

(19)



(10) **LT 6214 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patent numeris: **6214** (51) Int. Cl. (2015.01): **C12N 15/00**  
**A61P 43/00**
- (21) Paraiškos numeris: **2013 109**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2013 10 07**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2015 04 27**
- (45) Patent paskelbimo data: **2015 08 25**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —
- (30) Prioritetas: —
- (72) Išradėjas:  
**Dan ERICSON, SE**  
**Tomas KAČERGIUS, LT**
- (73) Patent savininkas:  
**UAB „Bioseka”, Jogailos g. 9/1, LT-01116 Vilnius, LT**
- (74) Patentinis patikėtinis/atstovas:  
**Vaclovas KIŠKIS, Adomaičiai, Lavoriškių p-tas, LT-15032 Vilniaus raj., LT**

- (54) Pavadinimas:  
**Priešprasminiai oligonukleotidai aterosklerozės ir kardiovaskulinių infekcijų prevencijai**

- (57) Referatas:

Šis išradimas yra iš mikrobiologijos srities. Išradimas siūlo priešprasminius oligonukleotidus (PO), farmacinės kompozicijas, apimančias PO, būdą slopinti bakterinių bioplėvelių atsiradimą ir augimą žmogaus kardiovaskuliniuose audiniuose ir žmogaus kraujo terpėje, siekiant aterosklerozės ir kardiovaskulinių infekcijų prevencijos ir gydymo.

Šis išradimas yra mikrobiologijos srities ir yra susijęs su bakterinių bioplėvelių atsiradimu ir augimu žmogaus kardiovaskuliniuose audiniuose ir kraujo terpėje. Šis išradimas konkrečiai susijęs su bakterinių bioplėvelių sukeltos aterosklerozės ir kardiovaskulinių infekcijų prevencija ir gydymu, panaudojant priešprasminius oligonukleotidus ir jų farmacines kompozicijas.

#### Išradimo pagrindas

Širdies ir kraujagyslių ligos yra vienos iš dažniausių mirties priežasčių pasauliniu mastu (S. Mendis, P. Puska, B. Norrving. *Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control*. World Health Organization, Geneva (2011), p. 8-14). Šių ligų spektras yra labai platus ir apima tokias sunkias, grėšiančias gyvybei būkles kaip išeminę (koronarinę) širdies ligą, miokardo infarktą bei insultą. Fundamentinė to priežastis – aterosklerozė, kada dėl susidariusių aterosklerozinių plokštelių susiaurėja arterinių kraujagyslių spindis. Savo ruožtu, aterogenezės priežastys yra kompleksinės įskaitant hiperlipidemiją, padidėjusį kraujo krešėjimą, oksidacinį stresą, kraujagyslių endotelio disfunkciją, taip pat infekciją ir uždegimą, pažeidžiantį kraujagyslių sienelės.

Remiantis žinomais ir pripažintais moksliniais tyrimais infekcijos veiksnys aterogenezėje yra labai reikšmingas, ypač turint omeny tuos mikroorganizmus, kurie sudaro normaliąją žmogaus mikroflorą (Koren ir kt. *Human oral, gut and plaque microbiota in patients with atherosclerosis*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 108 [Suppl. 1] (2011), p. 4592-4598).

Vienas iš žmogaus kardiovaskulinės sistemos infekcijų šaltinių yra normaliąją žmogaus mikroflorą sudarantys streptokokai. Tarp jų išskirtinos rūšys yra *S. mutans* ir *S. sobrinus*, įprastai randami žmogaus burnoje. Šių rūšių streptokokai be kita ko geba suformuoti vandenyje netirpią bakterinę bioplėvelę ant burnos audinių paviršiaus. Šių bakterijų formuojamos biologinės plėvelės struktūrinį karkasą sudaro netirpus polimeras – gliukanas, kurį iš sacharozės sintezuoja kelių tipų gliukoziltransferazės (Gtf) izofermentai, t. y. *S. mutans* GtfB ir GtfC bei *S. sobrinus* GtfI (Bowen ir Koo. *Biology of Streptococcus mutans-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms*. Caries Res. 45 (2011), p. 69-86). Gliukoziltransferazės lokalizuojasi ne tik ant bakterijų sienelės, bet ir yra išskiriamos į aplinką laisvoje formoje. Dėl šių fermentų veiklos *S. mutans*, *S. sobrinus* ir kitos burnos

bakterijos gali tvirtintis praktiškai prie bet kokių paviršių, tarp jų žmogaus audinių, nes susidarantis gliukanas savo fizinėmis savybėmis yra labai lipni medžiaga. Todėl Gtf fermentai tapę svarbiu taikiniu kuriant įvairias farmakologiškai aktyvias medžiagas, slopinančias *S. mutans* bei *S. sobrinus* bakterijų adheziją.

Dėl kasdienių burnos audinių pažeidimų, kitų patologinių būsenų, taip pat atliekant medicininės intervencijas burnoje, sukeliančias reikšmingą bakteriemiją, *S. mutans* bei *S. sobrinus* patenka į žmogaus kraują ir kardiovaskulinę sistemą (Nakano ir kt. *Streptococcus mutans and cardiovascular diseases*. J. Dent. Sci. Rev. 44 (2008), p. 29-37).

Žmogaus kraujyje yra gryna forma randami gliukozės monomerai, kurių *S. mutans* bei *S. sobrinus*, taip pat jų išskiriamos gliukoziltransferazės gali panaudoti gliukanų sintezei. Bakterijų išskiriamos gliukoziltransferazės iš kraujo gliukozės gali sintezuoti šį lipnų polimerą, prilipantį prie kraujagyslių sienelių ir tampantį adhezijos židiniais trombocitams ir jų agregacijai kardiovaskuliniuose audiniuose.

Žinomais ir plačiai pripažintais moksliniais tyrimais nustatyta, kad žmogaus širdies vožtuvų audiniuose bei aterosklerozinėse plokštelėse *S. mutans* aptinkamas labai dideliu dažniu – 65% ir 75% atvejų atitinkamai (Nakano ir kt. *Detection of cariogenic Streptococcus mutans in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens*. J. Clin. Microbiol. 44 (2006), p. 3313-3317; Nakano ir kt. *Detection of oral bacteria in cardiovascular specimens*. Oral Microbiol. Immunol. 24 (2009), p. 64-68). Be to, *S. sobrinus* taip pat identifikuojamas aterosklerozinėse plokštelėse, tačiau mažesniu dažniu. Tai rodo, kad šie burnos streptokokai yra susiję su aterosklerozės patogenezė.

*S. mutans* ir *S. sobrinus* vaidmuo aterosklerozės raidoje susijęs su šių bakterijų išskiriamų gliukoziltransferazių veikla – gliukano sinteze. Tyrimais nustatyta, kad *S. mutans* padermės, turinčios defektus *gtfB* ir *gtfC* genuose, pasižymi ryškiai mažesnėmis savybėmis sukelti trombocitų agregaciją kraujyje palyginus su normaliomis („laukinėmis“) *S. mutans* bakterijomis (Taniguchi ir kt. *Defect of glucosyltransferases reduces platelet aggregation activity of Streptococcus mutans: Analysis of clinical strains isolated from oral cavities*. Arch. Oral Biol. 55 (2010), p. 410-416). Taigi streptokokų gliukoziltransferazių raiškos slopinimas praktiškai yra svarbus ne tik dantų ėduonies, bet ir širdies bei kraujagyslių ligų prevencijai.

Čia aprašytas patentuojamas išradimas pateikia būdą kaip užslopinti ir/arba sumažinti *S. mutans* ir *S. sobrinus* bakterinės plėvelės formavimąsi žmogaus kardiovaskuliniuose audiniuose ir kraujo terpėje, tame tarpe kraujo serume. Šis metodas remiasi priešprasminių oligonukleotidų (PO), selektyviai slopinančių *S. mutans gtfB* ir *gtfC* bei *S. sobrinus gtfI* genų raišką, panaudojimu. Taip slopinant gliukoziltransferazių ir tolimesnėje pasekoje gliukano sintezę. Gliukano sintezės inhibicija užkerta kelią bakterinės bioplėvelės susidarymui, kurie savo ruožtu sąlygoja aterosklerozės bei *S. mutans* ir *S. sobrinus* sukeltų kardiovaskulinių infekcijų, tokių kaip bakterinis endokarditas, profilaktiką bei prevenciją, taip pat aterosklerozinių plokštelių formavimosi slopinimą ir mažinimą.

Be to, išradime pateikiamas PO ir bakterinių bioplėvelių sintezės slopinimo būdas panaudojamas įvairių paviršių besiliečiančių su žmogaus krauju ir audiniais, pvz., vamzdelių, kateterių, dializės membranų, zondų, vožtuvų, protezų, implantų ir pan., apdorojimui, siekiant antibakterinio poveikio nukreipto į *S. mutans* ir *S. sobrinus* bakterijas, patekusias ant tokių paviršių. Paminėtina, kad bakterijos patekusios ant šių paviršių, pvz., kateterių, implantų ar protezų, sintezuojamų gliukanų pagalba tvirtai prilimpa ir suformuoja bakterines bioplėveles, kurios apriboja organizmo imuninės sistemos galimybes sunaikinti bakterijas. Bakterijų suformuotos bioplėvelės ant vamzdelių, kateterių, dializės membranų, zondų skatina aterosklerozės židinių formavimąsi kraujotakos sistemoje, tuo tarpu bakterinės bioplėvelės ant širdies vožtuvų arba kaulų ar sąnarių implantų sąlygoja uždegiminius procesus ir implantų atmetimą, taip sukeldamos ypatingai sudėtingas ir gyvybei pavojingas patologines būkles.

Apibendrinant išdėstytą, patentuojami PO ir būdas kompleksiskai sprendžia aterosklerozės, kardiovaskulinių ir susijusių infekcijų profilaktikos, prevencijos ir gydymo problemas.

#### Išradimo esmė

Kaip aptarta aukščiau, yra aktualus poreikis spręsti aterosklerozės, kardiovaskulinių ir susijusių infekcijų profilaktikos, prevencijos ir gydymo problemas, kurias sukelia bakterijos patekusios į kraujotakos sistemą, į kardiovaskulinius audinius ir kitus objektus kurie kontaktuoja su krauju ir kardiovaskulinės sistemos audiniais. Šis

išradimas apima medžiagas ir būdą, kurie sprendžia šias problemas, ypač bakterinių bioplėvelių ir bakterinių gliukanų sąlygojamą aterosklerozės vystymąsi bei kardiovaskulinės sistemos infekcijas.

Pagrindinis patentuojamas išradimo objektas yra medžiaga – izoliuoti priešprasminiai oligonukleotidai (PO), atitinkantis šiuos požymius:

- a) PO sudaryti iš nukleotidų sekų pagal SEQ ID nr. 1, 13, 19;
- b) PO sudaryti iš nukleotidų sekų, kurie yra SEQ ID nr. 1, 13, 19 fragmentai; arba
- c) PO, kurių nukleotidų sekos ne mažiau kaip 85% sutampa su sekomis nurodyta SEQ ID nr. 1, 13, 19.

Taip pat išradimo objektas yra PO, kurių nukleotidų sekos skiriasi nuo SEQ ID nurodytos SEQ ID nr. 1, 13, 19, vienu, dviem, trim arba keturiais nukleotidais, tarp jų PO fragmentai, kurių nukleotidų sekos parinktos iš šių sekų grupės: SEQ ID nr. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 20, 21, 22, 23, 24.

PO, bet kuria iš aukščiau nurodytų formų, gali būti konjuguoti su peptidu palengvinančiu prasiskverbimą per bakterijos ląstelės sienelę.

Taip pat išradimo objektas yra PO, bet kuria iš aukščiau nurodytų formų, panaudojami aterosklerozinių plokštelių ir/ar židinių susiformavimo profilaktikai, prevencijai, slopinimui ir mažinimui žmogaus kardiovaskuliniuose audiniuose ir/ar kraujo terpėje, kurios komponentas yra kraujo serumas.

Taip pat išradimo objektas yra biofarmacinė kompozicija, kurią sudaro PO, bet kuria iš aukščiau nurodytų formų, ir kitos dalys, skirta biofarmaciniam ir medicininiam panaudojimui.

Taip pat išradimo objektas yra biofarmacinė kompozicija, kurią sudaro PO, bet kuria iš aukščiau nurodytų formų, ir kitos dalys, tarp jų biofarmacijoje naudojami adjuvantai ir/ar nešėjai.

Taip pat išradimo objektas yra biofarmacinė kompozicija, kurią sudaro PO, bet kuria iš aukščiau nurodytų formų, ir kitos dalys, kurioje naudojamas nešėjas yra katijoninis polimeras.

Taip pat išradimo objektas yra biofarmacinė kompozicija, kurią sudaro PO, bet

kuria iš aukščiau nurodytų formų, ir kitos dalys, skirta aterosklerazės gydymui ar prevencijai.

Taip pat išradimo objektas yra biofarmacinė kompozicija, kurią sudaro PO, bet kuria iš aukščiau nurodytų formų, ir kitos dalys, skirta bakterinio endokardito gydymui ar prevencijai.

Taip pat išradimo objektas yra biofarmacinė kompozicija, kurią sudaro PO, bet kuria iš aukščiau nurodytų formų, ir kitos dalys, skirta paviršių besiliečiančių su žmogaus krauju ir audiniais, pvz., vamzdelių, kateterių, dializės membranų, zondu, vožtuvų, protezų, implantų ir pan., apdorojimui, siekiant antibakterinio poveikio nukreipto į *S. mutans* ir *S. sobrinus* ant tokių paviršių.

Taip pat išradimo objektas yra biofarmacinė kompozicija, kurią sudaro PO, bet kuria iš aukščiau nurodytų formų, ir kitos dalys, skirta paviršių besiliečiančių su žmogaus krauju ir audiniais, pvz., vamzdelių, kateterių, dializės membranų, zondu, vožtuvų, protezų, implantų ir pan., apdorojimui, aterosklerozinių plokštelių ir/ar židinių susiformavimo profilaktikos, prevencijos, slopinimo ir mažinimo ant tokių paviršių.

Taip pat išradimo objektas yra biofarmacinė kompozicija, kurią sudaro PO, bet kuria iš aukščiau nurodytų formų, ir kitos dalys, skirtas paviršių besiliečiančių su žmogaus krauju ir audiniais, pvz., vamzdelių, kateterių, dializės membranų, zondu, vožtuvų, protezų, implantų ir pan., apdorojimui, siekiant sumažinti bakterinių bioplėvelų atsiradimą ir augimą.

Galiausiai išradimas apima *S. mutans* ir *S. sobrinus* bakterijų kolonijų kontrolės būdą, kuris apima šių bakterijų gebėjimo sintetinti bioplėvelių karkasą sudarančių egzopolisacharidų slopinimą, panaudojant PO, specifiskai ir vienu metu slopinančio *gtfB* ir *gtfC* iRNR raišką *S. mutans* bakterijoje ir *gtfI* iRNR raišką *S. sobrinus* bakterijoje, administravimą, taip vienu metu slopinant šių bakterijų gebėjimą sintezuoti vandenyje netirpių gliukanų ir dalinai vandenyje tirpių gliukanų polimerus.

Iliustracijų aprašymas

Fig. 1 rodo nukleotidų SEQ ID nr. 14 fragmentą:

5'-

UCUGUUAAGAUUAAGCAAUGGUCUGCCAAGUACUUUAAUGGGACAAAUAU

UUUAGGGCGCGGAGCAGGCUAUGUCUUAAGA-3',

pateiktą

originaliame Mfold programos formato rezultatuose, prognozuojančiuose *S. mutans* *gtfB* iRNR antrinės struktūros modelį su apibrėžta priešprasminio oligonukleotido prisijungimo sritimi. Kaip matoma šiame modelyje, apibrėžta sritis turi rutulinę kilpą, kuri yra sudaryta iš nesuporuotų nukleotidų (5'-UAAGCA-3'), lemiančių tai, kad pasirinkti PO gali būti stiprūs konkurentai heteroduplekso formavimesi. Simboliai „– – – – –“ ir „\“ reiškia sąryšį tarp atitinkamų nukleotidų ir jie yra panaudoti geresniam rutulinių ir smeigtukinių kilpų atvaizdavimui. Kaip parodyta Fig. 1, *gtfB* iRNR sritis prasideda nuo 3049 nt, o apibrėžta PO prisijungimo vieta prasideda nuo 3056 nt – tai yra taip pat kaip ir *S. mutans gtfB* gene (žr. 1 pavyzdį).

Fig. 2 (fig. 2a, 2b ir 2c) rodo stikliuko su *S. mutans* kultūros bioplėvele optinį paviršiaus profilį po 24 val. inkubacijos su skirtingais poveikiais Todd Hewitt buljone, turinčiame 1% sacharozės:

fig. 2a – bioplėvelės paviršiaus optinis profilis esant PO1 + TurboFect™ poveikiui;

fig. 2b – bioplėvelės paviršiaus optinis profilis esant PO2 + TurboFect™ poveikiui;

fig. 2c – bioplėvelės paviršiaus optinis profilis esant PO3 + TurboFect™ poveikiui. Padidinimas ×50. 1 lentelėje taip pat pateikti duomenys, susiję su Fig. 2

Fig. 3 rodo *S. mutans* kultūrų, augančių Todd Hewitt buljone be sacharozės (fig. 3a ) ir su 1% sacharozės (fig. 3b, 3c, 3d), optinius tankius 24 val. poveikiuose su nukleazių neturinčiu vandeniu (fig. 3a, 3b, 3c ), TurboFect™ reagentu (fig. 3a, 3b) arba abiejų kartu (fig. 3b, 3d), tik su PO (fig. 3c ) arba jų kombinacija su TurboFect™ (fig. 3d ).

