivitást közvetlenül összehasonlítottuk egy analóg lineáris oligonukleotid szelektivitásával.

A DNS oligonukleotidokat géppel szintetizáltuk a béta-cianoetil foszforamidit módszert használva. A 8-as cirkuláris oligonukleotidot a SEQ ID NO:7-tel

5'-pTCTTTCCACACCTTTCTTTTCTTCACACTTCTTT

rendelkező lineáris előkörből állítottuk elő és egy végkapcsolódású oligonukleotiddal, melynek szekvenciája: 5'-AAGAAAAGAAAG (SEQ ID NO:9) hoztuk kör alakúvá, BrCN/Imidazolt használva a végső kötés zárásához, az 1. Példában leírtak szerint. A kör alakú szerkezetet megerősítette, hogy a 3'-exonukleázzal és az 5'-foszfáttal szemben rezisztenciát mutatott.

A 8-as kör szekvencia szelektivitását úgy határoztuk meg,

hogy hibridizáltuk olyan célokkal, melyek egy egyedüli nem illeszkedő bázist tartalmaztak és a kapott komplexek erősségét (ΔG_{37}) hővel végzett denaturálással határoztuk meg. Nyolc célt szintetizáltunk, melyek komplementerek voltak a 8-as körrel és a 9-es lineáris oligonukleotiddal azzal az eltéréssel, hogy volt egy egyedüli központi elhelyezkedésű változó bázis (X vagy Y A,G,C,T). Négy cél az X változó bázissal rendelkezett, melyet a körben levő ellentétes T-vel illesztettünk és mely egy T-X-T triádot eredményezett. A fennmaradó négy célban a változó Y bázist a körben levő két ellentétes C-vel illesztettük, mely egy C-Y-C triádot eredményezett. Az ezen kör komplexel való összehasonlítás céljából a 9-es lineáris oligonukleotidot használtuk, mely egy olyan duplexet eredményezett, ahol egy centrális T-X pár jött létre az első négy kísérletben vagy egy C-Y pár a fennmaradó négy esetében.

komplex (X,Y =A,T,G,C) kísérlet szám

3'- T T C T T T T C T T T C
5'- A A G A X A A G A A A G 1-4

A C T T C T T T T C T T T C C A
C A A G A X A A G A A A G C 5-8
A C T T C T T T T C T T T C C A

3'-T T C T T T T C T T T C
5'-A A G A A A A Y A A A G 9-12

A C T T C T T T T C T T T C C A
C A A G A A A Y A A A G C 13-16
A C T T C T T T T C T T T C C A

A 16 komplex hővel való denaturálását 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl és 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) jelenlétében végeztük el, a cél és a cirkuláris vagy a lineáris oligonukleotid koncentrációja is 3 uM volt. A kísérleteket ismétlésben végeztük és az eredményeket átlagoltuk. Az oligonukleotid:cél komplex olvadását 260 nm hullámhosszon mértük. Az így létrehozott hőmérséklet versus abszorbancia görbék egy egyszeri átmenetet mutattak a kötöttről a



szabad oligonukleotid felé. A kapcsolódás szabadenergiáját az adatok egy két lépéses görbe illesztési módszerrel való illesztésével nyertük. Az eredményeket két esetben ellenőriztük, az asszociációs energiák van't Hoff módszerrel való mérésével, a két módszer között jó egybeesést figyeltünk meg. A szelektivitást úgy határoztuk meg, mint az illeszkedő és a nem illeszkedő oligomerek közötti komplex képződés szabadenergiájában (ΔG) levő különbségeket.

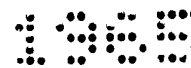
A III. Táblázat a nem illeszkedő kísérletek eredményeit mutatja. Az 1-4 kísérletek a T-X cél nem illeszkedés hatását mutatják egy DNS duplexre. Ahogy vártuk, a valódi illeszkedés (X=A) adja a legelőnyösebb komplexet ($-\Delta G_{37} = 10.3$ kcal/mol); a nem illeszkedések (X=G,C,T) egy 3.2 - 4.4 kcal/mol kötési energiában bekövetkező veszteséget okoznak, mely jó egyezést mutat a publikált nem illeszkedési kísérletekkel. Az 5-8 kísérletek, összehasonlítva a T-X-T nem illeszkedés hatását mutatják a kör alakú komplex kötési energiájára. Ez esetben is, a valódi illeszkedés (X=A) adja a legelőnyösebb háromszáru komplexeket ($-\Delta G_{37} = 16.4$ kcal/mol). Azonban a cél nem illeszkedések (X=G,T,C,) számottevően nagyobb kötési energia veszteséget eredményeztek (6.2 - 7.6 kcal/mol) a cirkuláris oligonukleotid esetében, mint a lineáris oligonukleotidében.

Hasonlóképpen, a 9-12 kísérletek megadják a C-Y nem illeszkedés hatását a kétszáru duplexre. Az illeszkedett bázis (Y=G) -10.3 kcal/mol duplex kapcsolódási szabadenergiát adott. A nem illeszkedések (Y=A,T,C) a kötési energiában bekövetkező 5.2 -

5.8 kcal/mol veszteséget okoztak, mely szintén jól egyezett a közzétett adatokkal. Ezzel szemben, egy C-Y-C nem illeszkedés sokkal nagyobb hatással van egy háromszáлу komplexre (13 - 16 kísérletek): az illeszkedés (Y=G) -16.4 kcal/mol kötési energiát ad, és a nem illeszkedés (Y=A,T,C) sokkal kevésbé stabil 7.1 - 7.5 kcal/mol értékkel.

Igy az összes vizsgált esetben a cirkuláris ligandumok nagyobb szelektivitást mutattak a helyesen illesztett szekvenciáikkal szemben mint a standard lineáris oligomerek. A szelektívítási előny a C-Y-C sorozatokban az 1.3 - 2.2 kcal/mol intervallumba esik, a T-X-T sorozatokban a 3.0 - 3.4 kcal/mol intervallumba. Ezek igen jelentős különbségek ha azt vesszük figyelembe, hogy csupán egy bázis változásából adódnak; a T-X-T sorozatokban a cirkuláris oligonukleotid közel kétszer olyan szelektív, mint a lineáris oligonukleotid. Ez a szelektívítási differencia megfelel egy 1-2 nagyságrendnek a kötési konstansban 37 C hőmérsékleten.

Két faktor jöhet számításba ezen magas szelektívítás magyarázataként. Először, mivel a cirkuláris oligonukleotid két doménje kötődik a központi cél szálhoz, a cirkuláris oligonukleotid, amikor hat, kétszer ellenőrzi a szekvenciát a helyes illeszkedéshez. Másodsor, a citozin C+G-C triádon belüli protonizációja szintén lehet egy a szelektívítás fokozásában részt vevő faktor. Ez a protonizáció ugy tünik, csak akkor részesül előnyben, ha bázis triád képződés jön létre, melyben a guanin osztozhat a pozitív töltésen; bizonyítékok szerint a bázis triádon



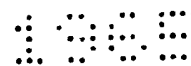
belüli citozin pKa-ja 2-3 egységgel magasabb, mint a szabad dezoxicitoziné. Ezen pozitív töltés hozzáadása csökkentheti a negatív töltés taszító hatását, mely a foszfátok nagy sűrűségéből adódik a komplexben és így növelheti a kötési stabilitást.

Igy a cirkuláris oligonukleotidok, ahogy bemutattuk, nagyobb kötési affinitással és nagyobb szelektivitással rendelkezhetnek, mint amit egyedül a Watson-Crick duplexekben el lehet érni.

III. TÁBLÁZAT

kísérletek száma	változó bázis	Tm'C	-delta G37 (kcal/mol)	szelektivitás
1	X=A	43.8	10.3	--
2	X=G	33.8	7.1	3.2
duplex				
3	X=C	28.3	5.9	4.4
4	X=T	31.1	6.4	3.9
5	X=A	62.3	16.4	--

	6	X=G	44.2	10.2	6.2
kör alakú					
komplex	7	X=C	39.8	8.8	7.6
	8.	X=T	40.8	9.1	7.3
	9	Y=A	26.2	5.1	5.2
	10	Y=G	43.8	10.3	--
duplex					
	11	Y=C	22.2	4.5	5.8
A IIII.TÁBLÁZAT folytatása					
	12	Y=T	27.0	5.0	5.3
	13	Y=A	39.9	9.0	7.4
	14	Y=G	62.3	16.4	--
kör alakú					
komplex	15	Y=C	41.3	9.3	7.1
	16	Y=T	39.6	8.9	7.5



4. Példa

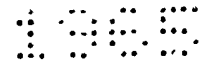
A komplex képződést befolyásoló tényezők

1) A következőkben bemutatjuk az oldatok hatását

Vizsgáltuk a NaCl, Mg^{2+} , spermin és pH kör:cél komplexre kifejtett hatását. A kötő doménben citozint tartalmazó körök érzékenyek a pH-val szemben, és alacsonyabb pH értékeken nagyobb stabilitást mutatnak. Azonban ezek és más kör:cél komplexek is meglehetősen stabilak a 7.0-7.4 fiziológiás pH értékeken (5. ábra). A komplexek a sókoncentrációval szemben is mutatnak érzékenységet, a duplexekhez viszonyítva, azonban a Mg^{2+} vagy a spermin kis mennyiségei jelentősen növelik a komplexek stabilitását. Például 1 mM Mg^{2+} koncentráció és 7.0 pH érték esetén, további só hozzáadása nélkül, egy stabil 7:5 kör:cél komplex jött létre, melynek T_m értéke 58 C volt. Ha egy 20 uM spermin - további só hozzáadása nélkül - oldatát használtuk, a 7:5-ös komplex ismételten stabilan létrejött 56 C-os T_m értékkel. Mind a Mg^{2+} , mind a spermin legalább ilyen koncentrációkban van jelen az emlősökben, így a kör:cél komplexek stabilak lesznek a fiziológiás körülmények között.