Simboliai: ◆, terpė be bakterijų ir poveikių; ■, nepaveiktos bakterijos; ▲, nukleazių neturintis vanduo; ◇, TurboFect™; ●, nukleazių neturintis vanduo + TurboFect™; ○, PO1 arba PO1 + TurboFect™; ×, PO2 arba PO2 + TurboFect™; \*, PO3 arba PO3 + TurboFect™.

Fig. 4 rodo Gramo būdu dažytų *S. mutans* bakterijų morfologiją po 24 val.

inkubacijos Todd Hewitt buljone esant skirtingiems poveikiams:

fig. 4a – bakterijos, augančios terpėje be sacharozės;

fig. 4b – bakterijos, augančios terpėje su 1% sacharoze;

fig. 4c – bakterijos esant PO1 + TurboFect™ poveikiui Todd Hewitt buljone su 1% sacharoze;

fig. 4d – bakterijos esant PO2 + TurboFect™ poveikiui Todd Hewitt buljone su 1% sacharoze;

fig. 4e – bakterijos esant PO3 + TurboFect™ poveikiui Todd Hewitt buljone su 1% sacharoze. Padidinimas  $\times 100$  (imersinė sistema).

Fig. 5 rodo *S. mutans* kultūrų, augančių Todd Hewitt buljone be sacharozės, optinius tankius 24 val. poveikiuose su nukleazių neturinčiu vandeniu (fig. 5a, 5b), TurboFect™ reagentu (fig. 5a) arba abiejų kartu (fig. 5a, 5c), tik su PO (fig. 5b) arba jų kombinacija su TurboFect™ (fig. 5c).

Simboliai: ◆, terpė be bakterijų ir poveikių; ■, nepaveiktos bakterijos; ▲, nukleazių neturintis vanduo; ◇, TurboFect™; ●, nukleazių neturintis vanduo + TurboFect™; ○, PO1 arba PO1 + TurboFect™; ×, PO2 arba PO2 + TurboFect™; \*, PO3 arba PO3 + TurboFect™.

Fig. 6 rodo gliukoziltransferazės genų daugybinių sekų palyginamąją atranką tarp įvairių *Streptococcus* rūšių ir padermių atliktą panaudojant MAFFT programos internetinį serverį, esantį Max Planck Institute for Development Biology. Konservatyvi tikslinė sritis (sudaryta iš 26 nukleotidų: 5'-GTTAAGATTAAGCAATGGTCTGCCAA-3', turinti SEQ ID nr. 16) yra apibrėžta dideliame stačiakampyje, o nesutapimai yra apibrėžti mažuose stačiakampiuose. Paveiksle nurodytos *Streptococcus* rūšys ir padermės yra šios:

|                               |   |                             |       |
|-------------------------------|---|-----------------------------|-------|
| ENA AAN58705 AAN5870_0/1-4431 | – | <i>Streptococcus mutans</i> | UA159 |
| gliukoziltransferazė-I;       |   |                             |       |

|                               |   |                             |       |
|-------------------------------|---|-----------------------------|-------|
| ENA AAN58706 AAN5870_1/1-4368 | – | <i>Streptococcus mutans</i> | UA159 |
|-------------------------------|---|-----------------------------|-------|

gliukoziltransferazė-SI;

ENA|D88654|D88654.1\_2/1-5684 – *Streptococcus mutans* gliukoziltransferazės-I genas, pilna koduojanti seka, klonas:PYT216;

ENA|D88660|D88660.1\_3/1-5684 – *Streptococcus mutans* gliukoziltransferazės-I genas, pilna koduojanti seka, klonas:PYT223;

ENA|D89977|D89977.1\_4/1-5684 – *Streptococcus mutans* gliukoziltransferazės-I genas, pilna koduojanti seka, klonas:PTH1;

ENA|D88657|D88657.1\_5/1-5686 – *Streptococcus mutans* gliukoziltransferazės-I genas, pilna koduojanti seka, klonas:PYT239;

ENA|M17361|M17361.1\_6/1-10029 – *Streptococcus mutans* gliukoziltransferazių (*gtfB* ir *gtfC*) genai, pilnos koduojančios sekos;

ENA|D88651|D88651.1\_7/1-5684 – *Streptococcus mutans* gliukoziltransferazės-I genas, pilna koduojanti seka, klonas:PSK6;

ENA|AB299801|AB29980\_8/1-4410 – *Streptococcus criceti gtfI* gliukoziltransferazės-I genas, pilna koduojanti seka;

ENA|AB273728|AB27372\_9/1-4930 – *Streptococcus criceti gtfI* gliukoziltransferazės-I genas, pilna koduojanti seka, padermė: GTC242;

ENA|AB355819|AB35581\_10/1-4602 – *Streptococcus dentirousetti gtfI* gliukoziltransferazės-I genas, pilna koduojanti seka;

ENA|AB275384|AB27538\_11/1-5423 – *Streptococcus dentisuis gtfI* gliukoziltransferazės-I genas, pilna koduojanti seka;

ENA|AB272987|AB27298\_12/1-4984 – *Streptococcus orisuis gtf* gliukoziltransferazės genas, pilna koduojanti seka;

ENA|D63570|D63570.1\_13/1-6838 – *Streptococcus sobrinus* gliukoziltransferazės-I genas, pilna koduojanti seka;

ENA|M17391|M17391.1\_14/1-4995 – *Streptococcus downei* gliukoziltransferazės geno pirmtakas, pilna koduojanti seka.

Fig. 7 rodo gliukoziltransferazės genų daugybinių sekų palyginamąją atranką tarp įvairių *Streptococcus* rūšių ir padermių, aptinkamų žmogaus organizme, atliktą panaudojant MAFFT programos internetinį serverį, esantį Max Planck Institute for Development Biology. Konservatyvi tikslinė sritis (sudaryta iš 26 nukleotidų: 5'-

CGCGTCATGTTTGAAGGTTTCTCTAA-3', turinti SEQ ID nr. 18) yra apibrėžta stačiakampyje. Fig. 7 nurodytos *Streptococcus* rūšys ir padermės yra šios:

ENA|AAN58705|AAN5870\_0/1-4431 – *Streptococcus mutans* UA159 gliukoziltransferazė-I;

ENA|AAN58706|AAN5870\_1/1-4368 – *Streptococcus mutans* UA159 gliukoziltransferazė-SI;

ENA|D88654|D88654.1\_2/1-5684 – *Streptococcus mutans* gliukoziltransferazės-I genas, pilna koduojanti seka, klonas:PYT216;

ENA|D88660|D88660.1\_3/1-5684 – *Streptococcus mutans* gliukoziltransferazės-I genas, pilna koduojanti seka, klonas:PYT223;

ENA|D89977|D89977.1\_4/1-5684 – *Streptococcus mutans* gliukoziltransferazės-I genas, pilna koduojanti seka, klonas:PTH1;

ENA|D88657|D88657.1\_5/1-5686 – *Streptococcus mutans* gliukoziltransferazės-I genas, pilna koduojanti seka, klonas:PYT239;

ENA|M17361|M17361.1\_6/1-10029 – *Streptococcus mutans* gliukoziltransferazių (*gtfB* ir *gtfC*) genai, pilnos koduojančios sekos;

ENA|D88651|D88651.1\_7/1-5684 – *Streptococcus mutans* gliukoziltransferazės-I genas, pilna koduojanti seka, klonas:PSK6;

ENA|D63570|D63570.1\_13/1-6838 – *Streptococcus sobrinus* gliukoziltransferazės-I genas, pilna koduojanti seka.

Fig. 8 rodo stikliuko su maišytos *S. mutans* ir *S. sobrinus* kultūros bioplėvelės optinį paviršiaus profilį po 24 val. inkubacijos su skirtingais poveikiais Todd Hewitt buljone, turinčiame 10% kraujo serumo ir 1% sacharozės:

fig. 8a – bioplėvelės paviršiaus optinis profilis nesant poveikiams;

fig. 8b – bioplėvelės paviršiaus optinis profilis esant PO1 + TF (TurboFect™) poveikiui;

fig.8c – bioplėvelės paviršiaus optinis profilis esant PO3 + TF (TurboFect™) poveikiui. Padidinimas ×50.

Fig. 9 rodo maišytos *S. mutans* ir *S. sobrinus* kultūros bioplėvelės kiekius,

susidariusios ant stikliuko paviršiaus, po 24 val. inkubacijos su skirtingais poveikiais Todd Hewitt buljone, turinčiame 10% serumo ir 1% sacharozės:

fig. 9a – bioplėvelės paviršiaus šiurkštumo parametras Rq;

fig. 9b – bioplėvelės storis.

Kontrolė – stikliuko paviršius po 24 val. inkubacijos Todd Hewitt buljone, turinčiame 10% kraujo serumo ir 1% sacharozės, tačiau be bakterijų; nepaveiktos bakterijos (fig. 9a, 9b juodas stulpelis) – tai yra bakterijos, inkubuotos 24 val. Todd Hewitt buljone su 10% serumo, tačiau be sacharozės ir poveikių; nepaveiktos bakterijos (fig. 9a, 9b baltas stulpelis) – tai yra bakterijos, inkubuotos 24 val. Todd Hewitt buljone su 10% serumo ir 1% sacharozės, tačiau be poveikių; PO + TF – tai yra priešprasminis oligonukleotidas + TurboFect™ reagentas. Reikšmės ( $n = 6$  [šiurkštumas Rq];  $n = 5$  [storis]) yra nurodytos kaip vidurkiai  $\pm$  standartinė vidurkio paklaida.  $*p < 0,05$  palyginus su nepaveiktomis bakterijomis (baltas stulpelis),  $**p < 0,05$  palyginus su PO3 + TF.

#### Sąvokų apibrėžimai

Šiame dokumente naudojama sąvoka „*priešprasminis poveikis*“ reiškia oligonukleotido poveikį, kuris susidaro po to kai sudaromas junginys su papildoma seka, esančia iRNR, lemiantis specifinį geno raiškos ir baltymo transliacijos slopinimą.

Šiame dokumente naudojama sąvoka *priešprasminiai oligonukleotidai (PO)* apibūdina preparatus, kurie yra chemiškai modifikuotos arba nemodifikuotos viengubos nukleorūgšties molekulės (paprastai 15-30 nt ilgio), galinčios selektyviai jungtis su savo taikiniu iRNR sekoje pagal Watson-Crick susiporavimo principą. PO-iRNR heterodupleksų formavimasis sąlygoja šiuos efektus:

- 1) aktyvuojama RNazė H endonukleazė arba bakterijų endoribonukleazės – RNazė III ir RNazė E – lemiančios iRNR degradaciją, tačiau paliekant PO nepažeistą;
- 2) sąlygojama transliacijos inhibiciją per ribosomų veiklos sterinį blokavimą;
- 3) slopinamas iRNR susijungimas;
- 4) destabilizuojamas iRNR pirmtakas.

Kuris efektas pasireišk, priklauso nuo PO cheminės struktūros ir hibridizacijos

vietos, tačiau vėlesni rezultatai yra konkretaus geno-taikinio raiškos ir baltymų transliacijos derereguliacija.

„Nukleotidų seka“, „nukleorūgštis“, „nukleorūgšties grandinė“ ir „nukleorūgšties seka“ reiškia, kad bet kas, kas jungiasi arba hibridizuojasi per bazių susijungimą įskaitant oligomerus arba polimerus, turinčius pagrindą, suformuotą iš natūraliai atsirandančių nukleotidų, tokių kaip DNR (dezoksiribonukleino rūgštis) arba RNR (ribonukleorūgštis) ir/arba nukleorūgšties analogai, susidedantys iš nestandartinių nukleobazių ir/arba nestandartinių karkasų, pavyzdžiui, peptidinė nukleorūgštis (PNR) arba užrakinta nukleorūgštis (UNR), arba be kokia išvestinė arba modifikuota nukleorūgšties forma, tame tarpe ir pakeitimai siekiant padidinti stabilumą ir atsparumą nukleazėms.

Šiame dokumente naudojama sąvoka „peptidinė nukleorūgštis“ arba „PNR“ reiškia sintetinį oligomerą arba polimerą, turintį poliamido pagrindą su prisijungusiomis nukleobazėmis (atsirandančiomis natūraliai arba modifikuojamomis), įskaitant, bet neapsiribojant, bet kokie oligomerų ar polimerų segmentai nurodyti ar įvardinti kaip peptidinės nukleorūgštys JAV Pat. Nr. 5539082, 5527675, 5623049, 5714331, 5718262, 5736336, 5773571, 5766855, 5786461, 5837459, 5891625, 5972610, 5986053, 6107470 6201103, 6228982 ir 6357163, WO96/04000, kurie visi yra įtraukti kaip nuorodos arba yra naudojami kaip nuorodos kituose cituotuose dokumentuose. Prisijungusi nukleobazė, pavyzdžiui, purino ar pirimidino bazė PNR gali būti prijungta prie karkaso naudojantis viena iš jungčių apibūdintų PCT/US02/30573 ar bet kurioje kitoje nuorodoje, esančioje šiame dokumente. Jame PNR turi N-(2-aminoetilo)-glicino) pagrindą. PNR gali būti susintetinta (ir vizualiai paženklinta) kaip minima PCT/US02/30573 arba jame cituotose nuorodose. PNR stipriai jungiasi ir tai atlieka specifinio eiliškumo tvarka, su DNR ir RNR, nes PNR karkasas neturi krūvio. Taigi, trumpi PNR zondai gali demonstruoti panašią specifiką su ilgesniais DNR ir RNR zondais. PNR zondai taip pat gali rodyti didesnę detalumą prisijungiant prie papildomos DNR ar RNR.

Šiame dokumente naudojama sąvoka „užrakinta nukleorūgštis“ arba „UNR“ reiškia oligomerą arba polimerą, sudarytą bent iš vieno ar kelių UNR subvienetų.

Šiame dokumente naudojama sąvoka „UNR subvienetas“ reiškia ribonukleotidą, kuriame yra metileno tiltas, jungiantis 2'-deguonies ribozę su 4'-anglimi (žr. Kurreck *Antisense technologies. Improvement through novel chemical*

*modifications.* (Eur J Biochem 270 (2003). 1628-1644 p.)).

Nukleino rūgščių ir nukleino rūgščių analogų pavyzdžiai, naudojami kaip izoliuotas PO, taip pat apima oligomerų ir nukleotidų monomerų polimerus, tarp jų dvigubi ir viengubi deoksiribonukleotidai (DNR), ribonukleotidai (RNR) tarp jų natūraliai susiformuojančios priešprasminės RNR molekulės, tokios kaip mikroRNR (miRNR) ir mažos trukdančios (interferuojančios) RNR (siRNR), randamos eukariotinėse ląstelėse, taip pat mažos priešprasminės RNR, randamos prokariotinėse ląstelėse (bakterijose), anomerinės jų formos, natūralūs ir sintetiniai analogai ir kita. Nukleorūgšties grandinė gali būti sudaryta vien tik iš deoksiribonukleotidų, ribonukleotidų, peptidinių nukleorūgščių (PNR), užrakintų nukleorūgščių (UNR), natūralių ar sintetinių analogų, tokių kaip fosfordiamidato morfolino ir tiofosforoamidato oligonukleotidai, ar jų mišiniai. DNR, RNR ir kitos natūralios ar šiame dokumente apibūdintos sintetinės nukleorūgštys gali būti naudojamos metoduose ir išradimo kompozicijose.

Naudojant terminą „*farmaciškai tinkamas*“, pavyzdžiui, percituojant „*farmaciškai tinkamas nešėjas*“ arba „*farmaciškai tinkamas priedas*“ šiame dokumente norima pasakyti, kad medžiaga, kuri nėra biologiškai ar kaip nors kitaip nepageidaujama, t.y. medžiaga gali būti inkorporuota į farmacines kompozicijas, skiriamas pacientui, nesukeliant nepageidaujamų biologinių poveikių ar reaguojant į kitus komponentus, esančius kartu sudėtyje nesielgia žalingai. Be to, priedai ir nešėjai, esantys minimose sudėtyse, yra tinkami taikyti kardiovaskulinių audinių aplinkoje ir/ar kraujo terpėje nesukeliant jokio nepageidaujamo biologinio poveikio bei niekaip žalingai nereaguojant. Šiame dokumente yra pateikti tinkamų nešėjų ir priedų pavyzdžiai, kurių tarpe yra vanduo be nukleazų ar bet koks kitas reagentas, kurio pagalba yra suformuojamas kompaktiškas, stabilus, teigiamai įkrautas kompleksas su oligonukleotidu, skirtas saugoti nuo degradacijos ir padėti oligonukleotidui lengviau isiskverbti į bakterijų ląsteles, pavyzdžiui, komerciškai prieinamas TurboFect™ transfekcijos reagentas ir katijoninis polimeras (Thermo Fisher Scientific, Fermentas).

Šiame dokumente vartojama sąvoka „*nukleazų neturintis vanduo*“ reiškia sterilų dejonizuotą vandenį, kuriame nėra jokio tipo nukleazų, galinčių skaidyti oligonukleotidus.