2) A következőkben megadjuk a hurok méretét

Egy kör hurok doménjeiben levő nukleotidok optimális számának meghatározásához egy cél és különböző hurok méretű körök közötti komplex képződést figyeltünk meg. Az 1-es előkörhöz hasonló előkör lineáris oligonukleotidokat szintetizáltunk 2, 3,



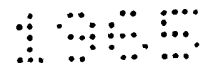
4, 5, 6, és 10 bázisu hurkokkal váltakozó C és A maradékok tet-
szőleges szekvenciáját felhasználva. Az egyes előköröket úgy
terveztük, hogy az A_{12} templáthoz (pl. 4-es cél, (SEQ ID NO:8))
kapcsolódjanak. A 4, 5, 6 és 10 bázisu hurkokkal rendelkező körök
 T_m értékei azt mutatták, hogy egy 5 nukleotidból álló hurok méret
volt az optimális a kör akár A_{12} templátokhoz, vagy egy hosszabb
36 szekvenciát tartalmazó A_{12} kötő helyéhez való kötődéskor (lásd
a 6A ábrát).

2) A következőkben megadjuk a kötő domén hosszúságát

A cirkuláris oligonukleotid kötő domén kör:cél komplex
olvadási hőmérsékletére kifejtett hatását az ugyanilyen hosszúsá-
gu duplexek olvadásához viszonyítottuk. Különböző méretű kötő
doménekkal rendelkező köröket hoztunk létre, és egyszáлу dA_n
célokkal végeztük el a komplex képződést, ahol, n 4, 8, 12 és 18
nukleotidokkal azonos. A 6B ábra azt mutatja, hogy a kör:cél
komplexek esetében jelentősen magasabb T_m értékeket figyeltünk
meg a kötő doménekkal azonos hosszúságu Watson-Crick duplexekhez
viszonyítva (0.1 M NaCl, pH 7). Például egy 12 bázisu cirkuláris
komplex körülbelül ugyanazon a hőmérsékleten olvad meg mint egy
24 bázisu duplex. A 4 bázisu cirkuláris komplex 34 C hőmérsékle-
ten olvadt meg, míg a megfelelő Watson-Crick duplex T_m értéke
kevesebb mint 0 C hőmérséklet volt.

4) A következőkben leírjuk a metilációt

Egy ideje ismeretes, hogy a természetesen előforduló m^5C



bázist létrehozó C-5 pozícióban levő citozin metilációja megemeli azon duplex DNS T_m értékét, melyben előfordul, a nem metilált szekvenciákhoz viszonyítva (Zmudzka et al., 1969, Biochemistry 8:3049). Annak vizsgálatához, hogy vajon ezen metil csoport hozzáadása stabilizálja-e a kör:cél komplexeket, a 7-es kör két analógját (a SEQ ID NO:6 szekvenciával rendelkező) szintetizáltuk. Az egyik körben a kötő doménben levő 6 C-t metiláltuk, a hurkot nem metilált állapotban hagyva (Me_6). A második körben mind a 12 C-t metiláltuk (Me_{12}). Ezen metilált kör 5-ös céllal való komplexeinek olvadási hőmérsékletét mértük. Az Me_6 -os komplex T_m értéke 71.1 C (a nem metilált kör 61.8 C értékéhez viszonyítva), és az Me_{12} T_m értéke 72.4 C volt. Tehát, a C helyett a természetes m^5C bázis használata jelentősen megnövelte a stabilitást és egy esetben egy 12 bázisu komplexet eredményezett, mely 10.6 C-kal magasabb hőmérsékleten olvadt meg mint a nem metilált és 28.6 C-kal magasabb hőmérsékleten, mint a megfelelő nem metilált Watson-Crick duplex.

5. Példa

A nukleotid hurok domének nem nukleotid hurok doménekkal való helyettesítése

A cirkuláris oligonukleotidok hurok doménjeit különböző hosszúságú polietilén vagy oligoetilén glikol láncokra cseréltük és az ilyen szintetikus hurkok cirkuláris oligonukleotid kötésre és nukleáz rezisztenciára kifejtett hatását vizsgáltuk.

A következőkben megadjuk az ehhez használt módszereket

Olyan cirkuláris oligonukleotidokat szintetizáltunk, melyekben tetra-, penta-, vagy hexa-etilén glikol láncu hurok domének voltak. Minden esetben szintetikusán állítottuk elő az etilén glikol láncokat az automata DNS szintetikus eljárásokat használva Durand et al módszerét alkalmazva (1990, Nucleic Acids Res. 18:6353-6359). Röviden, egy foszforamiditot helyeztünk egy hidroxil csoportra az etilén glikol lánc egyik végén és egy dimetoxitritil (DMT) egységet helyeztünk a másik terminális etilén glikol hidroxil csoportra. Ezt a származtatott etilén glikol láncot hozzáadtuk a növekedő lineáris oligonukleotidhoz az automatizált DNS szintézis megfelelő lépésénél. A cirkularizációs lépést az 1. Példában leírt eljárások szerint végeztük el. Egy tetraetilén hurok doménnel rendelkező lineáris oligonukleotid előkör nem záródott hatékonyan körré. Ez az eredmény azt mutatja, hogy egy tetraetilén hurok túl rövid lehet egy célhoz való optimális kötődéshez. Két típusu lineáris oligonukleotidot használtunk cél kötő doménként a cirkuláris oligonukleotidokhoz: a Cél I egy 12 bázisu oligonukleotid volt, mely nem rendelkezett nem-cél nukleotidokkal és a Cél II egy 36 bázisu oligonukleotid volt, mely 12 bázisu céllal rendelkezett az oligonukleotidon belül. A felhasznált cél szekvencia 5'-AAGAAAAGAAAG-3' (SEQ ID NO:9) és 5'-AAAAAAAAAAAAA-3' (SEQ ID NO:8), ez utóbbi egy poli(dA)₁₂ cél szekvenciát határoz meg.

A polietilén hurokkal rendelkező cirkuláris oligonukleotidok olvadási hőmérsékleteit (T_m) 7.0 pH értéknél (10 mM Tris-Cl)

figyeltük meg 10 mM MgCl₂-ben és 100 mM NaCl-ban. Az összes lineáris cél és az összes cirkuláris oligonukleotid 3 uM koncentrációban volt jelen.

A következőkben leírjuk a vizsgálat eredményeit

Egy CACAC nukleotid hurok szekvenciával és mind a P és az AP doménekhez egy poli(dA)₁₂ szekvenciával rendelkező cirkuláris oligonukleotid T_m értéke 57.8 C volt amikor egy poli(dA)₁₂ cél szekvenciához kötődött. Egy ugyanezen P és AP domén szekvenciákkal, de hexaetilén glikol hurok doménekkal rendelkező cirkuláris oligonukleotid T_m értéke 51.4 C volt, amikor ugyanehhez a célhoz kötődött.

A pentaetilén glikol (PEG) és a hexaetilén glikol (HEG) hurok doménekkal rendelkező cirkuláris oligonukleotidok esetében megfigyelt T_m értékek összehasonlítását a IV. Táblázatban mutatjuk be.

IV. TÁBLÁZAT

komplex	Cél	Cél
	I Tm	II Tm

p T T C T T T T C T T T C p

PEG A A G A A A A G A A A G PEG 51.5 47.5

p T T C T T T T C T T T C p

p T T C T T T T C T T T C p

HEG A A G A A A A G A A A G HEG 58.0 51.1

p T T C T T T T C T T T C p

p T T T T T T T T T T T T T p

HEG A A A A A A A A A A A A HEG 51.4 46.5

p T T T T T T T T T T T T T p

Egy HEG hurokkal rendelkező cirkuláris oligonukleotid esetében megfigyelt T_m érték kb. 4.5 C hőmérséklettel magasabb, mint egy PEG hurokkal rendelkező cirkuláris oligonukleotid. Következésképpen, hexaetilén glikol hurok doménekkal rendelkező cirkuláris oligonukleotidok nagyobb stabilitással kötődnek, mint a tetra-, vagy a penta-etilén glikol hurkokkal rendelkező cirkuláris oligonukleotidok.

A következőkben megadjuk a nukleáz rezisztenciát

Cirkuláris oligonukleotidokat teszteltünk nukleáz rezisztenciára cél oligonukleotidhoz nem kötött és kötött állapotban. Az összes cirkuláris oligonukleotid - akár kötött, akár nem kötött - teljes rezisztenciát mutatott az exonukleázokkal szemben. Az endonukleáz szenzitivitást S1 nukleázt használva határoztuk meg a gyártók javaslatának megfelelően.

A kötött és a nem kötött cirkuláris oligonukleotidok S1 nukleázzal szembeni rezisztenciáinak összehasonlítását az V. Táblázatban mutatjuk be.

V. TÁBLÁZAT

oligonukleotid hasítás	Idő az 50%-os S1-hez
---------------------------	----------------------

p T T C T T T T C T T T C p

HEG

HEG

1 perc

p T T C T T T T C T T T C p

p T T C T T T T C T T T C p

HEG

A A G A A A A G A A A G

HEG

>24 óra

p T T C T T T T C T T T C p

A C T T C T T T T C T T T C C A

C

C

1 perc

A C T T C T T T T C T T T C C A

A C T T C T T T T C T T T C C A

C

A A G A A A A G A A A G

C

40 perc

A C T T C T T T T C T T T C C A

Ezek az adatok azt mutatják, hogy a nem kötött cirkuláris oligonukleotidok érzékenyek az S1 nukleázzal szemben. Azonban, ha egy célhoz kötődik, egy polietilén hurok doménnel rendelkező cirkuláris oligonukleotid, sokkal ellenállóbb az S1 nukleázzal szemben, legalább 36-szor rezisztensebb, mint egy nukleotid hurok doménnel rendelkező cirkuláris oligonukleotid.

A cirkuláris és a lineáris oligonukleotidok nukleáz rezisztenciáját akkor is összehasonlítottuk, amikor az oligonukleotidokat különböző időtartamokig inkubáltuk humán plazmában. A 7-es cirkuláris oligonukleotidot és az ezen körhöz tartozó prekürzort és a 2-es lineáris oligonukleotidot inkubáltuk 50 μM koncentrációban plazmában 37 C hőmérsékleten. Különböző időpontokban azonos mennyiségeket távolítottunk el és a hasítási termékeket gélelektroforézissel szeparáltuk. A nukleáz rezisztenciát úgy vizsgáltuk, hogy megfigyeltük, hogy vajon a degradációs termékek nyilvánvalóak voltak-e a géleken.