Šiame dokumente vartojamas terminas „*bioplėvelė*“ reiškia bioplėvelę, sudarytą iš polisacharidų matricos, kurią sudaro daugiausia vandenyje netirpūs ir

dalinais tirpūs gliukanai ir bakterijos, galinčios iš gliukozės monomerų sintezuoti polisacharidinius polimerus, sudarančius egzopolisacharidinę matricą.

#### Išsamus išradimo aprašymas

Kaip minima šiame dokumente, bakterijų kultūros gali būti tiek *in vivo*, tiek *in vitro* kultūros, jei nėra atskirai nurodoma, kokia būtent kultūra turima omeny. Minėtos kultūros gali būti suspenduotos ant kietų paviršių, tokių kaip stiklas (*in vitro* pavyzdys kietoje būsenoje) arba kraujagyslės sienelės audiniai (*in vivo* pavyzdys kietoje būsenoje) ar bet koks kitas kietas paviršius kardiovaskulinėje sistemoje, arba implantas ar kitoks paviršius kontaktuojantis su žmogaus audiniais ir krauju.

Kaip minėta anksčiau, išradimas parodo naują būdą, skirtą bioplėvelių, tokių kaip bioplėvelė, besiformuojanti iš burnos streptokokų, ypač *S. mutans* ir *S. sobrinus*, ir bioplėvelių junginių ant kietų paviršių, pavyzdžiui, stiklo ir kraujagyslių sienelių paviršių, formavimosi mažinimui, slopinimui ar kelio tam užkirtimui.

Šiam naujam būdai taikomas efektyvus priešprasminių oligonukleotidų (PO) poveikis, siekiant vienu metu nusitaikyti ir slopinti gliukoziltransferazės iRNR išraišką kelių rūšių streptokokuose, ypač *S. mutans* ir *S. sobrinus*, tokių kaip *gtfB* ir *gtfC* gliukoziltransferazės iRNR, esančias *S. mutans* ir *gtfI* iRNR *S. sobrinus*, lemiančių vandenyje netirpių ir iš dalies vandenyje tirpių gliukano polimerų gamybos ir bakterijų ląstelių sukibimo slopinimą *S. mutans* ir *S. sobrinus* kultūrose taip lemiant bioplėvelių mažinimą, slopinimą arba kelio užkirtimą jų formavimuisi. Minėtos kultūros gali būti *in vitro* kultūros arba *in vivo* kultūros, pvz., kardiovaskulinėje sistemoje arba ant kitų kietų paviršių kontaktuojančių su žmogaus audiniais ir krauju.

Išradime patentuojamų naujų PO sekų sąrašas ir aprašymas pateiktas 1 priede.

Minėti PO gali būti chemiškai sintetinami fosforotioatų formos oligodeoksiribonukleotidai, savo sekomis atitinkantys nukleotidų SEQ ID nr. 1, 13, 19 sekas, priešprasminio efekto eksponavimui, kaip parodyta pavyzdyje, arba bet kurios kitos PO formos, apibūdintos šiame dokumente, t.y., SEQ ID nr. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 20, 21, 22, 23, 24, arba išradimo specifikacijoje nurodytas sąlygas atitinkantys PO fragmentai ar modifikacijos.

Gliukanų, sudarančių bioplėvelės egzopolisacharidinę matricą, matavimas gali būti atliktas kaip aprašyta antrame ir penktame pavyzdžiuose, kur profilometrijos

rezultatai aiškiai parodo, kad bakterijų adhezija prie stiklo paviršiaus yra stipriai sumažinama su PO molekulėmis, kurių nukleotidų seka atitinka SEQ ID nr. 1, 13 arba 19.

Bioplėvelės formavimosi mažėjimas rodo gliukano polimerų sintezės mažėjimą nes gliukanai yra būtini bioplėvelių formavimuisi, o gliukanų nebuvimas lemia bioplėvelės nesiformavimą.

Gliukanų koncentraciją bakterinių ląstelių kultūrose taip pat galima išmatuoti naudojant kitus metodus, apibūdintus Guo ir kt. „*Treatment of Streptococcus mutans with antisense oligodeoxyribonucleotides to gtfB mRNA inhibits GtfB expression and function*“ (FEMS Microbial Lett 264 (2006), 8-14 p.) ir Masuko ir kt. „*Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format*“ (Anal Biochem 339 (2005) 69-72 p.).

Kitas šio išradimo naujumo ir išradimo lygio aspektas suteikia priemones naudoti tik vieno tipo (vienos nukleotidų sekos) PO, kurie efektyviai slopina tiek vandenyje tirpius, tiek iš dalies vandenyje tirpius gliukanus *S. mutans* užkoduotus *gtfB* ir *gtfC* genais ir taip pat *S. sobrinus gtfI*.

Šis naujas būdas leidžia naudoti vienus PO bakterinėse kultūrose tam, kad paveikti du taikinius – *gtfB* ir *gtfC* iRNR *S. mutans* ir tuo pačiu metu gliukoziltransferazės-I iRNR *S. sobrinus*.

Taikiniai minėtuose *S. mutans* ir *S. sobrinus* genuose bei atitinkamai iRNR yra konservatyvūs – koduojančios nukleotidų sekos šių bakterijų genuose yra nekintančios. Todėl PO panaudojimas sumažina bakterijų gebėjimą kitais būdais sintetinti vandenyje netirpius ir dalinai tirpius gliukanus, kad būtų galima sukurti bioplėvelės polimerinę matricą. Taikinių konservatyvumas parodytas ir pagrįstas Fig. 6 ir Fig. 7

Pagal šį išradimą nauji PO, kurie pasiekia priešprasminį efektą, gali būti chemiškai sintetinės fosforotioatų oligodeoksiribonukleotidų sekos, atitinkančios nukleotidų sekas pagal SEQ ID nr. 1, 13, 19, arba gali būti bet kokia kita šiame dokumente apibūdinta PO forma, t.y., SEQ ID nr. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 20, 21, 22, 23, 24, ar jų fragmentai ar modifikacijos.

Trumpesnės sekos (SEQ ID nr. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 20, 21, 22, 23, 24) turi tokį patį nukleotidų (nt) išsidėstymą kaip ir PO su SEQ ID nr. 1, 13, 19, todėl jos

gali būti savarankiškai naudojamos nustatytiems bakterijų genomo taikiniams tarp *gtfB* ir *gtfC* *S. mutans*, taip pat *S. sobrinus* *gtfI* genų ir iRNR. Dėl termodinaminių savybių (tokių pačių kaip ir su PO SEQ ID nr. 1, 13, 19), šie trumpesni fragmentai atitinkamoje bakterijų genomo srityje gali formuoti heterodupleksus.

Pažymėtina, kad PO, turintis SEQ ID nr. 1, jungiasi su nesuporuotais nukleotidais esančiais rutulinėje kilpoje *S. mutans* iRNR *gtfB* kaip tai yra nurodyta Fig. 1 Analogiškai ilgesnės sekos PO (SEQ ID nr. 13) gali formuoti heterodupleksus numatytoje srityje ir papildo bei jungiasi rutulinėje kilpoje su nesuporuotais nukleotidais *S. mutans* iRNR *gtfB* kaip yra apibrėžta fig. 1

Gausus literatūroje pristatytų tyrimų, atliktų *in vitro* ir *in vivo* sąlygomis, skaičius demonstruoja, kad nuo 8 nt iki 30 nt ilgio nukleotidų sekų PO būdingas priešprasminis poveikis. Net ir PO su vienu nesutampančiu nukleotidu taip pat būdingas stiprus priešprasminis poveikis (žr. Hamel ir kt. „*Inhibition of gene expression by anti-sense C-5 propyne oligonucleotides detected by a reporter enzyme*“ (Biochem J 339 (1999), 547-553 p.); Wagner ir kt. „*Potent and selective inhibition of gene expression by an antisense heptanucleotide*“ (Nat Biotechnol 14 (1996), 840-844 p.); Fakler ir kt. „*Short antisense oligonucleotide-mediated inhibition is strongly dependent on oligo length and concentration but almost independent of location of the target sequence*“ (J Biol Chem 269 (1994), 16187-16194 p.); Woolf ir kt. „*Specificity of antisense oligonucleotides in vivo*“ (Proc Natl Acad Sci USA 89 (1992), 7305-7309 p.)).

#### PO sintezė

Šiame išradime nurodytos naujos PO sekos gali būti sintetinės ir modifikuojamos įvairiais būdais. Fosforotioatų formos oligodeoksiribonukleotidai, kaip pavaizduota 2 pavyzdyje, gali būti naudojami kaip skirtingų formų PO. Tokie fosforotioatų formos oligodeoksiribonukleotidai skiriasi nuo nemodifikuotų oligodeoksiribonukleotidų tuo, kad vienas iš deguonies atomų fosfodiesterio jungtyje yra pakeičiamas sieros atomu. Fosforotioatų formos oligodeoksiribonukleotidai gali būti chemiškai sintetiniai, pavyzdžiui, Metabion International AG (Vokietija) naudojant automatizuota DNR sintezatorių ir forforamiditinį metodą pagal plačiai žinomą standartinį protokolą (žr., G. Zon „*Oligonucleoside Phosphorothioates*“ Ed. S. Agrawal „*Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties*“ (methods Mol Biol 20 (1993), 165-189 p., Humana Press Inc., Totowa, NJ); Guzaev „*Reactivity of 3H-1,2,4-diathiazole-3-thiones and 3H-1,2-dithiole-3-thiones as sulfurizing agents for*

*oligonucleotide synthesis*" (Tetrahedron Lett 52 (2011), 434-437 p.); Sanghvi „*A status update of modified oligonucleotides for chemotherapeutics applications*" (Curr Protoc Nucleic Acid Chem Suppl. 46 (2011), Unit 4.1.1-4.1.22)).

Fosforotioatų formos PO sintezė susideda iš 4 etapų sintetinių ciklų.

Sintetinis fosforotioatų formos oligodeoksiribonukleotidų ciklas prasideda nuo nukleotido, prisitvirtinusio prie kietos atramos (stiklo ar polisterino rutuliuko), atblokavimo 3'-pozicijoje. Šis pirmasis etapas vadinamas detrityliacija ir yra skirtas pašalinti rūgščiai atsparią dimetoksitritilo apsauginę grupę iš 5'-hidroksilo atraminės nukleozidų grupės, naudojant rūgšties tirpalą iš dichloracto rūgšties tirpalo dichlormetane ar toluene.

Tolesnis etapas yra 5'-hidroksilo nukleozidų grupės sujungimas su įeinančiu foforamidiniu reagentu, aktyvuojamu su 1H- tetrazolu arba 4,5-dicianoimidazolu.

Gautas 3', 5'-internukleosido fosfito jungtis yra sulfurizuojama (trečiasis etapas) su N,N,N',N'-tetraetyltiuram disulfidu, kad suteikti tiono fosfortriesterio jungtį. Kita vertus, sulfurizacija gali būti atlikta naudojant kitus reagentus, pavyzdžiui, fenilacetil sulfidą su 3-pikolinu, 3H-1,2- benzoditoliol-3-vienas-1,1-dioksidad (Beaucage reagentą) arba N,N-dimetil-N'-(3-tiokso-3H-1,2,4-ditazol-5-yl) metanimidamidą.

Ketvirtame etape yra pasiekiamas nesureagavusios 5'-hidroksilo nukleozidų grupės ribojimas su acto rūgšties anhidrido ir N-metilimidazol-2,6-lutidin-2-acetonitrilą.

Šio keturių etapų sintezės ciklo rezultatas yra papildoma DNR bazė ir ciklas yra kartojamas tol kol sukuriama visa norimo ilgio seka pagal norimą PO seką.

Po sintezės ciklų baigimo oligodeoksiribonukleotidai lieka prisijungę prie atramos su visomis apsaugos grupėmis. Todėl, siekiant atskirti ir pašalinti apsaugą nuo šių bazinių neatsparių grupių (pvz., cianoetilo grupė ant fosfatų triesterio), tvirta atrama yra veikama trietilamino acetonitrilo tirpalu, o po to amonio hidroksidu.

Po to, atramos yra pašalinamos filtracijos pagalba ir oligodeoksiribonukleotidai yra surenkami po amonio hidroksido išgarinimo. Galiausiai atliekamas susintetintų fosforotioatų formos oligodeoksiribonukleotidų išvalymas naudojant efektyvią skysčių chromatografiją (HPLC), nudruskinimą ir liofilizavimą.

PO nešėjai

Šiame dokumente minimi PO gali būti efektyviau transportuojami į *S. mutans*

ir *S. sobrinus* bakterijas (t.y., įsiskverbti per bakterijų ląstelės sienelę) naudojant nešėjus. Nešėjas gali būti transfekcijos reagentai ir katijoniniai polimerai, kurie yra žinomi. Visų PO formų su nešėju ar transfekcijos reagentu, sudarytu iš katijoninio polimero, pavyzdžiui, TurboFect™ (Thermo Fisher Scientific, Fermentas) gali būti naudojama tam, kad padidinti bakterijų PO įsisavinimą ir efektyviai padidinti bioplėvelės formavimosi *S. mutans* ir *S. sobrinus* inhibiciją.

Fosforotioato formos PO SEQ ID nr. 1, 13, 19, naudojami bioplėvelės formavimosi slopinimui pademonstruoti ant kieto paviršiaus, parodant jų dėka pasiekiamą priešprasminį efektą. Toks pats efektas pasiekiamas ir su kitų formų PO, aprašytais šiame dokumente, pvz., SEQ ID nr. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 20, 21, 22, 23, 24, arba jų fragmentais, arba jų modifikacijomis.

Kiti nešėjai, naudojami įvairioms PO formoms, skirti PO įterpimui į eukariotines ir prokariotines ląsteles, gali būti įvairios cheminės medžiagos, galinčios sudaryti kompleksus su izoliuotais oligonukleotidais tam, kad apsaugoti juos nuo degradacijos ir pagerinti jų skvarbą į ląsteles. Šios medžiagos apima, bet neapsiriboja, kalcio druskos (pvz., kalcio fosfatas, kalcio chloridas), katijoniniai lipidai (pvz., N-(2,3 dioleoiloksipropyl) N, N, N-trimetilamonio chloridas, dioleoilfosfatidiletanolaminas, cholesterolis), katijoniniai polimerai (pvz., dietilaminoetilo dekstranas, polietileniminas, chitozanas, ciklodekstrinas, poliamidoamino dendrimerai, polipropilenimino dendrimerai), į ląsteles prasiskverbiantys peptidai (peptidai, paprastai turintys mažiau nei 30 amino rūgščių; pvz., penetratinas) ir skirtingų tipų nanodalelės (žr. D. Liu ir kt. „*Chemical Methods for DNA Delivery*“, Ed., E. C. Heiser, Volume 1 of Gene Delivery to Mammalian Cells (Methods Mol Biol 245 (2004), 3-23 p., Humana Press Inc., Totowa, NJ); Zhu ir Mahato „*Lipid and polymeric carrier-mediated nucleic acid delivery*“ (Expert Opin Drug Deliv 7 (2010), 1209-1226 p.); Bai ir kt. „*Antisense antibiotics: a brief review of novel target discovery and delivery*“ (Curr Drug Discov Technol 7 (2010), 76-85 p.); Yu ir kt. „*Targeted delivery systems for oligonucleotide therapeutics*“ (AAPS J 11 (2009), 195-203 p.); Aalinkel ir kt. „*Quantum rods as nanocarriers of gene therapy*“ (Drug Deliv 19 (2012), 220-231 p.). Visi šie transfekcijos reagentai, išskyrus kalcio fosfatą, kuris formuoja kalcio-fosfato-DNR nuosėdas, veikia panašiai – jie sudaro junginius su oligonukleotidais per elektrostatinę sąveiką tarp neigiamo krūvio oligonukleotidų molekulių ir teigiamo krūvio reagento molekulių. Kadangi tokie kompleksai išlaiko teigiamą krūvį, jie gali susijungti su neigiamo krūvio eukariotinių

ląstelių plazminė membrana ar bakterijos ląstelės sienelė ir gali būti įsisavinti ląstelių.

Plačiausiai naudojama transfekcijos reagentai PO pristatymui į bakterines ląsteles yra katijoniniai polimerai ir į ląsteles įsiskverbiantys peptidai, kurie yra naudojami visiems šiame dokumente minimiems PO, skirtingoms šiame dokumente minimoms PO formoms ir modifikacijoms. Svarbu akcentuoti, kad į ląsteles prasiskverbiantys peptidai yra pajėgūs įsiskverbti į ląsteles ne tik elektrostatinės sąveikos dėka, bet ir formuojant trumpalaikes poras ląstelių plazminėje membranoje (žr. Guo ir kt. „*Treatment of Streptococcus mutans with antisense oligodeoxyribonucleotides to gtfB mRNA inhibits GtfB expression and function*“ (FEMS Microbial Lett 264 (2006), 8-14 p.) efektyviam fosforotioatų formos PO pristatymas iki *S. mutans* bakterijų naudojant katijonų polimerą – So-Fast™ (Taiyangma).

Atliekant šį išradimą pagrindžiančius tyrimus buvo taikomas žinomas ir rinkoje prieinamas transfekcijos reagentas TurboFect™ (Thermo Fisher Scientific, Fermentas). Šio katijoninio polimero pagalba PO su SEQ ID nr. 1, 13, 19 buvo įterpti į *S. mutans* ir *S. sobrinus* bakterijas, tuo pademonstruojant šio transfekcijos reagento efektyvumą, eksperimentiškai.