A humán plazmában való inkubáláskor a 2-es lineáris oligonukleotid felezési ideje 20 perc volt. Ezzel szemben a 7-es cirkuláris oligonukleotid nem esett át mérhető nukleáz emésztésen a 48 órán át tartó inkubálás alatt. Ennek megfelelően, egy cirkuláris oligonukleotid felezési ideje 48 óránál hosszabb humán plazmában, 140-szer hosszabb idejű mint az ugyanilyen szekvenciával rendelkező lineáris oligonukleotidé.

6. Példa

A cirkuláris oligonukleotidok szelektíven kötődhetnek az RNS-hoz.

Az ezen példában leirt kísérletek azt jelzik, hogy a lineáris oligonukleotidoktól eltérően a cirkuláris oligonukleotidok szívesebben kötődhetnek egy RNS mint egy DNS célhoz.

Két lineáris dezoxioligonukleotidot állítottunk elő célként, a "T" (SEQ ID NO:11) célt és egy "dU" (SEQ ID NO:12) célt:

T cél: 5'-A A G A A T A G A A A G-3'; és

dU cél: 5'-A A G A A U A G A A A G-3'.

Egy a SEQ ID NO.:14 szekvencia számú cirkuláris oligonukleotidot is előállítottunk:

```

T T C T T C T C T T T C
C                               C
A                               A
C                               C
A                               A
C                               C
T T C T T A T C T T T C

```

Összehasonlításként, egy a T és a dU célokkal komplementer lineáris oligonukleotidot is szintetizáltunk (pl. a SEQ ID NO:13

szekvenciával rendelkező lineáris oligonukleotidot):

5' C T T T C T A T T C T T 3'.

Az egyes célokhoz kötődő cirkuláris vs lineáris oligonukleotidok olvadási hőmérsékleteit (T_m) megfigyeltük és a VI. Táblázatban mutatjuk be.

VI. TÁBLÁZAT

Célok	Az oligonukleotidok T_m értékei	
	Lineáris	Cirkuláris
T cél	42.9 C	41.1 C
dU cél	40.9 C	42.9
C		

A lineáris oligonukleotid sokkal erősebben kötődik a T célhoz, mint a dU célhoz, olyan mértékben, mely szigni-fikánsan nagyobb, mint a kísérleti hiba határok. Ez a T_m értékekben levő különbség megfelel egy 1.7 kcal/mol szabad kötési energia kü-

lönbségnek.

Azonban, a lineáris oligonukleotiddal szemben a cirkuláris oligonukleotid sokkal erősebben kötődik az U célhoz. Ezért a cirkuláris oligonukleotid preferenciát mutathat egy RNS céllal szemben egy megfelelő DNS célhoz viszonyítva.

Azonkívül, a cirkuláris oligonukleotid RNS célhoz való kötési energiájában bekövetkező növekedés megfelel egy 0.8 kcal/mol szabadenergia különbségnek, mely azt jelzi, hogy 37 C hőmérsékleten egy RNS cél részesülne előnyben kb. 3:1 arányban egy megfelelő DNS céllal szemben.

7. Példa

A cirkuláris oligonukleotidok százelmozdítása

A 6-os cirkuláris oligonukleotid (3. ábra) egy dA_{12} célhoz 9 kcal/mol-lal nagyobb stabilitással kötődik, mint egy lineáris dT_{12} oligonukleotid (2. Példa). Ez a stabilitásban bekövetkezett növekedés azt mutatja, hogy egy cirkuláris oligonukleotid : cél komplex termodinamikailag előnyben részesül egy lineáris oligonukleotid : cél komplexel szemben. Továbbá, egy cirkuláris oligonukleotid valójában felgyorsíthatja (vagy katalizálhatja) egy duplex DNS cél szekvencia disszociációját, a duplex egyik szálával való komplex képzése céljából.

Annak vizsgálata céljából, hogy vajon egy cirkuláris oligonukleotid könnyen disszociálhatja-e a duplex DNS-at és elmozdítja-e a duplex DNS cél egyik szálát, megfigyeltük egy duplex DNS cél százelmozdítási kinetikáját egy komplementer

lineáris vagy cirkuláris oligonukleotid jelenlétében.

Egy olyan DNS duplex célt állítottunk elő, melynek egyik szálán egy fluoreszcens csoport, a másik szálán egy tetrametilrodamin csoport volt, publikált eljárásokat alkalmazva (Cardullo *et al.*, 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8790; Cooper *et al.*, 1990 Biochemistry 29:9261). A duplex cél szerkezete (SEQ ID NO: 15) a következő volt :

5'-fluoreszcein-A A A A A A A A A A

3'-rodamin-T T T T T T T T T T.

Ezen jelölt duplex cél T_m értéke normális volt, tehát a fluoreszcein helyettesítéseknek nincs szignifikáns hatásuk az asszociációs kinetikára. Továbbá, a fluoreszcein-dA₁₂ szál emissziós maximuma 523 nm hullámhosszon volt, míg a rodamin-dT₁₂ szál emissziós maximuma 590 nm hullámhosszon volt, lehetővé téve, hogy a két szál asszociációs kinetikáját külön vizsgáljuk.

A szál elmozdításos reakciót 10 C hőmérsékleten egy 1 cm-es fluoreszcensz küvettában végeztük el. A reakció körülményei: 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ és 10 mM Tris-HCl, pH 7.0, a reakció térfogat 3 ml. A jelölt duplexet legalább egy órán át hagytuk ekvilibrálni 10 C hőmérsékleten, mielőtt hozzáadtuk volna a 40-szeres tulsulyban levő lineáris vagy cirkuláris oligonukleotidot (a végső koncentráció 0.01 μ M). Egy Spex Fluorolog F 111A fluoreszcensz eszközt használtunk 5 mm-es rés szélességet használva. A gerjesztési hullámhossz 450 nm és a mért emissziós hullámhossz 523 nm volt. Az eredmények függetlenek voltak mind a gerjesztési, mind a mért emissziós hullámhosszoktól. A reakciót legalább 5



felezési ideig követtük.

A rodamin-dT₁₂ fluoreszcein-dA₁₂-höz adása csökkenést okozott a fluoreszcein fluoreszcenciájában és növekedést a rodaminéban. Az ilyen hatások a fluoreszcens egységek közötti energia átvitelnek köszönhetőek (Cardullo et al.).

A két fluoreszcens módon jelölt szál asszociációs sebességi konstansát úgy határoztuk meg, hogy a szálakat ál-elsőrendű körülmények közé kevertük és meghatároztuk a fluoreszcens emisszióban bekövetkező csökkenés mértékét. A megfigyelt asszociációs konstans 10 C hőmérsékleten $3.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ volt, mely jó egyezést mutatott a DNS oligonukleotidok publikált asszociációs rátájával (Nelson et al., 1982, *Biochemistry* 21:5289; Turner et al., 1990 in: Nucleic Acids (C alkötet), W. Saenger, Ed. Springer-Verlag, Berlin:201-227).

Egy egyedüli lineáris szál (SEQ IS NO:8) vagy egy SEQ ID NO:5 szekvenciával rendelkező cirkuláris oligonukleotid (pl. a 6-os cirkuláris oligonukleotid) azon összehasonlításához, hogy egy duplex DNS-ban milyen arányban cserélődnek ki a szálakkal, nem jelölt lineáris vagy cirkuláris oligonukleotidok tulsulyban levő mennyiségeit kevertük össze a fluoreszces jelölésű duplex DNS céllal. A fluoreszcens emisszióban bekövetkező növekedést ezután olyan hőmérsékleten mértük, mely jelentősen a duplex cél T_m értéke alatt van, ami mértéke a duplex cél szál disszociációjának.

A 8. ábra a duplex cél disszociációjának egy tipikus kinetikai vizsgálatát mutatja be egy nem jelölt dA₁₂ (pontozott vonal)

vagy a 6-os cirkuláris oligonukleotid 40-szeres tulsulyban való jelenlétével 10 C hőmérsékleten. Ahogy leirtuk, a duplex cél cirkuláris oligonukleotid általi disszociációja jelentősen gyorsabb, mint a lineáris oligonukleotid általi disszociáció. A lineáris oligonukleotid általi disszociáció első arányu konstansa $2.0 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$, míg a cirkuláris oligonukleotid általi konstans $2.3 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$, majdnem 2 nagyságrenddel gyorsabb volt. Ez a különbség még sokkal szembetűnőbb, ha kiszámítjuk a cél duplex lineáris vs cirkuláris oligonukleotidok jelenlétében megfigyelhető felezési idejét. Tíz C hőmérsékleten a duplex disszociációs felezési ideje 58 perc lineáris oligonukleotid jelenlétében de csupán 30 másodperc cirkuláris oligonukleotid jelenlétében.

A lineáris oligonukleotid és duplex közötti reakció sebességétől eltérően a cirkuláris oligonukleotid és a duplex közötti reakció sebessége, függ a hozzáadott cirkuláris oligonukleotid koncentrációjától, alacsony koncentráció esetén, és Michaelis-Menten típusu telítődési tulajdonságot mutat magasabb koncentráció esetében (9. ábra).

A jelölt duplex disszociációs sebessége 10 C hőmérsékleten kiszámítható a duplex asszociációs sebesség konstansból és a ΔG_{10} értékekből. Ez a sebesség konstans, $8.5 \times 10^{-10} \text{ sec}^{-1}$, egyezik a duplex komplexek esetében a becsült termodinamikai paraméterekből származtatott sebességgel (Breslauer *et al.*, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3746), bár ez a sebesség szignifikánsan kisebb, mint egy lineáris oligonukleotid általi szál elmozdítás sebességi konstansa. Lineáris oligonukleotid

hozzáadásakor növekedést figyeltek meg a duplex disszociációjában más esetekben (Chamberlin et al., 1965, J. Mol. Biol. 12:410). A cirkuláris oligonukleotid által katalizált reakció és a nem katalizált duplex disszociáció sebességének összehasonlítása felfedezett egy kb 10^7 -szeres sebesség fokozást (Sigler et al., 1962, J. Mol. Biol. 5:709).