#### Panaudojimas

Šis išradimas visomis savo išraiškomis suteikia priemones ir būdus bioplėvelės formavimosi ant kietų paviršių slopinimui be žymios įtakos *S. mutans* ir *S. sobrinus* bakterijų gyvybingumui. Išradime nurodytas būdas ir PO suteikia galimybę administruoti PO, atitinkančius SEQ nr. 1, 13, 19 ar jo fragmentus, atitinkančius SEQ ID nr. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 20, 21, 22, 23, 24, į bakterinę kultūrą naudojant efektyvią koncentraciją tam, kad sumažinti *S. mutans* ir *S. sobrinus* adheziją, tarpusavio sukibimą ir bioplėvelės formavimąsi, bet be baktericidinio (bakterijas naikinančio) poveikio, kaip tai aiškiai pademonstruota su *S. mutans* Fig. 5

Išradimas leidžia naudoti PO, kurių seka yra SEQ ID nr. 1, 13, 19, arba šiame dokumente apibūdintų PO fragmentus, arba PO modifikacijas, pasiekiant priešprasminį efektą, aterosklerozės ir kardiovaskulinių infekcijų prevencijai ir kontrolei, be reikšmingo poveikio žmogaus mikrobiomui.

Kaip matoma 2-Fig. 5 ir 1 lentelėje, efektyvi PO koncentracija sumažina *S. mutans* ir *S. sobrinus* adheziją, bakterijų sukibimą ir bioplėvelės formavimąsi be išreikšto bakteriostatinio ir baktericidinio poveikio. 5 pavyzdyje specifiškai parodyta

efektyvios PO koncentracijos poveikį kraujo terpėje (kraujo serume), tokiu būdu parodant poveikį aterosklerozės židinių formavimuisi kardiovaskulinėje sistemoje, audiniuose ir kraujo terpėje.

Visų šiame dokumente nurodytų poveikių atžvilgiu šis išradimas atskleidžia naują būdą kontroliuoti ir užkirsti kelią bioplėvelių židiniams kardiovaskulinėje sistemoje, audiniuose ir kraujo terpėje, naudojant PO, kurių sekos yra SEQ ID nr. nr. 1, 13, 19, arba visų šiame dokumente nurodytų PO fragmentus ar PO modifikacijas, ir taip pasiekiant priešprasminį poveikį *S. mutans* ir *S. sobrinus* gliukoziltransferazių atžvilgiu. Šis naujas būdas suteikia įrankį bioplėvelės formavimosi slopinimui ant įvairių kietų paviršių, tarp jų kardiovaskulinių audinių, implantų, taip pat, kitų paviršių kontaktuojančių su žmogaus audiniais ir krauju.

Išrasti nauji PO, kurių sekos SEQ ID nr. nr. 1, 13, 19, arba visų šiame dokumente nurodytų PO fragmentai ar PO modifikacijos, gali būti naudojami kaip biofarmacinių kompozicijų (tirpalų, suspensijų ir pan.) dalys, gali būti įtraukti į biofarmacinių kompozicijų formules, suteikiant tiek vietinį, tiek sisteminį aktualų poveikį gyvam organizmui - žmogui, arba negyviems paviršiams kontaktuojantiems su gyvo organizmo audiniais ir krauju.

Šiame išradime atskleisti nauji PO, kurių sekos SEQ ID nr. 1, 13, 19, arba visi šiame dokumente nurodytų PO fragmentai ar PO modifikacijos, geba susijungti su atitinkamomis *Streptococcus mutans* genomo dalimis koduojančiomis gliukoziltransferazę B ir gliukoziltransferazę C, ir šių gliukoziltransferazių iRNR vienu metu, taip pat su gliukoziltransferaze I iRNR *S. sobrinus* ir tokiu būdu slopinti gliukanų gamybą, sumažinant bioplėvelės formavimąsi, taip užkertant kelią aterosklerozės ir infekcinių židinių formavimuisi.

Be to, šiame išradime atskleisti nauji PO, kurių sekos SEQ ID nr. 1, 13, 19, arba visi šiame dokumente nurodytų PO fragmentai ar PO modifikacijos, užkerta kelią bakterijų adhezijai ir prikibimui prie kietų paviršių, tuo pačiu metu nesumažinant bakterijų gyvybingumo. Šis aspektas suteikia galimybę naudoti pateiktus PO kaip medžiagą kovai su ateroskleroze ir kardiovaskulinėmis infekcijomis, kuri reikšmingai nepaveikia žmogaus organizme esančios bakterijų ekosistemos - mikrobiomo.

Patentuojamo išradimo tikslas yra suteikti priemones ir būdą bioplėvelės formavimosi slopinimui būtent kardiovaskulinėje sistemoje ir kraujo terpėje. Tikslas

pasiekiamas veikiant šiame išradime apibrėžų PO molekulėms, kurios slopina gliukanų gamybą *S. mutans* ir *S. sobrinus*, vienu metu taikantis į abiejų rūšių bakterijų gliukanų sintezės mechanizmus, su vieno tipo PO molekule.

Teiginys „vieno tipo priešprasminio oligonukleotido molekulė“ yra naudojamas norint pabrėžti, kad pastraipoje aukščiau nurodytas priešprasminis poveikis yra pasiekiamas su viena ar keliomis molekulėmis, kurių oligonukleotidų seka yra pirmą kartą atskleista šiame išradime.

PO pateikiami kaip viena ar kelios šiame išradime žemiau pateikiamų sekų molekulės, t.y., PO, kurių sekos yra SEQ ID nr. 1, 13, 19, taip pat jų fragmentai ir modifikacijos (pvz., kurių sekos yra viena iš SEQ ID nr. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 20, 21, 22, 23, 24), tokiu kiekiu, kuris yra efektyvus ir pakankamos atsižvelgiant į terpę ir konkrečią kompoziciją.

Šio išradimo rezultate sukurtų naujų PO, kurių sekos SEQ ID nr. 1, 13, 19, arba visi šiame dokumente nurodytų PO fragmentai ar PO modifikacijos (pvz., kurių sekos yra viena iš SEQ ID nr. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 20, 21, 22, 23, 24), efektas *in vitro* atitiko *in silico* sumodeliuotą poveikį į *S. mutans* ir *S. sobrinus*. Minėtos PO sekos slopina *S. mutans* ir *S. sobrinus* gebėjimą sintezuoti bioplėvelės formavimuisi reikalingus gliukanus. Ne bioplėvelėje esančios bakterijos yra lengviau atpažįstamos ir eliminuojamos natūraliu keliu žmogaus imuninės sistemos.

Atitinkamai, šis išradimas suteikia būdą ir priemones bioplėvelės slopinimui, mažinimui, taip pat užkerta kelią bioplėvelės židinių ant kietų paviršių *in vitro* ir *in vivo* atsiradimui. Jei *in vivo* kietas paviršius yra žmogaus audinių dalis, pavyzdžiui kraujagyslės sienelė, šį metodą sudaro efektyvios PO dozės, kaip aprašyta šiame dokumente, įvedimas į žmogaus kraują, t.y., PO kurių sekos yra SEQ ID nr. 1, 13, 19, arba visi šiame dokumente nurodytų PO fragmentai ar PO modifikacijos (pvz., kurių seka yra viena iš SEQ ID nr. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 20, 21, 22, 23, 24), kaip biofarmacinės kompozicijos sudėtinės dalys yra panaudojamos bioplėvelės sąlygojamų kardiovaskulinės sistemos patologijų susijusių su ateroskleroze ir/ar *S. mutans* ar *S. sobrinus* sukeltomis infekcijomis prevencija ir gydymas.

### Technologija

Priešprasminė technologija suteikia keletą privalumų, lyginant su kitomis antibakterinėmis technologijomis, tarp jų pagrindiniai privalumai yra:

specifinis ir sinchroninis *gtf* iRNR *S. mutans* ir *S. sobrinus* slopinimas;

šiam išradime atskleistų PO sekų naudojimas analogiškiems taikiniams dviejų rūšių streptokokuose (*S. mutans* ir *S. sobrinus*);

išorinis panaudojimas siekiant *S. mutans* ir *S. sobrinus* bioplėvelių inhibicijai ant negyvų paviršių, tokių kaip kateteriai, protezai ar implantai, siekiant maksimaliai sumažinti infekcijos ar atmetiko rizikas, taip pat sumažinti sisteminius šalutinius poveikius.

Šiame išradime atskleistas PO panaudojimo būdas ir PO, kurių sekos yra SEQ ID nr. 1, 13, 19, arba visi šiame dokumente nurodytų PO fragmentai ar PO modifikacijos (pvz, kurių seka yra viena iš SEQ ID nr. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 20, 21, 22, 23, 24), slopina bioplėvelės formavimąsi ir tuo pačiu ligų ir patologijų, sukeltų bioplėvelės formavimosi, atsiradimą, pvz., aterosklerozė, infekcinis endokarditas, infekcinės ir uždegiminės reakcijos į implantuos ar protezus, jų atmetimo reakcijos ir pan.

Gliukanai, sudarantys *S. mutans* ir *S. sobrinus* bioplėvelių egzopolisacharidus, yra sudaryti iš besikartojančių gliukozės monomerų vienetų ir yra sintetinami veikiant gliukoziltransferazių fermentinėms reakcijomis. Gliukanai gali būti netirpūs vandenyje, tirpūs vandenyje ir dalinai tirpūs vandenyje. Gliukanai tarnauja kaip polisacharidinė matrica bioplėvelei su keliomis funkcijomis:

- 1) didina bakterijų prisitvirtinimą ir tolesnį kaupimąsi ant audinių;
- 2) suteikia struktūrinį vientisumą ir bioplėvelės lipumą;
- 3) didina bioplėvelės matricos adhezinės savybes.

*S. mutans* gamina trijų rūšių gliukanų polimerus – netirpius vandenyje gliukanus su alfa ( $\alpha$ )-1,3 gliukozidinėmis jungtimis, dalinai tirpius vandenyje turinčius  $\alpha$ -1,3 ir  $\alpha$ -1,6 gliukozidinių jungčių mišinį ir taip pat vandenyje tirpius gliukanus su  $\alpha$ -1,6 gliukozidinėmis jungtimis, kurie yra sintetinami atitinkamai GtfB, GtfC ir GtfD fermentų (baltymų). Yra trys genai – *gtfB*, *gtfC* ir *gtfD*, kurie koduoja atitinkamai GtfB, GtfC ir GtfD baltymus.

Atskiras šio išradimo tikslas ir naujumas yra vienu metu ir lygiagrečiai slopinti gliukoziltransferazės iRNR ir *gtf* genų raišką *S. mutans* ir *S. sobrinus*.

Gliukoziltransferazės iRNR ir *gtf* genų raiškos inhibicijos efektas, taip pat

vandenyje netirpių ir dalinai tirpių gliukanų sintezės slopinimo efektas ir atitinkamai bioplėvelės formavimosi slopinimo efektas pasiekiamas, panaudojant tokių sekų PO:

SEQ ID nr.1 (5'-GCAGACCATTGCTTAATCT-3'), kurios veikimo išdava yra visiškas vandenyje netirpių gliukanų gamybos ir rezultate bioplėvelės formavimosi slopinimas.

SEQ ID nr.13 (5'-TTGGCAGACCATTGCTTAATCTTAAC-3') ir/arba SEQ ID nr.19 (5'-TTAGAGAAACCTTCAAACATGACGCG-3'), veikimo išdava yra analogiška SEQ ID nr. 1;

Taip pat analogiškas efektas kaip nurodyti aukščiau pasiekiamas veikiant PO sekų fragmentams ir modifikuotoms sekoms (pvz, kurių seka yra viena iš SEQ ID nr. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 20, 21, 22, 23, 24).

PO gali būti specifinė sekos, kaip nurodyta SEQ ID nr. 1, 13, 19 arba tų sekų dalys ar fragmentai. Taip pat gali būti PO, kurių sekos yra SEQ ID nr. 1, 13, 19 dalis ir fragmentas, pasirinkti iš šio sąrašo:

|                                  |                 |
|----------------------------------|-----------------|
| 5'-CAGACCATTGCTTAATCT-3'         | (SEQ ID nr. 4)  |
| 5'-AGACCATTGCTTAATCT-3'          | (SEQ ID nr. 5)  |
| 5'-GACCATTGCTTAATCT-3'           | (SEQ ID nr. 6)  |
| 5'-GCAGACCATTGCTTAATC-3'         | (SEQ ID nr. 7)  |
| 5'-GCAGACCATTGCTTAAT-3'          | (SEQ ID nr. 8)  |
| 5'-GCAGACCATTGCTTAA-3'           | (SEQ ID nr. 9)  |
| 5'-CAGACCATTGCTTAATC-3'          | (SEQ ID nr. 10) |
| 5'-AGACCATTGCTTAATC-3'           | (SEQ ID nr. 11) |
| 5'-CAGACCATTGCTTAAT-3'           | (SEQ ID nr. 12) |
| 5'-TTGGCAGACCATTGCTTAATCTTAAC-3' | (SEQ ID nr. 13) |
| 5'-GAAACCTTCAAACATGACGC-3'       | (SEQ ID nr. 20) |
| 5'-AAACCTTCAAACATGACGC-3'        | (SEQ ID nr. 21) |
| 5'-GAAACCTTCAAACATGACGCG-3'      | (SEQ ID nr. 22) |
| 5'-GAAACCTTCAAACATGACG-3'        | (SEQ ID nr. 23) |

5'-AGAAACCTTCAAACATGACGC-3' (SEQ ID nr. 24)

PO, kurių seka yra SEQ ID nr. 15 yra gautas iš SEQ ID nr. 13, kuris yra 100% komplementarus 26 nt *S. mutans gtfB*, *S. mutans gtfC* genuose ir taip pat su vienu iš nesuderintų nukleotidų *S. sobrinus gtfI* regione (žr. 1 pavyzdį).

PO, kurių seka yra SEQ ID nr. nr. 1, yra optimizuota 19 nukleotidų molekulė, atsižvelgiant į termodinamines savybes reikalingas *S. mutans gtfB* ir *gtfC*, *S. sobrinus gtfI* iRNR slopinimui.

PO su SEQ ID nr. 1 yra gaunami iš SEQ ID nr. 13 ir yra sudarytas iš 19 nt:

5'-TTG-GCAGACCATTGCTTAATCT-TAAC-3' (pabraukta ir nurodyta 1 pavyzdyje). SEQ ID nr. 4-12 yra gaunami iš SEQ ID nr. 1.

PO su SEQ ID nr. 13 yra izoliuoti sintetiniai PO sudaryti iš 26 nt:

5'-TTGGCAGACCATTGCTTAATCTTAAC-3', su kuriais pasiekiamas priešprasminis efektas natūraliai DNR sekos SEQ ID nr. 14 daliai.

PO su SEQ ID nr. 19 yra izoliuoti sintetiniai PO sudaryti iš 26nt:

5'-TTAGAGAAACCTTCAAACATGACGCG-3', su kuriais pasiekiamas priešprasminis efektas natūraliai DNR sekai SEQ ID nr. 18.

SEQ ID nr. 20-24 yra gaunamos iš SEQ ID nr. 19.

Todėl bet koks PO fragmentai, net ir trumpesnis nei 26 nt seka atitinkantis SEQ ID nr. 1 arba SEQ ID nr. 13, arba SEQ ID nr. 19, kurie taip pat apima ir atitinka šiame dokumente apibrėžtus gliukoziltransferazių kodavimo regionus, turi priešprasminį poveikį ir patenka į šių išradimu apibrėžiamas (ir pareiškiamas patentavimui) PO formas, kurios efektas atitinka šiame išradime įvardintą būdą ir priemones.

Šiame išradime nurodyti izoliuoti PO gali būti izoliuoti iš natūralaus ar gamtinio šaltinio per išsgręžtą restrikcijos reakciją, taip pat gaminami sintetiniais būdais, t.y., sintetinami chemiškai arba gaminamas rekombinantiniu būdu ar naudojant genų inžineriją, ar polimerizacijos ir amplifikacijos metodus, pvz., polimerazės grandininę reakciją (PGR) ir PGR amplifikaciją ar kurį nors kitą metodą. PO taip pat gali būti paruoštas atliekant žinomus veiksmus ar kitus metodus, aprašytus šiame dokumente atsižvelgiant į šį išradimą.

Šiame išradime nurodytais PO gali būti bet kokios molekulės, pagrįstos atitinkamomis nukleotidų sekomis, kurios jungiasi ar jungiasi naudojant bazinį nukleotidų suporavimą, įskaitant oligomerus arba polimerus, turinčius pagrindą, suformuotą iš natūraliai paplitusių nukleotidų ir/arba nukleino rūgščių analogų, sudarančių nestandartines nukleobazes ir/arba nestandartinius pagrindus, pvz., peptidinė nukleorūgštis (PNR) arba užrakinta nukleorūgštis (UNR), arba bet kokios išvestinės nukleorūgščių formos, kaip parodyta šiame dokumente. PO gali turėti dalinį, pvz., 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ar netgi 90% natūraliai paplitusių nukleotidų, o likusieji, t.y. 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 ar netgi 10% yra nukleorūgšties analogai, sudaryti iš nestandartinių nukleobazių ir/arba nestandartinių pagrindų, kaip nurodyta šiame dokumente naudojant PNR, UNR ar bet kokią kitą išvestinę nukleorūgšties formą. PO gali būti toliau chemiškai modifikuojamas. Tokios modifikacijos gali būti fosforotioatų formos oligodeoksiribonukleotidai, kaip parodyta šiame dokumente. Visos šiame dokumente pateiktos PO sekos gali būti chemiškai susintetintos kaip fosforotioatų formos oligodeoksiribonukleotidai.