A $1/[\text{cirkuláris oligonukleotid}]$ vs. $1/k_{\text{megfigy.}}$ kettős reciprok ábrázolása lineáris és a K_{cat} $0.024 \pm 0.005 \text{ sec}^{-1}$ és a K_M $2.2 \times 10^{-7} \text{ M}$. A k_{kat} 100-szor nagyobb mint a duplex akár dA_{12} vagy dT_{12} egyedüli szálakkal való reakciójában kapott megfigyelt sebességi konstansok.

A megfigyelt telítődési viselkedés (9. ábra) azt sugallja, hogy egy komplex jön létre a kör és a kettősszálu cél között. A fenti K_M értéket használva és feltételezve, hogy a $k_{\text{kat}} \ll k_{-1}$, ahol k_{-1} a komplex disszociációs sebességi konstansa, az asszociációs szabadenergia -8.6 kcal/mol 10 C hőmérsékleten. Ez az érték hasonló T-A-T bázis triádokat tartalmazó 12 bázisu hármas hélixben levő P domén esetében becsült -9 kcal/mol értékhez, melyet Pilch et al. (1990, Nucleic Acids Res. 18:5743) termodinamikai paramétereiből származtattunk.

A következőkben megadjuk a szekvenciák felsorolását.



(1) ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓ

- (i) FELTALÁLÓ: Kool, Erik T.

- (ii) A TALÁLmány CIME: EGYSZÁLU; CIRKULÁRIS OLIGONUK-
LEOTIDOK

- (iii) A SZEKVENCIÁK SZÁMA: 15

- (iv) LEVELEZÉSI CIM:
 - (A) CIMZETT: Scully, Scott, Murphy & Presser
 - (B) UTCA: 400 Garden City Plaza
 - (C) VÁROS: Garden City
 - (D) ÁLLAM: New York
 - (E) ORSZÁG: USA
 - (F) IRÁNYÍTÓSZÁM: 11530

- (V) SZÁMITÓGÉPPÉL OLVASHATÓ FORMA:
 - (A) ANYAG TIPUS: Floppy disk
 - (B) SZÁMITÓGÉP: IBM PC kompatibilis
 - (C) OPERÁCIÓS RENDSZER: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: Patent in Release #1.0, Verzió

- (vi) JELEN ALKALMAZÁSI ADATOK:
 - (A) ALKALMAZÁSI SZÁM: US
 - (B) IKTATÁSI IDŐPONT:



(C) OSZTÁLYOZÁS:

(viii) ÜGYVÉD/IRODA INFORMÁCIÓ:

(A) NÉV: McNulty, William E.

(B) REGISZTRÁCIÓS SZÁM: 22,606

(C) REFERENCIA/JEGYZÉK SZÁM: 8085Z

(ix) TELEKOMMUNIKÁCIÓS INFORMÁCIÓ:

(A) TELEFON: (516) 742-4343

(B) TELEFAX: (516) 742-4366

(2) A SEQ ID NO:1 INFORMÁCIÓI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

(A) HOSSZUSÁG: 34 bázispár

(B) TIPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTIPUS: egyszálu

(D) TOPOLÓGIA: cirkuláris

(xi) A SZEKVENCIA LEIRÁSA: SEQ ID NO: 1

CTCCCCGCC TCNNNCTC CCACCCCTCN NNN

34

(2) A SEQ ID NO:2 INFORMÁCIÓI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

(A) HOSSZUSÁG: 38 bázispár

(B) TIPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTIPUS: egyszálu

(D) TOPOLÓGIA: cirkuláris

(xi) A SZEKVENCIA LEIRÁSA: SEQ ID NO: 2

TCTTTTTTCT TTTCNNNC TTTCTTTTT TCTNNNN

38

(2) A SEQ ID NO:3 INFORMÁCIÓI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

(A) HOSSZUSÁG: 38 bázispár

(B) TIPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTIPUS: egyszálu

(D) TOPOLÓGIA: cirkuláris

(xi) A SZEKVENCIA LEIRÁSA: SEQ ID NO: 3

TTTCYTCGTT CGTCNNNNNC TACTTACTGC TTTNNNNN

38

(2) A SEQ ID NO:4 INFORMÁCIÓI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

- (A) HOSSZUSÁG: 40 bázispár
- (B) TIPUS: nukleinsav
- (C) SZÁLTIPUS: egyszálu
- (D) TOPOLÓGIA: cirkuláris

(xi) A SZEKVENCIA LEIRÁSA: SEQ ID NO: 4

TCCTTCTTCY CCTCTNNNNN TCTCCGCTTC TTCCTNNNNN

40

(2) A SEQ ID NO:5 INFORMÁCIÓI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

- (A) HOSSZUSÁG: 34 bázispár
- (B) TIPUS: nukleinsav
- (C) SZÁLTIPUS: egyszálu
- (D) TOPOLÓGIA: mindkettő

(xi) A SZEKVENCIA LEIRÁSA: SEQ ID NO: 5

TTTTTTCACA CTTTTTTTTT TTTCACACTT TTTT

34

(2) A SEQ ID NO:6 INFORMÁCIÓI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

- (A) HOSSZUSÁG: 34 bázispár
- (B) TIPUS: nukleinsav
- (C) SZÁLTIPUS: egyszálu
- (D) TOPOLÓGIA: mindkettő

(xi) A SZEKVENCIA LEIRÁSA: SEQ ID NO: 6

TCTTTCCACA CCTTTCTTTT CTCACACTT CTTT

34

(2) A SEQ ID NO:7 INFORMÁCIÓI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

- (A) HOSSZUSÁG: 34 bázispár
- (B) TIPUS: nukleinsav
- (C) SZÁLTIPUS: egyszálu
- (D) TOPOLÓGIA: mindkettő

(xi) A SZEKVENCIA LEIRÁSA: SEQ ID NO: 7

TTTCTTCACA CTTCTTTTCT TTCCACACCT TTCT

34

(2) A SEQ ID NO:8 INFORMÁCIÓI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

(A) HOSSZUSÁG: 12 bázispár

(B) TIPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTIPUS: egyszálu

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEIRÁSA: SEQ ID NO: 8

AAAAAAAAAA AA

12

(2) A SEQ ID NO:9 INFORMÁCIÓI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

(A) HOSSZUSÁG: 12 bázispár

(B) TIPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTIPUS: egyszálu

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEIRÁSA: SEQ ID NO: 9

AAGAAAAGAA AG

12

(2) A SEQ ID NO:10 INFORMÁCIÓI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

(A) HOSSZUSÁG: 12 bázispár

(B) TIPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTIPUS: egyszálu

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEIRÁSA: SEQ ID NO: 10

CTTTCTTTTC TT

12

(2) A SEQ ID NO:11 INFORMÁCIÓI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

(A) HOSSZUSÁG: 12 bázispár

(B) TIPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTIPUS: egyszálu

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEIRÁSA: SEQ ID NO: 11

AAGAATAGAA AG

12

(2) A SEQ ID NO:12 INFORMÁCIÓI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

(A) HOSSZUSÁG: 12 bázispár

(B) TIPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTIPUS: egyszálu

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEIRÁSA: SEQ ID NO: 12

AAGAAUAGAA AG

12

(2) A SEQ ID NO:13 INFORMÁCIÓI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

(A) HOSSZUSÁG: 12 bázispár

(B) TIPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTIPUS: egyszálu

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEIRÁSA: SEQ ID NO: 13

CTTTCTATTC TT

12

(2) A SEQ ID NO:14 INFORMÁCIÓI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

(A) HOSSZUSÁG: 34 bázispár

(B) TIPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTIPUS: egyszálu

(D) TOPOLOGIA: mindkettő

(xi) A SZEKVENCIA LEIRÁSA: SEQ ID NO: 14

TTCTTCTCTT TCCACACCTT TCTATTCTTC ACAC

34

(2) A SEQ ID NO:15 INFORMÁCIÓI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

(A) HOSSZUSÁG: 12 bázispár

(B) TIPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTIPUS: kettős szálu

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEIRÁSA: SEQ ID NO: 15

AAAAAAAAAA AA

12

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Egy egyszáлу cirkuláris oligonukleotid azzal jellemezve, hogy tartalmaz legalább egy paralell kötésű (P) domént és legalább egy anti-paralell kötésű (AP) domént, az egyes kötő domének között rendelkezik egy hurok doménnel, mely a cirkuláris oligonukleotid létrehozásában vesz részt; az egyes P és a megfelelő AP domének elegendő komplementaritással rendelkeznek ahhoz, hogy detektálhatóan kötődjenek egy meghatározott nukleinsav cél egyik szálához, melynek során az említett P domén paralell módon kötődik az említett célhoz és az említett megfelelő AP domén az említett célhoz anti-paralell módon kötődik.

2. Az 1.igénypont szerinti oligonukleotid azzal jellemezve, hogy az említett cél egy ismert nukleotid szekvenciát tartalmaz, melyből az említett P domén és az említett megfelelő AP domén elegendő számú pozícióihoz egy nukleotid szekvencia az említett cél szekvenciájából meghatározásra kerül:

az említett P domén esetében:

ha az említett célban egy pozícióban egy bázis guanin vagy egy guanin analóg, akkor a P egy megfelelő pozícióban egy citozinnal vagy annak egy alkalmas analógjával rendelkezik;

ha az említett célban egy pozícióban egy bázis adenin vagy egy adenin analóg, akkor egy megfelelő pozícióban a P egy timinnel vagy uracillal vagy ezek egy alkalmas analógjával rendelkezik;

ha az említett célban egy pozícióban egy bázis timin vagy egy timin analóg, akkor egy megfelelő pozícióban a P egy citozinnal vagy guaninnal vagy ezek egy alkalmas analógjával rendelkezik;

ha az említett célban egy pozícióban egy bázis citozin vagy egy citozin analóg, akkor egy megfelelő pozícióban a P egy citozinnal, timinnel vagy uracillal vagy ezek egy alkalmas analógjával rendelkezik; és

ha az említett célban egy pozícióban egy bázis uracil vagy egy uracil analóg, akkor egy megfelelő pozícióban a P egy citozinnal, guaninnal, timinnel, vagy uracillal vagy ezek egy alkalmas analógjával rendelkezik;

az említett AP domén esetében:

ha az említett célban egy pozícióban egy bázis guanin vagy egy guanin analóg, akkor az AP egy megfelelő pozícióban egy citozinnal vagy egy uracillal vagy ezek egy alkalmas analógjával rendelkezik;

ha az említett célban egy pozícióban egy bázis adenin vagy egy adenin analóg, akkor egy megfelelő pozícióban az AP egy timinnel vagy uracillal vagy ezek egy alkalmas analógjával rendelkezik;

ha az említett célban egy pozícióban egy bázis timin vagy egy timin analóg, akkor egy megfelelő pozícióban az AP egy adeninnel vagy annak egy alkalmas analógjával rendelkezik;

ha az említett célban egy pozícióban egy bázis citozin vagy egy citozin analóg, akkor egy megfelelő pozícióban az AP egy

guaninnal vagy annak egy alkalmas analógjával rendelkezik; és ha az említett célban egy pozícióban egy bázis uracil vagy egy uracil analóg, akkor egy megfelelő pozícióban az AP egy adeninnel vagy egy guaninnal vagy ezek egy alkalmas analógjával rendelkezik;

ahol a pozíciók említett elegendő száma azt a pozíciószámot jelenti, mely kielégítő komplementaritást biztosít az oligonukleotid számára, hogy az említett célhoz detektálhatóan kötődjön.

3. Az 1. igénypont szerinti oligonukleotid azzal jellemezve, hogy az említett P domén egy olyan nukleotid szekvenciát tartalmaz, mely az említett cél nukleotid szekvenciájából meghatározásra kerül:

ha az említett célban egy pozícióban egy bázis guanin vagy egy guanin analóg, akkor a P egy megfelelő pozícióban egy citozinnal vagy annak egy alkalmas analógjával rendelkezik;

ha az említett célban egy pozícióban egy bázis adenin vagy egy adenin analóg, akkor egy megfelelő pozícióban a P egy timinnel vagy uracillal vagy ezek egy alkalmas analógjával rendelkezik;

ha az említett célban egy pozícióban egy bázis timin vagy egy timin analóg, akkor egy megfelelő pozícióban a P egy citozinnal vagy guaninnal vagy ezek egy alkalmas analógjával rendelkezik;

ha az említett célban egy pozícióban egy bázis citozin vagy egy citozin analóg, akkor egy megfelelő pozícióban a P egy

citozinnal, timinnel vagy uracillal vagy ezek egy alkalmas analógjával rendelkezik;

ha az említett célban egy pozícióban egy bázis uracil vagy egy uracil analóg, akkor egy megfelelő pozícióban a P egy citozinnal, guaninnal, timinnel vagy uracillal vagy ezek egy alkalmas analógjával rendelkezik;

valamint a továbbiakban, ahol az említett AP domén olyan nukleotid szekvenciával rendelkezik, melyet az említett cél említett szekvenciájából a következők szerint meghatároztunk:

ha az említett célban egy pozícióban egy bázis guanin vagy egy guanin analóg, akkor az AP egy megfelelő pozícióban egy citozinnal vagy egy uracillal vagy ezek egy alkalmas analógjával rendelkezik;

ha az említett célban egy pozícióban egy bázis adenin vagy egy adenin analóg, akkor egy megfelelő pozícióban az AP egy timinnel vagy uracillal vagy ezek egy alkalmas analógjával rendelkezik;

ha az említett célban egy pozícióban egy bázis timin vagy egy timin analóg, akkor egy megfelelő pozícióban az AP egy adeninnel vagy annak egy alkalmas analógjával rendelkezik;

ha az említett célban egy pozícióban egy bázis citozin vagy egy citozin analóg, akkor egy megfelelő pozícióban az AP egy guaninnal vagy annak egy alkalmas analógjával rendelkezik; és

ha az említett célban egy pozícióban egy bázis uracil vagy egy uracil analóg, akkor egy megfelelő pozícióban az AP egy adeninnel vagy egy guaninnal vagy ezek egy alkalmas analógjával

rendelkezik.

4. Az 1., 2. vagy a 3. igénypont szerinti oligonukleotid azzal jellemezve, hogy az említett cél, az említett P domén és az említett AP domén egymástól függetlenül kb. 2-200 nukleotidot tartalmaz.

5. A 4. igénypont szerinti oligonukleotid azzal jellemezve, hogy az említett cél, az említett P domén és az említett AP domén egymástól függetlenül kb. 6-36 nukleotidot tartalmaz.

6. Az 1., 2. vagy a 3. igénypont szerinti oligonukleotid azzal jellemezve, hogy az egyes hurok domének egymástól függetlenül kb. 2-2000 nukleotidot tartalmaznak.

7. A 6.igénypont szerinti oligonukleotid azzal jellemezve, hogy az egyes hurok domének egymástól függetlenül kb. 3-8 nukleotidot tartalmaznak.

8. Az 1., 2. vagy a 3. igénypont szerinti oligonukleotid azzal jellemezve, hogy az említett cél egy vagy kettős szállal rendelkezik.

9. Az 1., 2. vagy a 3. igénypont szerinti oligonukleotid azzal jellemezve, hogy az említett cél RNS vagy DNS lehet.

10. Az 1., 2. vagy a 3. igénypont szerinti oligonukleotid azzal jellemezve, hogy az említett cél egy olyan domén, melyet egy nukleinsav templát tartalmaz.

11. Az 1., 2. vagy a 3. igénypont szerinti oligonukleotid azzal jellemezve, hogy az említett P domén és az említett

AP domén az említett célhoz egy lépcsős kötési elrendeződésben kötődik.

12. Az 1. vagy a 2. igénypont szerinti oligonukleotid azzal jellemezve, hogy a kielégítő komplementaritás 100%-nál kisebb komplementaritást jelent.

13. A 12. igénypont szerinti oligonukleotid azzal jellemezve, hogy a kielégítő komplementaritás kb. 30% - 40%-os komplementaritást jelent.

14. Az 1., 2. vagy a 3. igénypont szerinti oligonukleotid azzal jellemezve, hogy az említett oligonukleotid DNS vagy RNS lehet.

15. Az 2. vagy a 3. igénypont szerinti oligonukleotid azzal jellemezve, hogy egy megfelelő citozin analóggként az 5-metilcitozin szerepel.

16. Az 2. vagy a 3. igénypont szerinti oligonukleotid azzal jellemezve, hogy egy megfelelő uracil analóggként az 5-metiluracil szerepel.

17. Az 2. vagy a 3. igénypont szerinti oligonukleotid azzal jellemezve, hogy egy megfelelő adenin analóggként a diaminopurin szerepel.

18. Az 1., 2. vagy a 3. igénypont szerinti oligonukleotid azzal jellemezve, a nukleotidok a ribóz vagy dezoxiribóz helyett egy 2'-O-metilribózzal rendelkeznek.

19. Az 1., 2. vagy a 3. igénypont szerinti oligonukleotid azzal jellemezve, hogy az említett oligonukleotidot egy sejt felveszi.

20. A 19. igénypont szerinti oligonukleotid azzal jellemezve, hogy az említett oligonukleotid továbbá tartalmaz egy ligandumot, mely egy celluláris receptorként, koleszterol csoportként, egy aril csoportként, egy szteroid csoportként vagy egy polikationként szolgál.

21. Az 1., 2. vagy a 3. igénypont szerinti oligonukleotid azzal jellemezve, hogy az említett oligonukleotid továbbá tartalmaz egy drogot vagy egy drog analógot.

22. Az 1., 2. vagy a 3. igénypont szerinti oligonukleotid azzal jellemezve, hogy az említett hurok domének nem-nukleotid hurok doméneket tartalmaznak.

23. A 22. igénypont szerinti oligonukleotid azzal jellemezve, hogy az említett nem-nukleotid hurok domének polietilén glikolból állnak.

24. A 23. igénypont szerinti oligonukleotid azzal jellemezve, hogy az említett polietilén glikol pentaetilén glikol, hexaetilén glikol vagy heptaetilén glikol lehet.

25. Az 1., 2. vagy a 3. igénypont szerinti oligonukleotid azzal jellemezve, hogy az említett oligonukleotid továbbá legalább egy metilfoszfónát, foszforotioát, foszforoditioát, foszfortriészter, sziloxán, karbonát, acetamidát, tioéter vagy foszfor-bóron kötést tartalmaz.

26. Az 1., 2. vagy a 3. igénypont szerinti oligonukleotid azzal jellemezve, hogy az említett oligonukleotid továbbá egy riporter molekulát tartalmaz.

27. Egy cél nukleinsav detektálására vagy diagnosz-



tizálására szolgáló részekből álló kit azzal jellemezve, hogy:

az 1.-3. igénypontok bármelyikében szereplő cirkuláris oligonukleotidot biztosító legalább egy első rekeszt tartalmaz.

28. Egy templát nukleinsav izolálására szolgáló részekből álló kit, mely tartalmaz legalább egy az 1., 2. vagy 3. igénypont szerinti cirkuláris oligonukleotidot biztosító első rekeszt, azzal jellemezve, hogy az említett oligonukleotid az említett templáton belüli céllal komplementaritást mutat.

29. A 28. igénypont szerinti kit azzal jellemezve, hogy az említett templát egy poli (A)⁺mRNS lehet.

30. Egy a DNS, az RNS vagy egy fehérje bioszintézis szabályozására szolgáló módszer azzal jellemezve, hogy:

az 1.-3. igénypontok bármelyike szerinti oligonukleotidok közül legalább egyet kapcsolatba hozunk egy az említett DNS vagy RNS vagy fehérje nukleinsav templátjával olyan körülmények között, melyek kielégítőek ahhoz, hogy az oligonukleotidok közül legalább egy kötődhessen ahhoz a cél szekvenciához, melyet az említett templát tartalmaz;

az említett oligonukleotid az említett célhoz kötődik;

a blokkolás hozzájárul, vagy lehetővé teszi az említett templát degradációját és ezen keresztül az említett DNS, RNS vagy fehérje bioszintézisét szabályozza.