Fosforotioatų oligonukleotidai yra normalios DNR variantas, kuriame vienas iš nesujungtų deguonies atomų yra pakeistas sieros atomu. Vidinės nukleotido jungtys (sulfurizacija) ženkliai sumažina endonukleazų ir eksonukleozų veiklumą, tame tarpe, nuo 5' iki 3' ir nuo 3' iki 5' DNR pol 1 egz nukleazės, nukleazės S1 ir P1, RNazės, serumo nukleazės ir gyvatės nuodų fosfodiesterazės. Fosforotioatų formos PO turi padidintą potencialą įsiskverbti per lipidų dvisluoksnį.

Dar kitos PO formos gali būti pagrįstos nukleotidais, kur bent vienas nukleotidas turi modifikuotą pagrindą padidinti susijungimo savybes ir/arba sumažinti endonukleazų ir egz nukleazų, tame tarpe, nuo 5' iki 3' ir nuo 3' iki 5' DNR pol 1 egz nukleazės, nukleazės S1 ir P1, RNazės, serumo nukleazės ir gyvatės nuodų fosfodiesterazės.

#### Pavyzdžiai

1 pavyzdys – Priešprasminių oligonukleotidų sekos parinkimas gliukoziltransferazės raiškos slopinimui

#### *Bioinformaciniai metodai ir rezultatai*

Prenkant šiame išradime atskleistas naujas PO sekas, pirmiausiai buvo identifikuotos konservatyvios homologinės sritys burnos streptokokų *gtf* genuose.

Šiam tikslui pasiekti, pirmiausiai atlikta palyginamoji aminorūgščių sekų analizė tarp *S. mutans* GtfB baltymo ir kitų Gtf baltymų, esančių burnos streptokokuose. *S. mutans* (padermė UA159, Bratthall serotipas c, Amerikietiško tipo kultūrų kolekcijos (ATKK) nr. 700610) genomas yra visiškai sekvenuotas, o sekos yra patalpintos GenBank duomenų bazėje Nacionaliniame biotechnologijos informacijos centre (National Center for Biotechnology Information) (NCBI). Todėl naudojant *S. mutans* (padermė UA159) GtfB baltymo aminorūgščių sekas, kaip užklausa, buvo atlikta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) homologų paieška tarp visų žinomų baltymų (BLAST paslauga yra prieinama <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, ir atlikta 2013 m. kovo mėn.). Buvo atskleista, kad *S. mutans* (padermė UA159) GtfB baltymas turi didelio laipsnio identiškumą su *S. mutans* GtfC baltymu (padermė UA159), o taip pat su kitais Gtf (t.y. GtfI) baltymais *S. criceti*, *S. dentirousetti*, *S. dentisuis*, *S. downei* ir *S. sobrinus* bakterijose, atsakinguose už vandenyje netirpių gliukanų sintezę. Galiausiai šiuos baltymus sudarančios aminorūgščių sekos buvo atrinktos ir daugybinė sekų palyginamoji analizė buvo atlikta naudojant MAFFT programos internetinį serverį, esantį Max-Planck Institute for Development Biology (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/mafft>, atlikta 2013 m. kovo mėn.). Taikant tokį metodą, buvo nustatyta konservatyvi sritis *S. mutans* (padermė UA159) GtfB baltymo aminorūgščių sekoje, kuri yra 100% homologiška su atitinkamomis sritimis *S. mutans* (padermė UA159) GtfC, *S. criceti* GtfI, *S. dentirousetti* GtfI, *S. dentisuis* GtfI ir *S. orisuis* Gtf baltymuose. Atitinkamas koduojantis segmentas šiai sričiai *S. mutans* (padermė UA159) *gtfB* gene turi šią 26 nukleotidų (nt) seką:

5'-GTTAAGATTAAGCAATGGTCTGCCAA-3' (SEQ ID nr. 16). Kaip ir palyginamosios aminorūgščių sekų analizės atveju, šis *S. mutans* (padermė UA159) *gtfB* geno segmentas taip pat turi 100% homologines sritis *S. mutans* (padermė UA159) *gtfC*, *S. criceti* *gtfI*, *S. dentirousetti* *gtfI*, *S. dentisuis* *gtfI* ir *S. orisuis* *gtf* genuose. Be to, taip pat buvo rasta labai didelio identiškumo sritis, turinti tik dviejų nukleotidų nesutapimą, *S. downei* *gtf* pirmtako ir *S. sobrinus* *gtfI* genuose. Remiantis geriausiais Primer3 programos (Primer3 paslauga buvo pasinaudota <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>, siekiant išanalizuoti termodinamiką ir kitus ypatumus heteroduplekso formavimosi metu, atlikta 2013 m. kovo mėn.) rezultatais, buvo parinkta 19 nt seka, komplementari aukščiau tekste nurodytai koduojančiai sričiai:

5'-AGATTAAAGCAATGGTCTGC-3' (koduojančios srities seka [SEQ ID nr.17])

||||||||||||||||

3'-TCTAATTCGTTACCAGACG-5' (komplementari seka) [SEQ ID nr. 1]

Eksperimentiniame darbe, atliktame remiantis šiais bioinformaciniais rezultatais, buvo panaudotas žemiau nurodytos sekos oligonukleotidas:

5'-GCAGACCATTGCTTAATCT-3' [SEQ ID nr. 1]

Tikslios šio segmento vietos *S. mutans* (padermė UA159) ir *S. sobrinus* (padermė SL1) *gtf* genuose kartu su duomenimis, esančiais NCBI GenBank duomenų bazėje, yra pateikti originaliame formate žemiau:

1. *S. mutans* (padermė UA159) *gtfB* gene (čia nurodytam kaip *gtf*):

GenBank accession no. [gb|AE014133.1|](#)

*Streptococcus mutans* UA159, complete genome Length=2030921

Features in this part of subject sequence:  
glucosyltransferase-I

Query 1 GCAGACCATTGCTTAATCT 19 [SEQ ID nr. 1]

||||||||||||||||

Sbjct 954167 GCAGACCATTGCTTAATCT 954149 [SEQ ID nr. 1]

2. *S. mutans* (padermė UA159) *gtfC* gene (čia nurodytam kaip *gtfS*):

GenBank accession no. [gb|AE014133.1|](#)

*Streptococcus mutans* UA159, complete genome Length=2030921

Features in this part of subject sequence:  
glucosyltransferase-SI

```

Query 1          GCAGACCATTGCTTAATCT          19  [SEQ ID
nr.                                     1]
                                     |||
Sbjct  958871    GCAGACCATTGCTTAATCT    958853  [SEQ ID nr.
1]

```

3. *S. sobrinus* (padermè SL1) *gtfl* gene:

GenBank accession no. dbj | D63570.1 |

Streptococcus sobrinus gene for glucosyltransferase GTF-I,  
complete cds  
Length=6838

```

Query    1      GCAGACCATTGCTTAATCT      19      [SEQ ID nr. 1]
          |||||
Sbjct   4079    GCAGACCATTGTTTAATCT      4061    [SEQ ID nr. 15]

```

**Vieno nukleotido neatitikimas SEQ ID nr. 1 yra pabrauktas.**

Remiantis aukščiau pateiktais duomenimis, buvo sumodeliuotas PO efektas *S. sobrinus* gliukoziltransferazės iRNR raiškai slopinti, nes priešprasminis efektas išlieka nepriklausomai nuo vieno nesutampančio nukleotido, kuris yra apytiksliai sekos viduryje. *S. mutans* *gtfB* iRNR antrinės struktūros modeliavimas buvo atliktas naudojantis Mfold programa, esančia Rensselaer bioinformatikos internetiniame serveryje (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold>, naudota 2013 m. kovo mėn.) tam, kad įvertinti pasirinktų PO prisijungimo vietą. Dėl to buvo sugeneruota vienas šimtas iRNR modelių, iš kurių atrinktas patikimiausias konstrukcinis variantas, rodantis PO prisijungimo sritį (Fig. 1).

Siekiant nustatyti konservatyvias homologines sritis tik tarp susijusių su žmogaus kardiovaskuline patologija burnos streptokokų – *S. mutans* ir *S. sobrinus* gliukoziltransferazės genų ir parinkti joms komplementarias PO sekas, iš Europos nukleotidų archyvo (European Nucleotide Archive) (ENA) buvo atrinktos šių bakterijų įvairių klinikinių padermių ir klonų *gtf* genų sekos, koduojančios vandenyje netirpių gliukanų sintezę (atranka atlikta 2013 m. rugsėjo mėn.). Po to, pasirinkus *S. mutans* (padermė UA159) *gtfB* geną kaip etaloną, buvo atlikta daugybinė šių sekų palyginamoji analizė naudojant MAFFT programos internetinį serverį, esantį Max-Planck Institute for Development Biology (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/mafft>, atlikta 2013 m. rugsėjo mėn.). Taikant tokį metodą, *S. mutans* ir *S. sobrinus* gliukoziltransferazės genuose buvo identifikuota konservatyvi homologinė sritis, sudaryta iš 26 nt: 5'-CGCGTCATGTTTGAAGGTTTCTCTAA-3' (SEQ ID nr. 18). Komplementari priešprasminė šiai sričiai seka (t.y. priešprasminis oligonukleotidas) turi tokį 26 nt eiliškumą: 5'-TTAGAGAAACCTTCAAACATGACGCG-3' (SEQ ID nr. 19). Tikslios šio segmento vietos *S. mutans* (padermė UA159) ir *S. sobrinus* (padermė SL1) *gtf* genuose kartu su duomenimis, esančiais NCBI GenBank duomenų bazėje, yra pateikti originaliame formate žemiau:

1. *S. mutans* (padermė UA159) *gtfB* gene (čia nurodytam kaip *gtfI*):

GenBank accession no. [gb|AE014133.2|](#)

Streptococcus mutans UA159, complete genome  
Length=2032925

Features in this part of subject sequence:  
glucosyltransferase-I

Query 1 TTAGAGAAACCTTCAAACATGACGCG 26 [SEQ  
ID nr. 19]

||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 953618 TTAGAGAAACCTTCAAACATGACGCG 953593 [SEQ  
ID nr. 19]

2. *S. mutans* (padermė UA159) *gtfC* gene (čia nurodytam kaip *gtfSI*):GenBank accession no. gb|AE014133.2|

Streptococcus mutans UA159, complete genome  
Length=2032925

Feature in this part of subject sequence:  
glucosyltransferase-SI

Query 1 TTAGAGAAACCTTCAAACATGACGCG 26 [SEQ  
ID nr. 19]

||||||||||||||||||||

Sbjct 958322 TTAGAGAAACCTTCAAACATGACGCG 958297 [SEQ  
ID nr. 19]

3. *S. sobrinus* (padermė SL1) *gtfI* gene:GenBank accession no. dbj|D63570.1|

Streptococcus sobrinus gene for glucosyltransferase GTF-I,  
complete cds  
Length=6838

Query 1 TTAGAGAAACCTTCAAACATGACGCG 26 [SEQ  
ID nr. 19]

||||||||||||||||||||

Sbjct 3530 TTAGAGAAACCTTCAAACATGACGCG 3505 [SEQ  
ID nr. 19]

Panaudojant „AntiSense Design“ programą, esančią Integrated DNA Technologies internetiniame serveryje

(<http://eu.idtdna.com/Scitools/Applications/AntiSense/Antisense.aspx?source=menu>, atlikta 2013 m. rugsėjo mėn.), aukščiau tekste minėti sričiai (SEQ ID nr. 18) buvo optimizuotos papildomos komplementarios priešprasminės 19–21 nt ilgio sekos

(t.y. priešprasminiai oligonukleotidai), kurios yra SEQ ID nr. 19 išvestinės:

5'-GAAACCTTCAAACATGACGC-3' (SEQ ID nr. 20)

5'-AAACCTTCAAACATGACGC-3' (SEQ ID nr. 21)

5'-GAAACCTTCAAACATGACGCG-3' (SEQ ID nr. 22)

5'-GAAACCTTCAAACATGACG-3' (SEQ ID nr. 23)

5'-AGAAACCTTCAAACATGACGC-3' (SEQ ID nr. 24)

2 pavyzdys – Priešprasminių oligonukleotidų poveikis į bioplėvelės formavimąsi *S. mutans* kultūrose

#### *Laboratoriniai metodai ir rezultatai*

*S. mutans* padermė UA159 (Bratthall serotipas c), gauta iš Amerikietiško tipo kultūrų kolekcijos (ATKK nr. 700610), 24 val. buvo kultivuota Todd Hewitt (TH) buljone (Difco) anaerobinėmis sąlygomis (95% N<sub>2</sub> ir 5% CO<sub>2</sub>) esant 37 °C temperatūrai. Kultūros grynumas buvo patikrintas Mitis salivarius agare (Difco) ir Kolumbijos kraujo agare (E&O Laboratories). Po to, bakterinės kultūros optinis tankis (OT) buvo pakoreguotas iki 0,2 naudojant mikroplokštelių skaitymo spektrofotometrą (Dynex MRX) ir parinkus 630 nm bangos ilgį.

Prieš bakterijų išsėjimą, 24-ių šulinėlių plokščiadugnės polistireno ląstelių kultūrų plokštelės (Sarstedt) buvo užpildytos TH buljonu. Tada trys skirtingų sekų fosforotioato oligodeoksiribonukleotidai buvo pridėti į plokštelės šulinėlius (galutinė koncentracija – 10 μM) arba atskirai, arba kartu su transfekcijos reagentu – TurboFect™:

1. PO1, turintis seką 5'-GCAGACCATTGCTTAATCT-3' (SEQ ID nr. 1), ir kuris naudojamas kaip bandomoji PO molekulė.

2. PO2, turintis seką: 5'-ACGCACTTTCTTGTCAT-3' (SEQ ID nr. 2), ir kuris naudojamas kaip teigiamos kontrolės molekulė, nes yra žinomas ir įrodytas jo

efektyvumas slopinant *S. mutans* *gtfB* geno raišką (žr. Guo ir kt. *Treatment of Streptococcus mutans with antisense oligodeoxyribonucleotides to gtfB mRNA inhibits GtfB expression and function*. FEMS Microbial. Lett. 264 (2006), 8-14 p.).

3. PO3, turintis seką 5'-ACTCGTATGCTACAGCTAT-3' (SEQ ID nr. 3), ir kuris naudojamas kaip neigiamos kontrolės molekulė, besiskirianti nuo bandomosios molekulės tuo, kad nukleotidų eiliškumas sekoje yra išmaišytas atsitiktine tvarka.

Šie PO buvo sintezuoti Metabion International AG (Vokietija), kaip pilnos fosforotioato formos oligodeoksiribonukleotidai, panaudojant 1 µmol sintezės skalę ir didelio efektyvumo skysčių chromatografijos gryninimą. Prieš eksperimentus, liofilizuoti PO buvo ištirpinti steriliame distiliuotame nukleazių neturinčiame vandenyje (Thermo Fisher Scientific, Fermentas), siekiant gauti pradinius koncentruotus tirpalus, turinčius 100 µM koncentraciją. Pagal reikalingumą, PO buvo derinami kombinacijoje su TurboFect™ reagentu atsižvelgiant į gamintojo protokolą – tai yra naudojant 2 µl reagento 1 µg oligonukleotidų ruošinio.

Pridėjus į plokšteles PO, *S. mutans* kultūros bakterijos buvo išsėtos į šulinėlius taip, kad gauti galutinį praskiedimą 1:100. Nedelsiant, sterilios 1 mm storio stiklo plokštelės, išpjautos iš standartinių mikroskopo objektinių stikliukų (76 × 26 mm; Thermo Fisher Scientific), buvo vertikalčiai įdėtos į šulinėlius, o plokštelės inkubuotos anaerobinėmis sąlygomis papildomoms 2 val. 37 °C temperatūroje. Paskui, sterilus sacharozės tirpalas buvo pridėtas į atitinkamus šulinėlius iki 1% galutinės koncentracijos, o plokštelės vėl inkubuotos anaerobinėmis sąlygomis (95% N<sub>2</sub> ir 5% CO<sub>2</sub>) 37 °C temperatūroje dar papildomoms 22 val. Šiame eksperimente skystos terpės (TH buljono) tūris vienam šulinėliui buvo 1 mL; šulinėliai tik su terpe (buljonu) be bakterijų buvo naudoti kaip „tuščia“ kontrolė; o nepaveiktos *S. mutans* bakterijos ir *S. mutans* bakterijos, paveiktos vien tik nukleazių neturinčiu vandeniu arba TurboFect™ reagentu, naudotos kaip eksperimentinės kontrolės.