31. A 30. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett templát tartalmaz egy kettős szálú nukleinsav célt valamint az említett körülmények hatékonyak az említett cél szál elmozdítással való denaturálásához ezáltal a kötődést

lehetővé teszik.

32. A 30. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett bioszintézis legalább egy DNS replikációból, DNS reverz transzkripcióból, RNS transzkripcióból, RNS hasításból, RNS poliadenilációból, RNS transzlokációból és fehérje transzlációból áll.

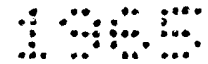
33. A 32. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett DNS replikációhoz az említett templát egy RNS templát vagy egy DNS templát lehet.

34. A 33. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett DNS replikáció szabályozásához való említett oligonukleotid említett célja egy replikációs origó vagy egy primer kötési hely lehet.

35. A 32. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett DNS reverz transzkripció szabályozásához való említett oligonukleotid említett célja egy primer kötő hely, egy retrovirusban levő hely vagy egy mRNS-ban levő hely lehet.

36. A 32. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett RNS transzkripció szabályozásához való említett oligonukleotid említett célja egy promóter, egy represszor kötő hely, egy operátor, egy erősítő, egy transzkripció szabályozó elem vagy egy mRNS kódoló régióban levő hely lehet.

37. A 32. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett RNS hasítás szabályozásához való említett oligonukleotid említett célja egy 5' hasítási pont, egy intron elágazási pont vagy egy 3' hasítási pont valamelyike lehet.



38. A 32. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett RNS poliadeniláció szabályozásához való említett oligonukleotid említett célja egy poliadenilációs hely lehet.

39. A 32. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett RNS transzlokáció szabályozásához való említett oligonukleotid említett célja egy poli(A) farok lehet.

40. A 32. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett fehérje transzlációhoz való említett templát egy mRNS templát lehet.

41. A 40. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett templát említett célja egy riboszóma kötő hely, egy 5'mRNS sapka vagy egy fehérje kódoló régióban levő hely lehet.

42. A 30. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett templát egy virális DNS vagy RNS templát lehet.

43. A 42. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett oligonukleotid egy a SEQ ID NO:3 vagy a SEQ ID NO:4 szekvencia számú nukleotid szekvenciákkal rendelkezik.

44. Eljárás egy kettős szálu nukleinsav célban a szál elmozdítására azzal jellemezve, hogy:

az említett célt kapcsolatba hozzuk egy az 1.-3. igénypontok bármelyikében szereplő cirkuláris oligonukleotiddal bizonyos ideig, valamint olyan körülmények között, melyek hatékonyak az említett cél denaturálásához és az említett cirkuláris

oligonukleotidhoz való kötődés biztosításához.

45 A 44. igénypont szerinti módszer, melyben az említett cél denaturálására az említett körülmények hatékonyak, azzal jellemezve, hogy az említett cirkuláris oligonukleotidot és az említett célt kb. 1-100 arányban tartalmazza.

46. A 45. igénypont szerinti módszer - melyben az említett idő hatékony az említett cél denaturálására - azzal jellemezve, hogy az időintervallum 1 perctől kb. 16 óráig terjed.

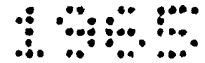
47. A 44. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett kettősszálu nukleinsav cél egy virális, egy bakteriális, egy gomba, vagy egy emlős nukleinsavat tartalmaz.

48. A 47. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett kettős szálu nukleinsav cél egy replikációs origó, egy promóter, egy represszor kötő hely, egy operátor, egy erősítő, egy transzkripció szabályozó elem, vagy egy mRNS kódoló régióban levő hely lehet.

49. A 44. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett kettős szálu nukleinsav cél egy tiszta, vagy nem tiszta nukleinsav mintában, egy szövet részben, egy sejt kenetben vagy egy kromoszóma tömegben található.

50. A 49. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett oligonukleotid egy riporter molekulához kovalensen kapcsolódik.

51. Egy nukleinsav vagy fehérje bioszintézis szabályozására szolgáló gyógyszerészeti összetétel azzal jellemezve, hogy az 1.-3. igénypontok bármelyikében szereplő oligonukleotidok



közül legalább egyet a bioszintézist szabályozó mennyiségben valamint egy gyógyszerészetileg elfogadható hordozót tartalmaz.

52. Az 1., 2. vagy a 3. igénypontok szerinti egyszáлу cirkuláris oligonukleotidok előállítására szolgáló módszer azzal jellemezve, hogy egy lineáris előkört egy vég kapcsolódásu oligonukleotidhoz kötünk, az említett előkör két végét összekapcsoljuk és az említett egyszálu cirkuláris oligonukleotidot kinyerjük.

53. Az 52. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett lineáris előkör egy 3'-foszfáttal rendelkezik.

54. Az 53. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett két vég az említett egyszálu cirkuláris oligonukleotid AP nukleotidjainak megfelelő két nukleotidot tartalmaz.

55. Az 54. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett összekapcsolást BrCN-nel, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimidde l vagy N-cianoimidazpl ZnCl₂-vel végezzük.

56. Egy komplex azzal jellemezve, hogy az 1., 2. vagy a 3. igénypontok szerinti oligonukleotid és a cél között létrejön.

57. Egy speciális sejt típusba való drog bejuttatására szolgáló módszer azzal jellemezve, hogy:

(a) egy állatnak az 1., 2 vagy a 3. igénypontok szerinti oligonukleotidhoz kovalensen kötődő drogot adunk;

(b) az említett oligonukleotidot egy az említett sejt

tipusban levő cél mRNS-hoz kötjük; és

(c) így az említett drogot az említett specifikus sejt típusba bejuttatjuk.

58. Egy cél nukleinsav detektálására szolgáló módszer azzal jellemezve, hogy:

az 1., 2. vagy a 3. igénypontok szerinti cirkuláris oligonukleotidok bármelyikét kapcsolatba hozzuk egy mintával-melynek vizsgáljuk az említett aminosav tartalmát-egy ideig és olyan körülmények között, mely kielégítő az oligonukleotid - cél komplex kialakulásához; és

az említett komplexet detektáljuk.

59. Az 58. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett nukleinsav egy kettősszálu nukleinsav célt tartalmaz, valamint az említett körülmények hatékonyak az említett cél szál elmozdítással való denaturálásához és így lehetővé teszik, hogy az említett oligonukleotid az említett oligonukleotid-cél komplexet létrehozza.

60. Az 58. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett minta egy tiszta vagy nem tiszta nukleinsav mintát, egy szövet darabot, egy sejt kenetet vagy egy kromoszóma tömeget tartalmaz.

61. Az 58. igénypont szerinti módszer, melyben az említett cél denaturálására az említett körülmények hatékonyak, azzal jellemezve, hogy az említett cirkuláris oligonukleotidot és az említett célt kb. 1-100 arányban tartalmazza.

62. Az 58. igénypont szerinti módszer - melyben az említett idő hatékony az említett cél denaturálására - azzal jellemezve, hogy az időintervallum 1 perctől kb. 16 óráig terjed.

63. Az 58. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett komplexet fluoreszcenz energia transzfer vizsgálattal detektáljuk.

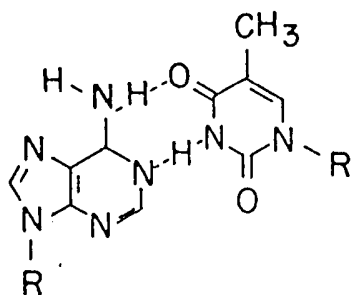
64. A 12. igénypont szerinti oligonukleotid azzal jellemezve, hogy a kielégítő komplementaritás legalább az 50%-ot eléri.

A meghatalmazott

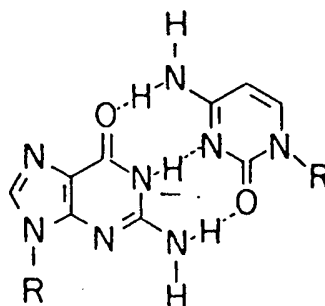
115 oldal
+ 8 ábracsoport

123 oldal
jelelem ábracsoport
Jrd

ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvéd
az S.A.M. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Irodában
H-1061 Budapest, Tuzsoly utca 10.
Telefon: 155-5755, Fax: 155-5664

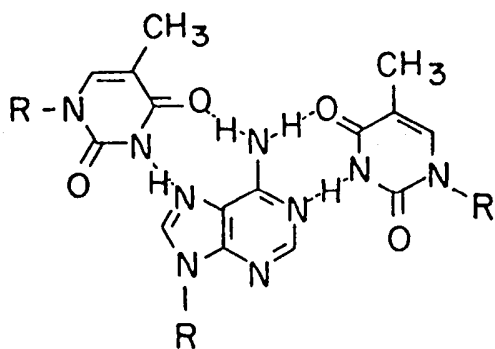


AT

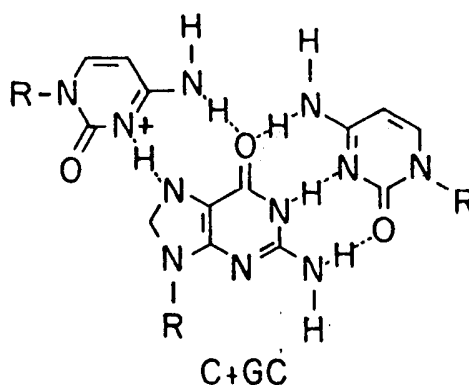


GC

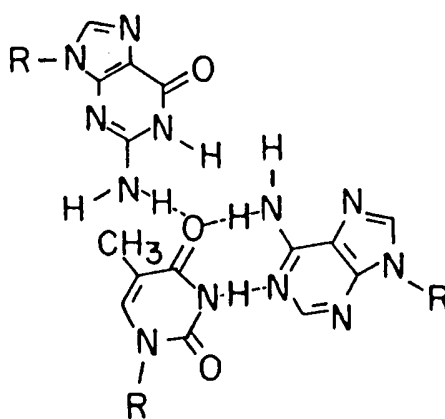
1B. ÁBRA



T·AT

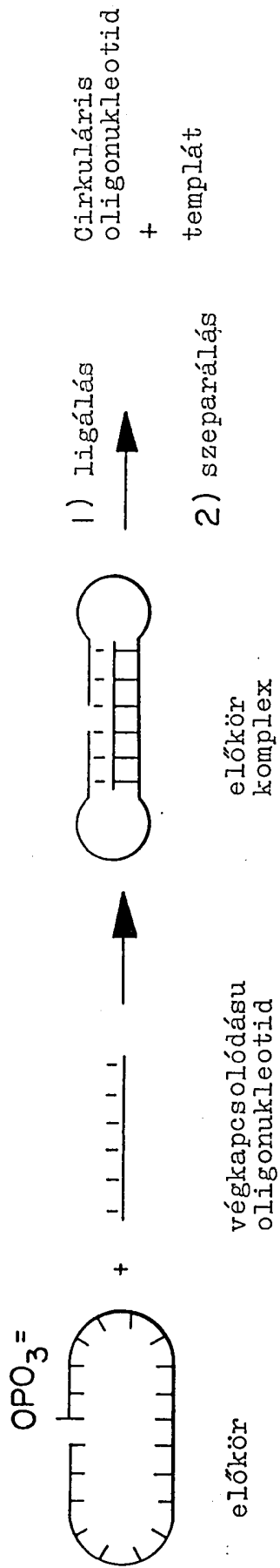


C+GC



G·TA

2. ÁBRA

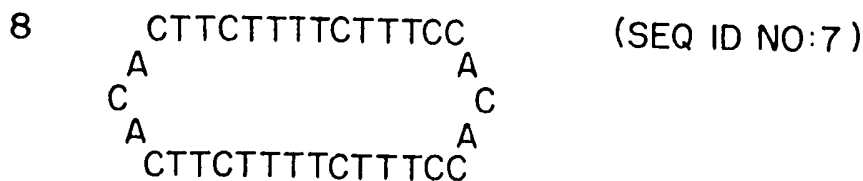
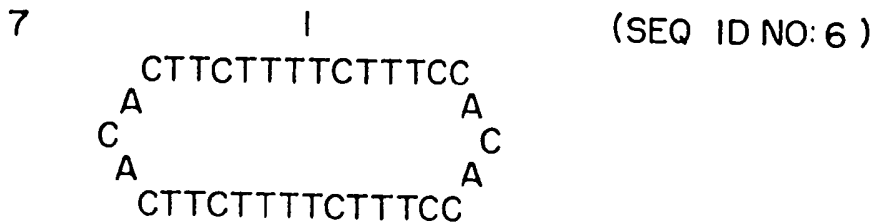
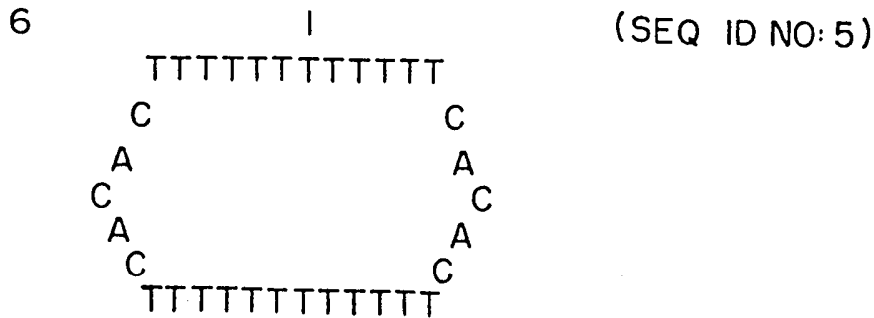


ifj. Szentpéteri Ádám
 szabadalmi ügyvivő
 az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
 Szabadalmiroda tagja
 H-1051 Budapest, Delythyáz u. 10.
 Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

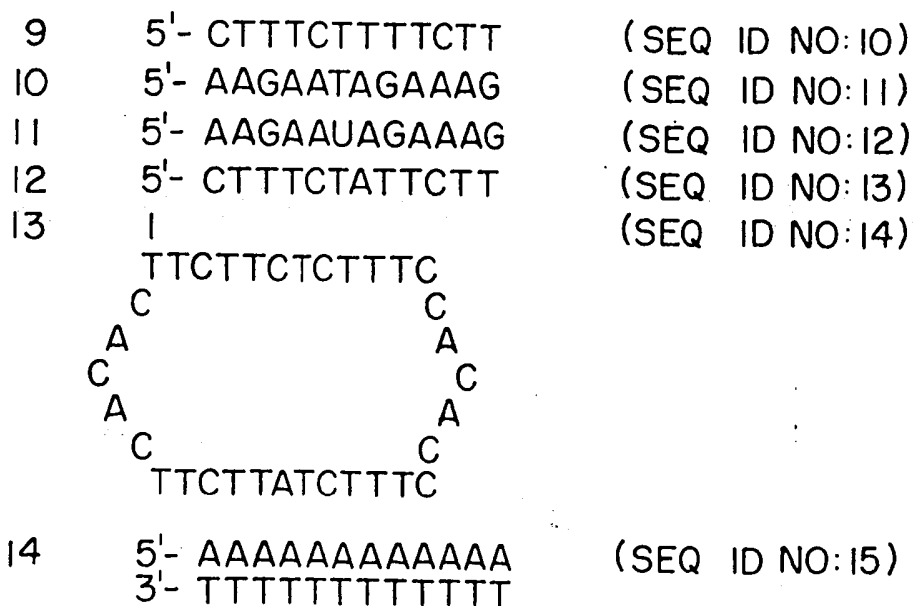
3. ÁBRA

Előkörök (1-3), Célok (4-5), Lineáris oligonukleotidok /9/ és Körök (6-8), melyeket a kísérletekben használtunk

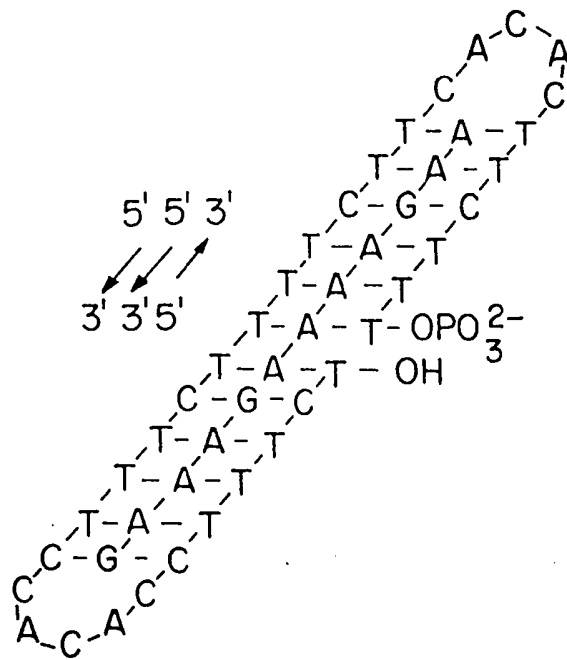
- 1 5'-TTTTTTCACACTTTTTTTTTTTTTTCACACTTTTTTT (SEQ ID NO:5)
 2 5'-TCTTTCCACACCTTTCTTTTCTTTCACACTTCTTT (SEQ ID NO:6)
 3 5'-TTTCTTCACACTTCTTTTCTTTCCACACCTTTCT (SEQ ID NO:7)
 4 5'-AAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO:8)
 5 5'-AAGAAAAGAAAG (SEQ ID NO:9)