Praėjus 24 val. bendram inkubacijos laikotarpiui, stiklo plokštelės buvo ištrauktos iš šulinėlių, išdžiovintos ir toliau panaudotos *S. mutans* bioplėvelės analizei MicroXAM™ (ADE Phase Shift) optiniu profilometru. Tuo tikslu buvo atlikti penki matavimai (kiekvieno matavimo plotas – 200 × 260 µm) per stiklo plokštelės vidurį nuo matomos bioplėvelės apačios iki viršaus panaudojant 50X objektyvą su priartinimo faktoriumi – 0,625. Papildomai, Gauso filtras (50 × 50 µm) buvo parinktas ir pritaikytas tam, kad pašalinti paviršiaus formos klaidas ir banguotumą. Šioje analizėje buvo

įvertintas keletas svarbių bioplėvelės paviršiaus šiurkštumo parametrų:  $S_t$  – maksimalus skirtumas tarp paviršiaus viršutinių ir apatinių taškų (t.y. paviršiaus „viršūnių“ ir „slėnių“),  $S_a$  – vidurkio skirtumas tarp paviršiaus viršutinių ir apatinių taškų (t.y. paviršiaus „viršūnių“ ir „slėnių“),  $S_{dr}$  – bendras paviršiaus plotas (jeigu visi paviršiaus nelygumai būtų išlyginti) remiantis Wennenberg ir Albrektsson straipsniu *Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces* (Int. J. Oral Maxillofac. Implants. 15 (2000), 331-344 p.). Šie paviršiaus parametrai atspindi bioplėvelės išsivystymo laipsnį arba „brandą“ – tai yra prisitvirtinusių bakterijų ir susiformavusių mikrokolonijų kiekį. Nustatytų paviršiaus parametrų statistinis reikšmingumas buvo įvertintas pritaikant One-Way ANOVA metodą su Tukey's testu. Mažesnė už 0,05  $p$  reikšmė buvo laikyta statistiškai reikšminga.

Taikant optinės profilometrijos metodą stiklo plokštelių su *S. mutans* bioplėvele paviršiaus analizei buvo atskleista, kad 1% sacharozės TH buljone žymiai padidina paviršiaus šiurkštumo parametrus –  $S_a$  ir  $S_t$  palyginus su švarios stiklo plokštelės paviršiumi, panaudotos šiame eksperimente kaip etaloninė kontrolė ( $p < 0,05$ ) (1 lentelė). Šiuo atveju, tai rodo, kad 1% sacharozės terpėje stimuliuo bakterijų prisitvirtinimą (adheziją) prie stiklo plokštelės paviršiaus ir bioplėvelės formavimąsi (1 lentelė). Tačiau bandomoji PO1 molekulė (SEQ ID nr. 1) kombinacijoje su TurboFect™ reagentu ženkliai sumažino bioplėvelės formavimąsi ant stiklo plokštelės paviršiaus nepaisant buljone esančios 1% sacharozės ( $p = 0,06$  [ $S_a$  parametras]). Svarbiausia, kad šis efektas buvo statistiškai reikšmingas palyginus su bakterijomis, paveiktomis PO2 (SEQ ID nr. 2) ir PO3 (SEQ ID nr. 3) kombinacijoje su TurboFect™ reagentu ( $p < 0,05$  [ $S_a$  ir  $S_{dr}$  parametrai]), kaip tai matoma 1 lentelėje bei fig. 2a, 2b ir 2c. Remiantis šiais rezultatais galima daryti išvadą, kad bandomoji PO1 molekulė (SEQ ID nr. 1) efektyviai sumažina *S. mutans* adheziją ir bioplėvelės formavimąsi ant standaus paviršiaus (stiklo plokštelės) *in vitro* sąlygomis.

1 lentelė – Stiklo plokštelių su *S. mutans* bioplėvele paviršiaus parametrai

| Poveikiai                                   | $S_a$ $\mu\text{m}$ | $S_t$ $\mu\text{m}$ | $S_{dr}$ %  | Nuoroda<br>į Fig. 2 |
|---------------------------------------------|---------------------|---------------------|-------------|---------------------|
| Švari stiklo plokštelė (etaloninė kontrolė) | 0,01<br>(0,00)      | 0,92<br>(0,53)      | 0,05 (0,02) |                     |
| Nepaveiktos bakterijos be sacharozės        | 0,13<br>(0,03)      | 2,34<br>(1,12)      | 1,91 (1,38) |                     |

|                                                                               |                |                 |                 |         |
|-------------------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------|-----------------|---------|
| Nepaveiktos bakterijos + sacharozė                                            | 0,13<br>(0,04) | 8,44<br>(4,03)  | 1,57 (0,95)     |         |
| Nepaveiktos bakterijos + sacharozė + nukleazių neturintis vanduo + TurboFect™ | 0,05<br>(0,03) | 3,80<br>(2,25)  | 0,57 (0,40)     |         |
| Bakterijos + sacharozė + PO1                                                  | 0,27<br>(0,01) | 7,27<br>(1,91)  | 10,09<br>(0,90) |         |
| Bakterijos + sacharozė + PO2                                                  | 0,45<br>(0,04) | 13,03<br>(1,93) | 18,60<br>(2,24) |         |
| Bakterijos + sacharozė + PO3                                                  | 0,14<br>(0,05) | 5,74<br>(2,62)  | 1,11 (0,71)     |         |
| Bakterijos + sacharozė + PO1 + TurboFect™                                     | 0,07<br>(0,04) | 6,94<br>(5,81)  | 0,99 (1,37)     | Fig. 2a |
| Bakterijos + sacharozė + PO2 + TurboFect™                                     | 0,31<br>(0,02) | 7,99<br>(1,67)  | 10,08<br>(1,13) | Fig. 2b |
| Bakterijos + sacharozė + PO3 + TurboFect™                                     | 0,31<br>(0,02) | 7,18<br>(0,64)  | 9,19 (0,82)     | Fig. 2c |

1 lentelė rodo stiklo plokštelių su *S. mutans* bioplėvele paviršiaus parametrus po 24 val. inkubacijos esant skirtingiems poveikiams. Duomenys yra pateikti kaip 5 matavimų vidurkiai, o standartinės paklaidos yra pateiktos skliausteliuose.

3 pavyzdys – Priešprasminių oligonukleotidų poveikis į bakterijų agregaciją *S. mutans* kultūrose

#### *Laboratoriniai metodai ir rezultatai*

Eksperimento planas ir sąlygos buvo tokios pačios kaip aprašyta 2 pavyzdyje išskyrus tai, kad į užsėtas 24-ių šulinėlių plokšteles nebuvo įdėtos stiklo plokštelės. Pridėjus sacharozės, bakterijų agregacija buvo tikrinama spektrofotometriškai 3 val. intervalais iki 14 val., o po to – 24 val. Tuo tikslu, paimtų bandinių optinis tankis (OT) buvo matuojamas naudojant mikroplokštelių skaitymo spektrofotometrą (Dynex MRX) ir parinkus 630 nm bangos ilgį. Be to, eksperimento pabaigoje (po 24 val. bendro inkubacijos laikotarpio), iš plokštelės šulinėlių buvo paimti papildomi bandiniai tam, kad įvertinti *S. mutans* bakterijų morfologiją bei jų agregaciją pritaikant Gramo dažymo metodą ir šviesinę mikroskopiją su Leica DM500 mikroskopu.

Spektrofotometrinis bakterijų kultūrų, augančių plokštelės šulinėliuose,

tikrinimas atskleidė, kad sacharozės pridėjimas ženkliai padidino OT 14 val. ir 24 val. palyginus su bakterijomis, augusiomis be sacharozės (fig. 3a ir 3b). Tai rodo, kad 1% sacharozės terpėje sukėlė bakterijų agregatų susidarymą dėl gliukano sintezės. Nei nukleazių neturintis vanduo, nei TurboFect™ reagentas neturėjo jokio ženklaus poveikio į šį procesą (fig. 3b). Tačiau poveikiai į bakterijas su bandomąja PO1 molekule (SEQ ID nr. 1) tiek atskirai, tiek ir kombinacijoje su TurboFect™ reagentu apytiksliai 1,5 karto sumažino OT lyginant su nepaveiktomis bakterijomis 24 val., o tai žymi mažesnį bakterijų agregatų susiformavimą (fig. 3c ir 3d). Šis bandomosios PO1 molekulės (SEQ ID nr. 1) efektas toliau buvo patvirtintas dažant 24 val. paimtus mėginius Gramo būdu. Kaip matoma fig. 4b ir 4c, bandomoji PO1 molekulė (SEQ ID nr. 1) užslopino bakterijų agregatų susidarymą, o taip pat sumažino bakterijų grandinėlių ilgėjimą (buvo stebima daugiau paskirų bakterinių ląstelių) palyginus su nepaveiktomis bakterijomis. Priešingai, nei PO2 (SEQ ID nr. 2), nei PO3 (SEQ ID nr. 3) molekulės neturėjo tokio poveikio bakterijoms, augančioms TH buljone su 1% sacharozės (fig. 3c ir 3d, fig. 4d ir 4e). Todėl, sutinkant su šiais rezultatais, galima daryti išvadą, kad bandomoji PO1 molekulė (SEQ ID nr. 1) sumažina *S. mutans* bakterijų agregaciją, esant terpėje 1% sacharozės, ir netgi sumažina bakterijų grandinėlių ilgėjimą, o tai rodo užslopintą gliukanų gamybą.

4 pavyzdys – Priešprasminių oligonukleotidų poveikis į *S. mutans* bakterijų gyvybingumą

#### *Laboratoriniai metodai ir rezultatai*

Eksperimento planas ir sąlygos buvo tokios pačios kaip aprašyta 2 pavyzdyje išskyrus tai, kad į užsėtas 24-ių šulinėlių plokšteles nebuvo įdėtos stiklo plokštelės bei į TH buljoną nebuvo pridėta sacharozės. Praėjus pirminiam 2 val. inkubacijos laikotarpiui, toliau bakterijų augimas buvo tikrinamas spektrofotometriškai 3 val. intervalais iki 14 val., o po to – 24 val. Tuo tikslu, paimtų bandinių optinis tankis (OT) buvo matuojamas naudojant mikroplokštelių skaitymo spektrofotometrą (Dynex MRX) ir parinkus 630 nm bangos ilgį.

Spektrofotometrinis bakterijų kultūrų, augančių plokštelės šulinėliuose, tikrinimas atskleidė, kad nukleazių neturintis vanduo ir TurboFect™ reagentas

nepaveikė normalaus bakterijų augimo proceso per visą 24 val. inkubacijos laikotarpį (5A pav.). Poveikiai į bakterijas su PO1 (SEQ ID nr. 1), PO2 (SEQ ID nr. 2) ir PO3 (SEQ ID nr. 3) molekulėmis tiek atskirai, tiek ir kombinacijoje su TurboFect™ reagentu tik labai nežymiai sumažino bakterijų augimo kreives (OT) lyginant su nepaveiktomis bakterijomis (fig. 5b ir 5c). Remiantis šiais duomenimis, galima daryti išvadą, kad nei vienas iš panaudotų PO ženkliai neslopina *S. mutans* augimo – tai yra nemažina bakterijų gyvybingumo.

5 pavyzdys – Priešprasminių oligonukleotidų poveikis į bioplėvelės formavimąsi maišytuose *S. mutans* ir *S. sobrinus* kultūrose su kraujo serumu

#### *Laboratoriniai metodai ir rezultatai*

Siekiant įvertinti bandomosios PO1 molekulės (SEQ ID nr. 1) poveikį į bakterinės bioplėvelės formavimąsi *in vitro* terpėje, turinčioje pagrindinio kraujo sudėtinio komponento – serumo, buvo panaudotos maišytos *S. mutans* ir *S. sobrinus* kultūros. *S. mutans* padermė UA159 (Bratthall serotipas c) ir *S. sobrinus* padermė SL1, kurios gautos iš Amerikietiško tipo kultūrų kolekcijos (ATKK nr. 700610 ir ATKK nr. 33478 atitinkamai), 18 val. buvo kultivuotos Todd Hewitt (TH) buljone (Difco), turinčiame 10 % karščiu inaktyvuoto arklio serumo, anaerobinėmis sąlygomis (95% N<sub>2</sub> ir 5% CO<sub>2</sub>) esant 37 °C temperatūrai. Kultūrų grynumas buvo patikrintas Mitis salivarius agare (Difco) ir Kolumbijos kraujo agare (E&O Laboratories). Po to, bakterinių kultūrų optinis tankis (OT) buvo pakoreguotas iki 0,2 naudojant mikroplokštelių skaitymo spektrofotometrą (Dynex MRX) ir parinkus 630 nm bangos ilgį.

Prieš bakterijų išsėjimą, 24-ių šulinėlių plokščiadugnės polistireno ląstelių kultūrų plokštelės (Sarstedt) buvo užpildytos TH buljonu su 10 % karščiu inaktyvuoto arklio serumu. Tada PO1 (SEQ ID nr. 1) ir PO3 (SEQ ID nr. 3) fosforotioato oligodeoksiribonukleotidai, sintezuoti Metabion International AG kompanijoje (Vokietija) panaudojant 1 µmol sintezės skalę ir didelio efektyvumo skysčių chromatografijos gryninimą, buvo pridėti į plokštelės šulinėlius (galutinė koncentracija – 10 µM) kombinacijoje su transfekcijos reagentu – TurboFect™.

Pridėjus į plokšteles PO, *S. mutans* bei *S. sobrinus* kultūrų bakterijos buvo sumaišytos lygiomis dalimis ir išsėtos į šulinėlius taip, kad gauti galutinį praskiedimą 1:100. Nedelsiant, sterilios 1 mm storio stiklo plokštelės, išpjautos iš standartinių mikroskopo objektinių stikliukų (76 × 26 mm; Thermo Fisher Scientific), buvo vertikaliai įdėtos į šulinėlius, o plokštelės inkubuotos anaerobinėmis sąlygomis papildomoms 4 val. 37 °C temperatūroje. Paskui, sterilus sacharozės tirpalas buvo pridėtas į atitinkamus šulinėlius iki 1 % galutinės koncentracijos, o plokštelės vėl inkubuotos anaerobinėmis sąlygomis (95 % N<sub>2</sub> ir 5 % CO<sub>2</sub>) 37 °C temperatūroje dar papildomoms 20 val. Šiame eksperimente skystos terpės (TH buljono) tūris vienam šulinėliui buvo 1 mL; šulinėliai tik su terpe (buljonu) be bakterijų buvo naudoti kaip „tuščia“ kontrolė, o nepaveiktos maišytos *S. mutans* ir *S. sobrinus* bakterijos naudotos kaip eksperimentinė kontrolė.

Praėjus 24 val. bendram inkubacijos laikotarpiui, stiklo plokštelės buvo ištrauktos iš šulinėlių, išdžiovintos ir toliau panaudotos maišytos *S. mutans* ir *S. sobrinus* bioplėvelės analizei Sensofar P Lu 2300 optiniu konfokaliu profilometru. Tuo tikslu buvo atlikti šeši matavimai bioplėvelės šiurkštumui įvertinti ir penki matavimai bioplėvelės storiui įvertinti (kiekvieno matavimo plotas – 180 × 240 μm) per stiklo plokštelės vidurį nuo matomos bioplėvelės apačios iki viršaus panaudojant 50X konfokalinį objektyvą. Nuskanuotų ir pamatuotų bandinių duomenys toliau buvo apdoroti Gwyddion programa (2.27 versija, prieinama internete adresu <http://gwyddion.net>) tuo tikslu, kad kiekybiškai įvertinti bioplėvelės paviršiaus šiurkštumo ir jos storio parametrus, atspindinčius bioplėvelės susiformavimo laipsnį arba „brandą“. Papildomai, Medianinis filtras (dydis – 10 pikselių arba 3 μm) buvo parinktas ir pritaikytas tam, kad pašalinti paviršiaus formos klaidas ir banguotumą. Kiekybiškai vertinant bioplėvelės paviršiaus šiurkštumą buvo apskaičiuojamas vienas iš svarbiausių paviršiaus parametrų – Rq (išmatuoto aukščio nuokrypių vidurkis). Nustatytų paviršiaus parametrų statistinis reikšmingumas buvo įvertintas pritaikant SPSS statistinės programos (20.0 versija) One-Way ANOVA metodą su LSD Post Hoc testu. Mažesnė už 0,05 *p* reikšmė buvo laikyta statistiškai reikšminga.

Taikant optinės konfokalinės profilometrijos metodą stiklo plokštelių su maišytų *S. mutans* ir *S. sobrinus* bioplėvelių paviršiaus analizei buvo atskleista, kad 1% sacharozės ir 10% kraujo serumo TH buljone žymiai padidina bioplėvelės paviršiaus šiurkštumo parametą – Rq bei bioplėvelės storį palyginus su nepaveiktomis

bakterijomis, augusiomis su 10% serumu, bet be sacharozės (fig. 8a ir fig. 9a ir 9b). Šiuo atveju, tai rodo, kad 1% sacharozės terpėje stimuliuo bakterijų prisitvirtinimą (adheziją) prie stiklo plokštelės paviršiaus ir bioplėvelės formavimąsi. Tačiau bandomoji PO1 molekulė (SEQ ID nr. 1) kombinacijoje su TurboFect™ reagentu 25% sumažino maišytų *S. mutans* ir *S. sobrinus* kultūrų bioplėvelės šiurkštumą (Rq) TH buljone, turinčiame 1% sacharozės ir 10% kraujo serumo, lyginant su bakterijomis, paveiktomis PO3 (SEQ ID nr. 3) kombinacijoje su TurboFect™ reagentu ( $p < 0,05$ ) (fig. 8b ir 8c ir fig.9a). Be to, bandomoji PO1 molekulė (SEQ ID nr. 1) kombinacijoje su TurboFect™ reagentu 44% sumažino maišytų *S. mutans* ir *S. sobrinus* kultūrų bioplėvelės storį TH buljone, turinčiame 1% sacharozės ir 10% kraujo serumo, palyginus su nepaveiktomis bakterijomis bei bakterijomis, paveiktomis PO3 (SEQ ID nr. 3) kombinacijoje su TurboFect™ reagentu ( $p < 0,05$ ) (fig. 8 ir fig. 9b). Remiantis šiais rezultatais galima daryti išvadą, kad bandomoji PO1 molekulė (SEQ ID nr. 1) efektyviai sumažina *S. mutans* bei *S. sobrinus* adheziją ir bioplėvelės formavimąsi ant standaus paviršiaus (stiklo plokštelės) terpėje, turinčioje pagrindinio kraujo sudėtinio komponento – serumo, *in vitro* sąlygomis.