3. ÁBRA
folytatás

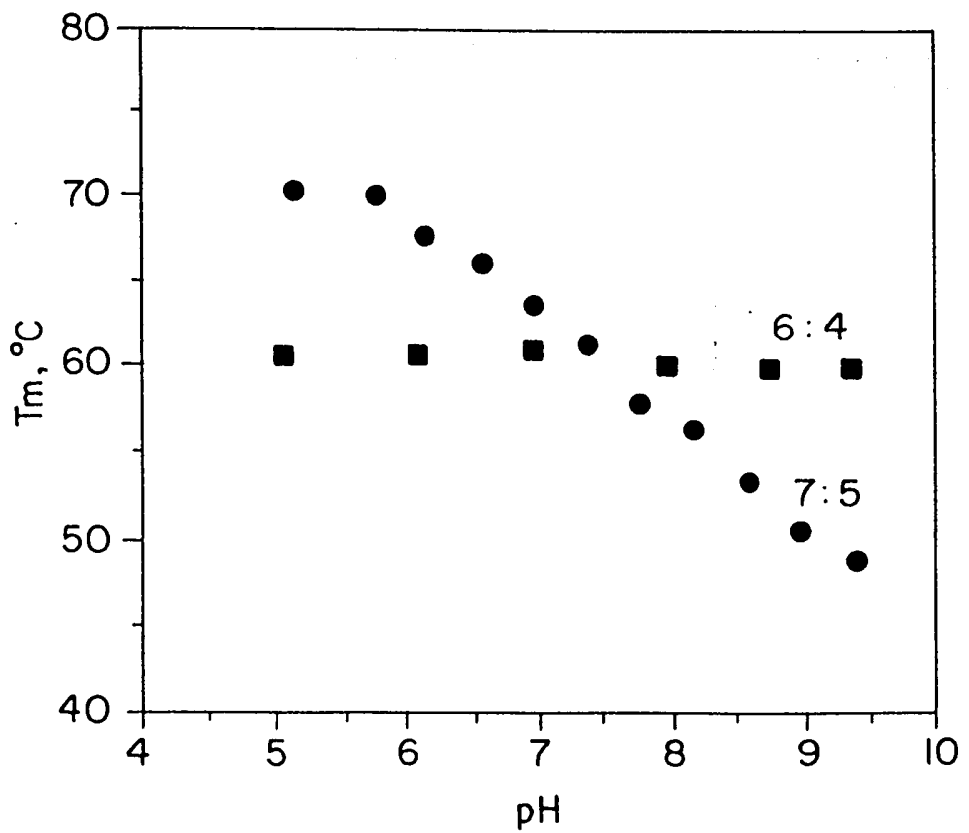


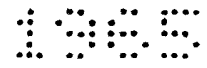
4. ÁBRA



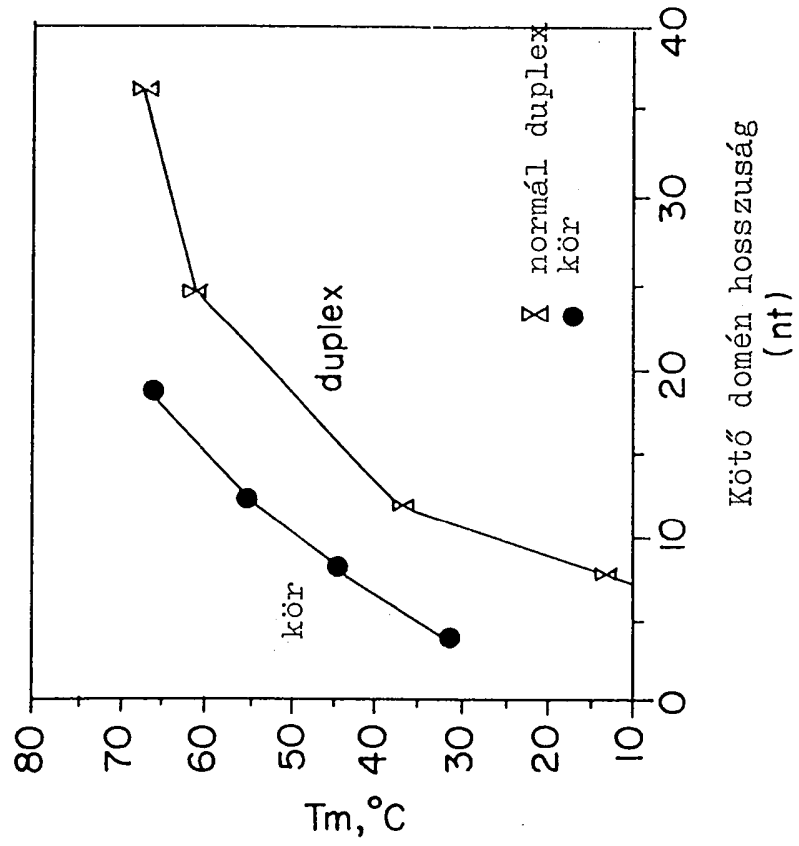
a pH hatása a T_m-re

5. ÁBRA

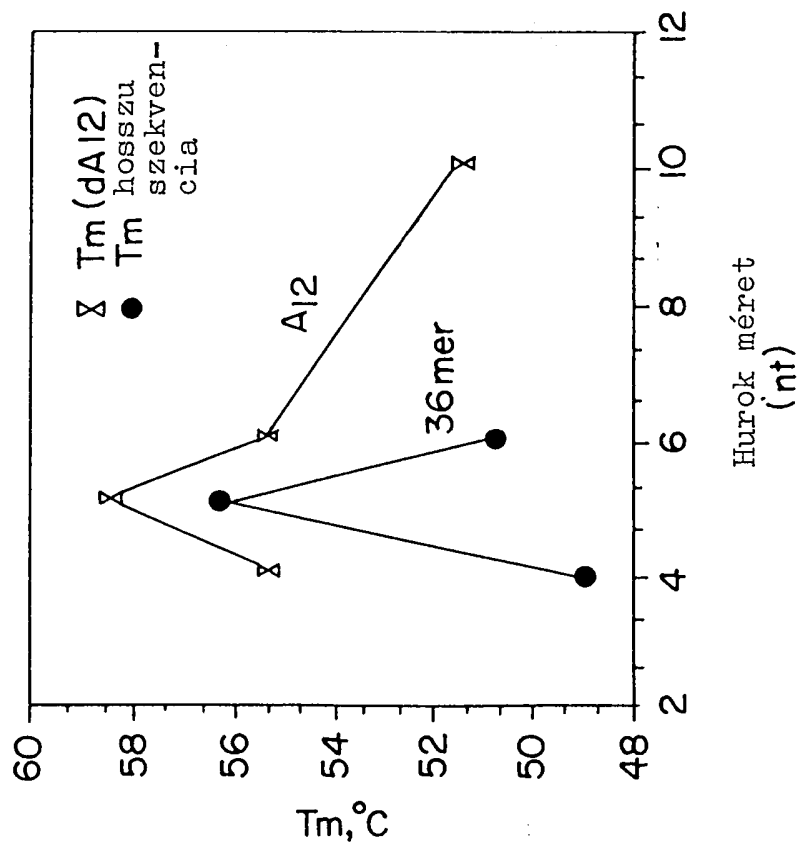




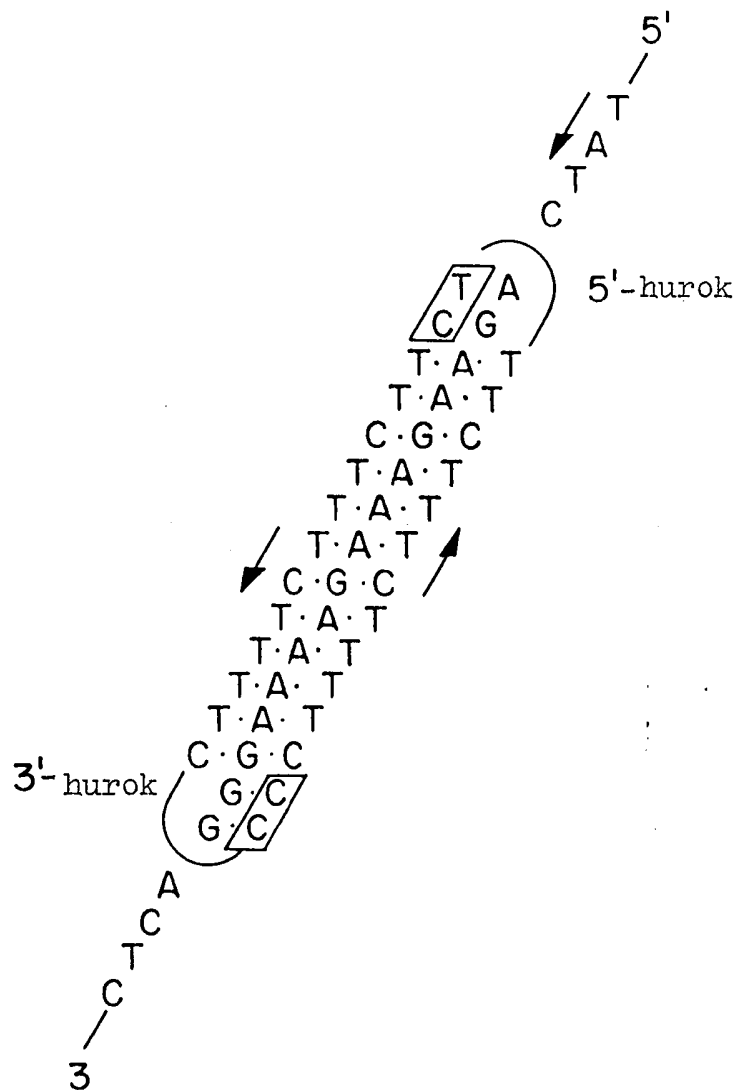
6B. ÁBRA



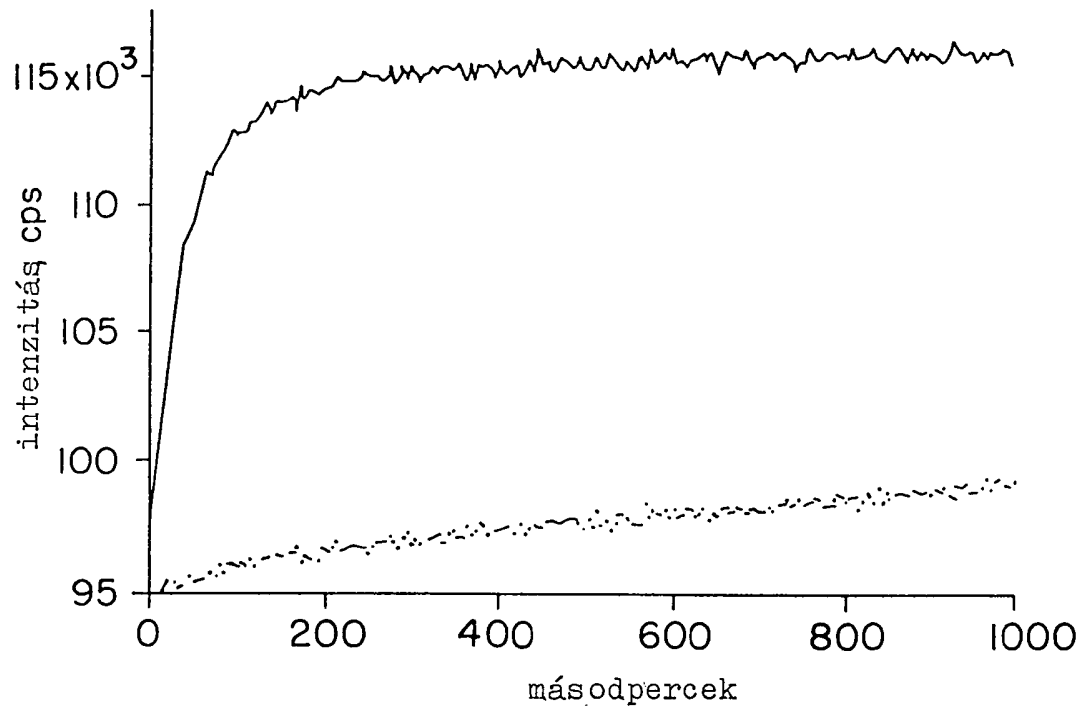
6A. ÁBRA



7. ÁBRA



8. ÁBRA



9. ÁBRA