1 priedas. PO sekų sąrašas ir aprašymas

Seka Nr. 1 (SEQ ID nr. 1):

5'-GCAGACCATTGCTTAATCT-3'

Ilgis: 19 nukleotidų (nt)

Cheminė struktūra: deoksiribonukleorūgštis (DNR)

Kilmė: dirbtinai susintetinta izoliuota priešprasminė nukleotidų seka

Funkcija: ši seka yra SEQ ID nr. 13 išvestinė, pagal komplementarumo principą jungiasi su atitinkama sritimi *S. mutans gtfB* ir *gtfC* iRNR bei *S. sobrinus gtfI* iRNR sukeldama priešprasminį efektą. Esamuose eksperimentuose tai yra testuojama seka.

Seka Nr. 2 (SEQ ID nr. 2):

5'-ACGCACTTTCTTGTCCAT-3'

Ilgis: 18 nt

Cheminė struktūra: DNR

Kilmė: dirbtinai susintetinta izoliuota priešprasminė nukleotidų seka

Funkcija: ši seka jungiasi pagal komplementarumo principą su sritimi, esančia *S. mutans gtfB* iRNR translacijos pradžios srityje, sukeldama priešprasminį efektą, remiantis Guo ir kt. *Treatment of Streptococcus mutans with antisense oligodeoxyribonucleotides to gtfB mRNA inhibits GtfB expression and function*. FEMS Microbiol. Lett. 264 (2006), p. 8-14. Esamuose eksperimentuose ji naudojama kaip teigiama kontrolė.

Seka Nr. 3 (SEQ ID nr. 3):

5'-ACTCGTATGCTACAGCTAT-3'

Ilgis: 19 nt

Cheminė struktūra: DNR

Kilmė: dirbtinai susintetinta izoliuota priešprasminė nukleotidų seka

Funkcija: ši seka yra SEQ ID nr.1 analogas su tokia pačia molekuline mase ir nukleotidų kiekiu, tačiau turinti išmaišytą atsitiktinę tvarką nukleotidų eiliškumą. Dėl pastarosios priežasties ji nesukelia priešprasminio efekto ir todėl esamuose eksperimentuose naudojama kaip neigiama kontrolė.

Seka Nr. 4 (SEQ ID nr. 4):

5'-CAGACCATTGCTTAATCT-3'

Ilgis: 18 nt

Cheminė struktūra: DNR

Kilmė: dirbtinai susintetinta izoliuota priešprasminė nukleotidų seka

Funkcija: ši seka yra SEQ ID nr.1 analogas, turintis tokį patį nukleotidų išsidėstymo eiliškumą, tačiau sutrumpintas vienu nukleotidu nuo 5'- galo. Pagal komplementarumo principą ji gali jungtis su atitinkama sritimi *S. mutans gtfB* ir *gtfC* iRNR bei *S. sobrinus gtfI* iRNR sukeldama priešprasminį efektą, remiantis literatūros duomenimis (Fakler ir kt. *Short antisense oligonucleotide-mediated inhibition is strongly dependent on oligo length and concentration but almost independent of location of the target sequence*. J. Biol. Chem. 269 (1994), p. 16187-16194).

Seka Nr. 5 (SEQ ID nr. 5):

5'-AGACCATTGCTTAATCT-3'

Ilgis: 17 nt

Cheminė struktūra: DNR

Kilmė: dirbtinai susintetinta izoliuota priešprasminė nukleotidų seka

Funkcija: ši seka yra SEQ ID nr.1 analogas, turintis tokį patį nukleotidų išsidėstymo eiliškumą, tačiau sutrumpintas dviem nukleotidais nuo 5'- galo. Pagal komplementarumo principą ji gali jungtis su atitinkama sritimi *S. mutans gtfB* ir *gtfC* iRNR bei *S. sobrinus gtfI* iRNR sukeldama priešprasminį efektą, remiantis literatūros duomenimis (Fakler ir kt. *Short antisense oligonucleotide-mediated inhibition is strongly dependent on oligo length and concentration but almost independent of location of the target sequence*. J. Biol. Chem. 269 (1994), p. 16187-16194).

Seka Nr. 6 (SEQ ID nr. 6):

5'-GACCATTGCTTAATCT-3'

Ilgis: 16 nt

Cheminė struktūra: DNR

Kilmė: dirbtinai susintetinta izoliuota priešprasminė nukleotidų seka

Funkcija: ši seka yra SEQ ID nr.1 analogas, turintis tokį patį nukleotidų išsidėstymo eiliškumą, tačiau sutrumpintas trimis nukleotidais nuo 5'- galo. Pagal komplementarumo principą ji gali jungtis su atitinkama sritimi *S. mutans gtfB* ir *gtfC* iRNR bei *S. sobrinus gtfI* iRNR sukeldama priešprasminį efektą, remiantis literatūros duomenimis (Fakler ir kt. *Short antisense oligonucleotide-mediated inhibition is strongly dependent on oligo length and concentration but almost independent of location of the target sequence*. J. Biol. Chem. 269 (1994), p. 16187-16194).

Seka Nr. 7 (SEQ ID nr. 7):

5'-GCAGACCATTGCTTAATC-3'

Ilgis: 18 nt

Cheminė struktūra: DNR

Kilmė: dirbtinai susintetinta izoliuota priešprasminė nukleotidų seka

Funkcija: ši seka yra SEQ ID nr.1 analogas, turintis tokį patį nukleotidų išsidėstymo eiliškumą, tačiau sutrumpintas vienu nukleotidu nuo 3'- galo. Pagal komplementarumo principą ji gali jungtis su atitinkama sritimi *S. mutans gtfB* ir *gtfC* iRNR bei *S. sobrinus gtfI* iRNR sukeldama priešprasminį efektą, remiantis literatūros duomenimis (Fakler ir kt. *Short antisense oligonucleotide-mediated inhibition is strongly dependent on oligo length and concentration but almost independent of location of the target sequence*. J. Biol. Chem. 269 (1994), p. 16187-16194).

Seka Nr. 8 (SEQ ID nr. 8):

5'-GCAGACCATTGCTTAAT-3'

Ilgis: 17 nt

Cheminė struktūra: DNR

Kilmė: dirbtinai susintetinta izoliuota priešprasminė nukleotidų seka

Funkcija: ši seka yra SEQ ID nr.1 analogas, turintis tokį patį nukleotidų išsidėstymo eiliškumą, tačiau sutrumpintas dviem nukleotidais nuo 3'- galo. Pagal

komplementarumo principą ji gali jungtis su atitinkama sritimi *S. mutans gtfB* ir *gtfC* iRNR bei *S. sobrinus gtfI* iRNR sukeldama priešprasminį efektą, remiantis literatūros duomenimis (Fakler ir kt. *Short antisense oligonucleotide-mediated inhibition is strongly dependent on oligo length and concentration but almost independent of location of the target sequence*. J. Biol. Chem. 269 (1994), p. 16187-16194).

Seka Nr. 9 (SEQ ID nr. 9):

5'-GCAGACCATTGCTTAA-3'

Ilgis: 16 nt

Cheminė struktūra: DNR

Kilmė: dirbtinai susintetinta izoliuota priešprasminė nukleotidų seka

Funkcija: ši seka yra SEQ ID nr.1 analogas, turintis tokį patį nukleotidų išsidėstymo eiliškumą, tačiau sutrumpintas trimis nukleotidais nuo 3'- galo. Pagal komplementarumo principą ji gali jungtis su atitinkama sritimi *S. mutans gtfB* ir *gtfC* iRNR bei *S. sobrinus gtfI* iRNR sukeldama priešprasminį efektą, remiantis literatūros duomenimis (Fakler ir kt. *Short antisense oligonucleotide-mediated inhibition is strongly dependent on oligo length and concentration but almost independent of location of the target sequence*. J. Biol. Chem. 269 (1994), p. 16187-16194).

Seka Nr. 10 (SEQ ID nr. 10):

5'-CAGACCATTGCTTAATC-3'

Ilgis: 17 nt

Cheminė struktūra: DNR

Kilmė: dirbtinai susintetinta izoliuota priešprasminė nukleotidų seka

Funkcija: ši seka yra SEQ ID nr.1 analogas, turintis tokį patį nukleotidų išsidėstymo eiliškumą, tačiau sutrumpintas dviem nukleotidais – vienu nuo 5'- galo ir vienu nuo 3'- galo. Pagal komplementarumo principą ji gali jungtis su atitinkama sritimi *S. mutans gtfB* ir *gtfC* iRNR bei *S. sobrinus gtfI* iRNR sukeldama priešprasminį efektą, remiantis literatūros duomenimis (Fakler ir kt. *Short antisense oligonucleotide-mediated inhibition is strongly dependent on oligo length and concentration but almost*

*independent of location of the target sequence*. J. Biol. Chem. 269 (1994), p. 16187-16194).

Seka Nr. 11 (SEQ ID nr. 11):

5'-AGACCATTGCTTAATC-3'

Ilgis: 16 nt

Cheminė struktūra: DNR

Kilmė: dirbtinai susintetinta izoliuota priešprasminė nukleotidų seka

Funkcija: ši seka yra SEQ ID nr.1 analogas, turintis tokį patį nukleotidų išsidėstymo eiliškumą, tačiau sutrumpintas trimis nukleotidais – dviem nuo 5'- galo ir vienu nuo 3'- galo. Pagal komplementarumo principą ji gali jungtis su atitinkama sritimi *S. mutans gtfB* ir *gtfC* iRNR bei *S. sobrinus gtfI* iRNR sukeldama priešprasminį efektą, remiantis literatūros duomenimis (Fakler ir kt. *Short antisense oligonucleotide-mediated inhibition is strongly dependent on oligo length and concentration but almost independent of location of the target sequence*. J. Biol. Chem. 269 (1994), p. 16187-16194).

Seka Nr. 12 (SEQ ID nr. 12):

5'-CAGACCATTGCTTAAT-3'

Ilgis: 16 nt

Cheminė struktūra: DNR

Kilmė: dirbtinai susintetinta izoliuota priešprasminė nukleotidų seka

Funkcija: ši seka yra SEQ ID nr.1 analogas, turintis tokį patį nukleotidų išsidėstymo eiliškumą, tačiau sutrumpintas trimis nukleotidais – vienu nuo 5'- galo ir dviem nuo 3'- galo. Pagal komplementarumo principą ji gali jungtis su atitinkama sritimi *S. mutans gtfB* ir *gtfC* iRNR bei *S. sobrinus gtfI* iRNR sukeldama priešprasminį efektą, remiantis literatūros duomenimis (Fakler ir kt. *Short antisense oligonucleotide-mediated inhibition is strongly dependent on oligo length and concentration but almost independent of location of the target sequence*. J. Biol. Chem. 269 (1994), p. 16187-16194).

Seka Nr. 13 (SEQ ID nr. 13):

5'-TTGGCAGACCATTGCTTAATCTTAAC-3'

Ilgis: 26 nt

Cheminė struktūra: DNR

Kilmė: dirbtinai susintetinta izoliuota priešprasminė nukleotidų seka

Funkcija: ši seka pagal komplementarumo principą gali jungtis su atitinkama 26 nt sritimi *S. mutans gtfB* ir *gtfC* iRNR bei *S. sobrinus gtfI* iRNR sukeldama priešprasminį efektą. Ji yra komplementari sekai Nr. 16, kuri turi 100% homologines sritis *S. mutans gtfB*, *gtfC*, *S. criceti gtfI*, *S. dentirousetti gtfI*, *S. dentisuis gtfI* ir *S. orisuis gtf* genuose, o taip pat homologines sritis su dviejų nukleotidų neatitikimu *S. downei gtf* pirmtako ir *S. sobrinus gtfI* genuose.

Seka Nr. 14 (SEQ ID nr. 14):

5'-

UCUGUUAAGAUUAAGCAAUGGUCUGCCAAGUACUUUAAUGGGACAAA  
UAUUUUAGGGCGCGGAGCAGGCUAUGUCUUAAGA-3'

Ilgis: 83 nt

Cheminė struktūra: ribonukleorūgštis (RNR)

Kilmė: natūrali seka, esanti *S. mutans gtfB* iRNR

Funkcija: reikalinga transliacijai atlikti; koduoja amino rūgštis atitinkamoje *S. mutans GtfB* baltymo srityje. Prie šios sekos atitinkamos srities gali jungtis priešprasminiai oligonukleotidai, turintys sekas Nr. 1 ir Nr. 4-13, sukeldami priešprasminį efektą.

Seka Nr. 15 (SEQ ID nr. 15):

5'-GCAGACCATTGTTTAATCT-3'

Ilgis: 19 nt

Cheminė struktūra: DNR

Kilmė: natūrali seka, esanti *S. sobrinus gtfI* gene

Funkcija: koduoja sritį *S. sobrinus gtfI* iRNR, prie kurios gali jungtis priešprasminiai oligonukleotidai (su vieno nukleotido neatitikimu), turintys sekas Nr. 1 ir Nr. 4-12, sukeldami priešprasminį efektą.

Seka Nr. 16 (SEQ ID nr. 16):

5'-GTTAAGATTAAGCAATGGTCTGCCAA-3'

Ilgis: 26 nt

Cheminė struktūra: DNR

Kilmė: natūrali seka, esanti *S. mutans gtfB* gene

Funkcija: koduoja sritį *S. mutans gtfB* iRNR, prie kurios gali jungtis priešprasminiai oligonukleotidai, turintys sekas Nr. 1 ir Nr. 4-13, sukeldami priešprasminį efektą. Ši seka turi 100% homologines sritis *S. mutans gtfC*, *S. criceti gtfI*, *S. dentirousetti gtfI*, *S. dentisuis gtfI* ir *S. orisuis gtf* genuose, o taip pat homologines sritis su dviejų nukleotidų neatitikimu *S. downei gtf* pirmtako ir *S. sobrinus gtfI* genuose.

Seka Nr. 17 (SEQ ID nr. 17):

5'-AGATTAAGCAATGGTCTGC-3'

Ilgis: 19 nt

Cheminė struktūra: DNR

Kilmė: natūrali seka, esanti *S. mutans gtfB* gene

Funkcija: koduoja sritį *S. mutans gtfB* iRNR, prie kurios gali jungtis priešprasminiai oligonukleotidai, turintys sekas Nr. 1 ir Nr. 4-12, sukeldami priešprasminį efektą. Ši seka yra SEQ ID nr. 16 išvestinė.

Seka Nr. 18 (SEQ ID nr. 18):

5'-CGCGTCATGTTTGAAGGTTTCTCTAA-3'

Ilgis: 26 nt

Cheminė struktūra: DNR

Kilmė: natūrali seka, esanti *S. mutans gtfB* gene

Funkcija: koduoja sritį *S. mutans gtfB* iRNR, prie kurios gali jungtis priešprasminiai oligonukleotidai, turintys sekas Nr. 19-24, sukeldami priešprasminį efektą. Ši seka turi 100% homologines sritis fig. 7 nurodytuose *Streptococcus* rūšių ir padermių gliukoziltransferazių genuose.

Seka Nr. 19 (SEQ ID nr. 19):

5'-TTAGAGAAACCTTCAAACATGACGCG-3'

Ilgis: 26 nt

Cheminė struktūra: DNR

Kilmė: dirbtinai susintetinta izoliuota priešprasminė nukleotidų seka

Funkcija: ši seka pagal komplementarumo principą gali jungtis su atitinkama 26 nt sritimi *S. mutans gtfB* ir *gtfC* iRNR bei *S. sobrinus gtfI* iRNR sukeldama priešprasminį efektą. Ji yra komplementari sekai Nr. 18, kuri turi 100% homologines sritis fig. 7 nurodytuose *Streptococcus* rūšių ir padermių gliukoziltransferazių genuose.

Seka Nr. 20 (SEQ ID nr. 20):

5'-GAAACCTTCAAACATGACGC-3'

Ilgis: 20 nt

Cheminė struktūra: DNR

Kilmė: dirbtinai susintetinta izoliuota priešprasminė nukleotidų seka

Funkcija: ši seka yra SEQ ID nr. 19 išvestinė, pagal komplementarumo principą jungiasi su atitinkama sritimi *S. mutans gtfB* ir *gtfC* iRNR bei *S. sobrinus gtfI* iRNR sukeldama priešprasminį efektą. Tai yra testuojama seka, kuri parinkta panaudojant „Antisense Design“ programą (Integrated DNA Technologies:

<http://eu.idtdna.com/Scitools/Applications/AntiSense/Antisense.aspx?source=menu>).

Seka Nr. 21 (SEQ ID nr. 21):

5'-AAACCTTCAAACATGACGC-3'

Ilgis: 19 nt

Cheminė struktūra: deoksiribonukleorūgštis (DNR)

Kilmė: dirbtinai susintetinta izoliuota priešprasminė nukleotidų seka

Funkcija: ši seka yra SEQ ID nr. 19 išvestinė, pagal komplementarumo principą jungiasi su atitinkama sritimi *S. mutans gtfB* ir *gtfC* iRNR bei *S. sobrinus gtfI* iRNR sukeldama priešprasminį efektą. Tai yra testuojama seka, kuri parinkta panaudojant „Antisense Design“ programą (Integrated DNA Technologies: <http://eu.idtdna.com/Scitools/Applications/AntiSense/Antisense.aspx?source=menu>).

Seka Nr. 22 (SEQ ID nr. 22):

5'-GAAACCTTCAAACATGACGCG-3'

Ilgis: 21 nt

Cheminė struktūra: deoksiribonukleorūgštis (DNR)

Kilmė: dirbtinai susintetinta izoliuota priešprasminė nukleotidų seka

Funkcija: ši seka yra SEQ ID nr. 19 išvestinė, pagal komplementarumo principą jungiasi su atitinkama sritimi *S. mutans gtfB* ir *gtfC* iRNR bei *S. sobrinus gtfI* iRNR sukeldama priešprasminį efektą. Tai yra testuojama seka, kuri parinkta panaudojant „Antisense Design“ programą (Integrated DNA Technologies: <http://eu.idtdna.com/Scitools/Applications/AntiSense/Antisense.aspx?source=menu>).

Seka Nr. 23 (SEQ ID nr. 23):

5'-GAAACCTTCAAACATGACG-3'

Ilgis: 19 nt

Cheminė struktūra: deoksiribonukleorūgštis (DNR)

Kilmė: dirbtinai susintetinta izoliuota priešprasminė nukleotidų seka

Funkcija: ši seka yra SEQ ID nr. 19 išvestinė, pagal komplementarumo principą jungiasi su atitinkama sritimi *S. mutans gtfB* ir *gtfC* iRNR bei *S. sobrinus gtfI* iRNR sukeldama priešprasminį efektą. Tai yra testuojama seka, kuri parinkta panaudojant „Antisense Design“ programą (Integrated DNA Technologies: <http://eu.idtdna.com/Scitools/Applications/AntiSense/Antisense.aspx?source=menu>).

Seka Nr. 24 (SEQ ID nr. 24):

5'-AGAAACCTTCAAACATGACGC-3'

Ilgis: 21 nt

Cheminė struktūra: deoksiribonukleorūgštis (DNR)

Kilmė: dirbtinai susintetinta izoliuota priešprasminė nukleotidų seka

Funkcija: ši seka yra SEQ ID nr. 19 išvestinė, pagal komplementarumo principą jungiasi su atitinkama sritimi *S. mutans gtfB* ir *gtfC* iRNR bei *S. sobrinus gtfI* iRNR sukeldama priešprasminį efektą. Tai yra testuojama seka, kuri parinkta panaudojant „Antisense Design“ programą (Integrated DNA Technologies: <http://eu.idtdna.com/Scitools/Applications/AntiSense/Antisense.aspx?source=menu>).

## IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Priešprasminiai oligonukleotidai (PO) aterosklerozės ir kardiovaskuliarinių infekcijų prevencijai, atitinkantys šiuos požymius:

- a) PO sudaryti iš nukleotidų sekų pagal SEQ ID nr. 1, 13, 19;
- b) PO sudaryti iš sekų SEQ ID nr. 1, 13, 19 fragmentų; arba
- c) PO, kurių nukleotidų sekos ne mažiau kaip 85% sutampa su sekomis SEQ ID nr. 1, 13, 19.

2. PO pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad nukleotidų sekos nurodytos SEQ ID nr. 1, 13, 19 skiriasi vienu, dviem, trim arba keturiais nukleotidais.

3. PO pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad nukleotidų sekas sudaro fragmentai ar dalys, kurie parinkti iš šių sekų grupės: SEQ ID nr. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 20, 21, 22, 23, 24.

4. PO pagal bet kurį iš 1-3 punktų, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad PO konjuguoti su peptidu prasiskverbiančiu per ląstelės membraną.

5. PO pagal bet kurį iš 1-4 punktų, panaudojami aterosklerozinių plokštelių ir/ar židinių susiformavimo profilaktikai, prevencijai, slopinimui ir mažinimui ant žmogaus kardiovaskulinių audinių ir/ar žmogaus kraujo terpėje.

6. Biofarmacinė kompozicija medicininiam panaudojimui susidedanti iš aktyviosios medžiagos ir adjuvantų ir/ar nešėjų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad jos aktyviąją medžiagą sudaro PO pagal bet kurį iš 1-4 punktų.

7. Biofarmacinė kompozicija pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad joje naudojamas nešėjas yra katijoninis polimeras.

8. Biofarmacinė kompozicija, pagal bet kurį iš 6,7 punktus, skirta aterosklerozės gydymui ar prevencijai.

9. Biofarmacinė kompozicija, pagal bet kurį iš 6,7 punktus, skirta bakterinio endokardito gydymui ar prevencijai.

10. Biofarmacinė kompozicija pagal bet kurį iš 6,7 punktus, skirta paviršių besiliečiančių su žmogaus krauju ir audiniais, vamzdelių, kateterių, dializės membranų, zondu, vožtuvų, protezų, implantų apdorojimui, siekiant antibakterinio poveikio

nukreipto į *S. mutans* ir *S. sobrinus* ant tokių paviršių.

11. Biofarmacinė kompozicija, pagal bet kurį iš 6,7 punktus, skirta paviršių besiliečiančių su žmogaus krauju ir audiniais, vamzdelių, kateterių, dializės membranų, zondu, vožtuvų, protezų, implantų apdorojimui, aterosklerozinių plokštelių ir/ar židinių susiformavimo profilaktikai, prevencijai, slopinimui ir mažinimui ant tokių paviršių.

12. Biofarmacinė kompozicija, pagal bet kurį iš 6,7 punktus, skirta paviršių besiliečiančių su žmogaus krauju ir audiniais, vamzdelių, kateterių, dializės membranų, zondu, vožtuvų, protezų, implantų apdorojimui, siekiant sumažinti bakterinių bioplėvelų atsiradimą ir augimą.

13. *S. mutans* ir *S. sobrinus* bakterijų kolonijų kontrolės būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad naudojant biofarmacinę kompoziciją pagal 6,7 punktus specifiskai ir vienu metu slopina *gtfB* ir *gtfC* iRNR raišką *S. mutans* bakterijoje ir *gtfI* iRNR raišką *S. sobrinus* bakterijoje, taip pat vienu metu slopina šių bakterijų gebėjimą sintezuoti vandenyje netirpių gliukanų ir dalinai vandenyje tirpių gliukanų polimerus ir mažina šių bakterijų gebėjimą sintetinti bioplėvelių karkasą sudarančius ekzopolisacharidus.

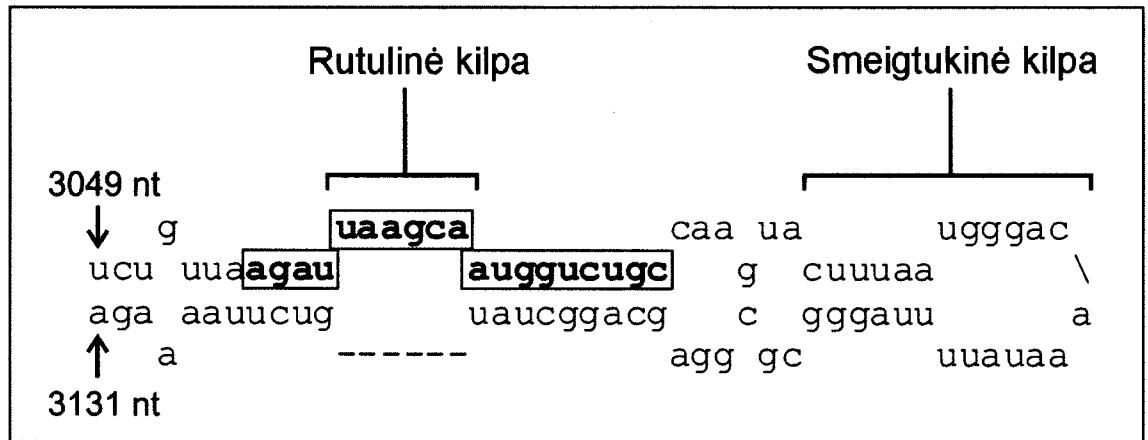


Fig. 1

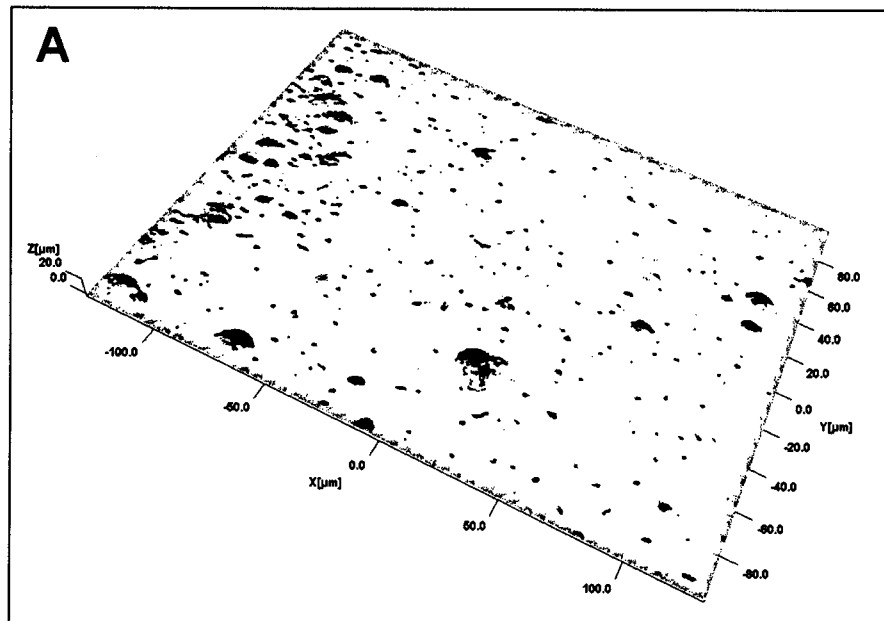


Fig. 2a

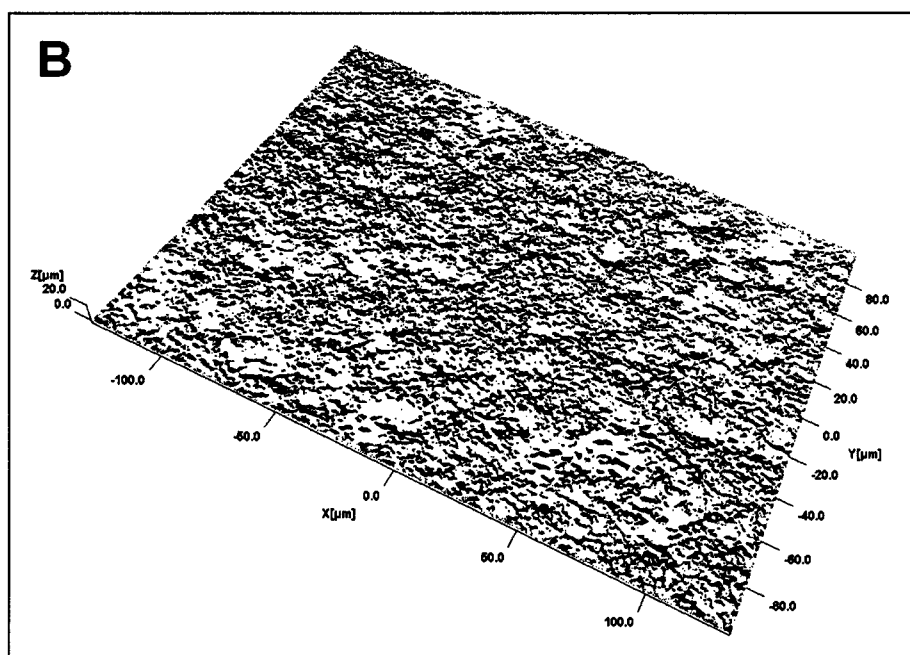


Fig. 2b

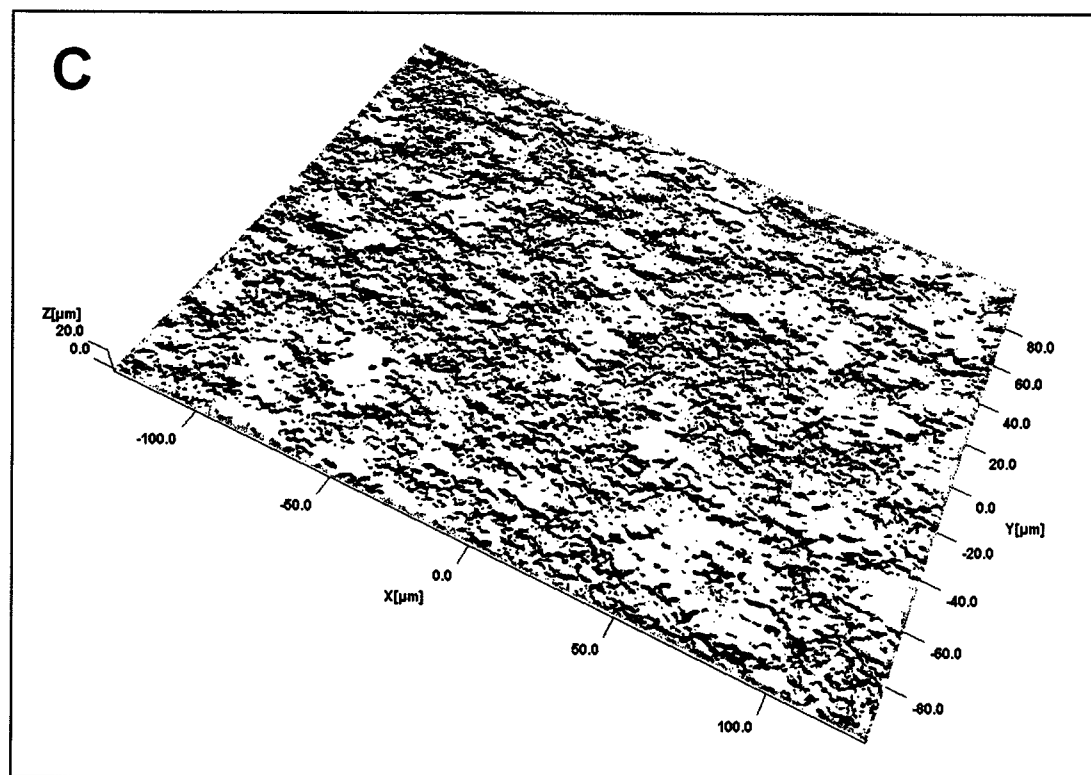


Fig. 2c

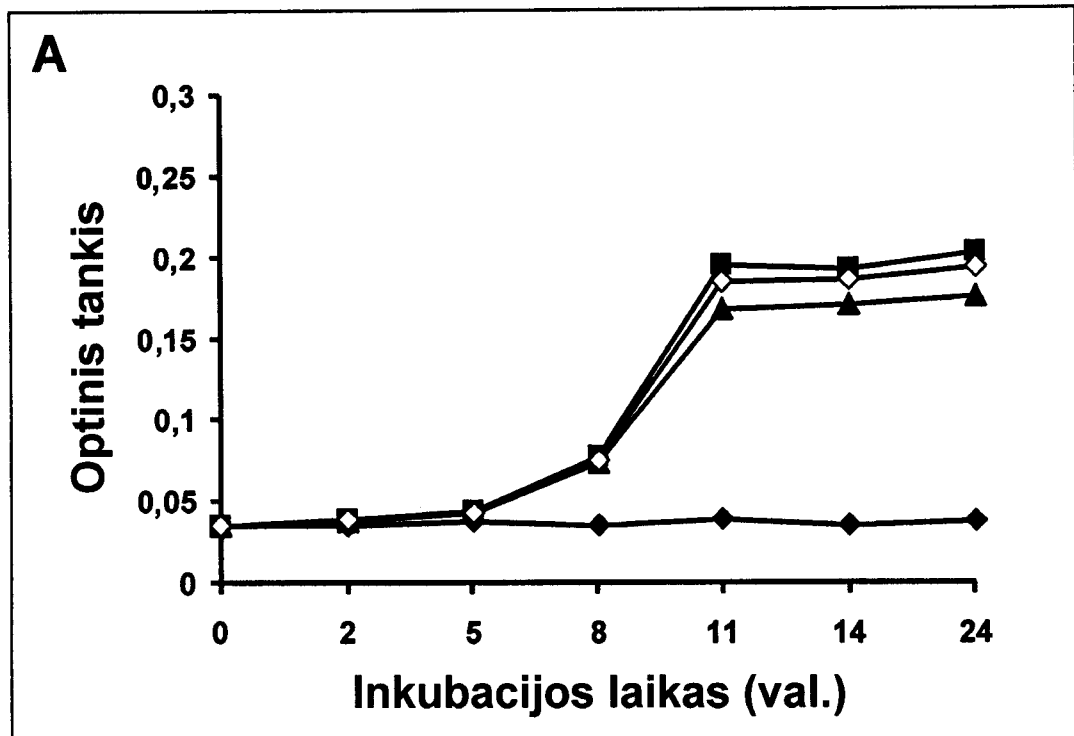


Fig. 3a

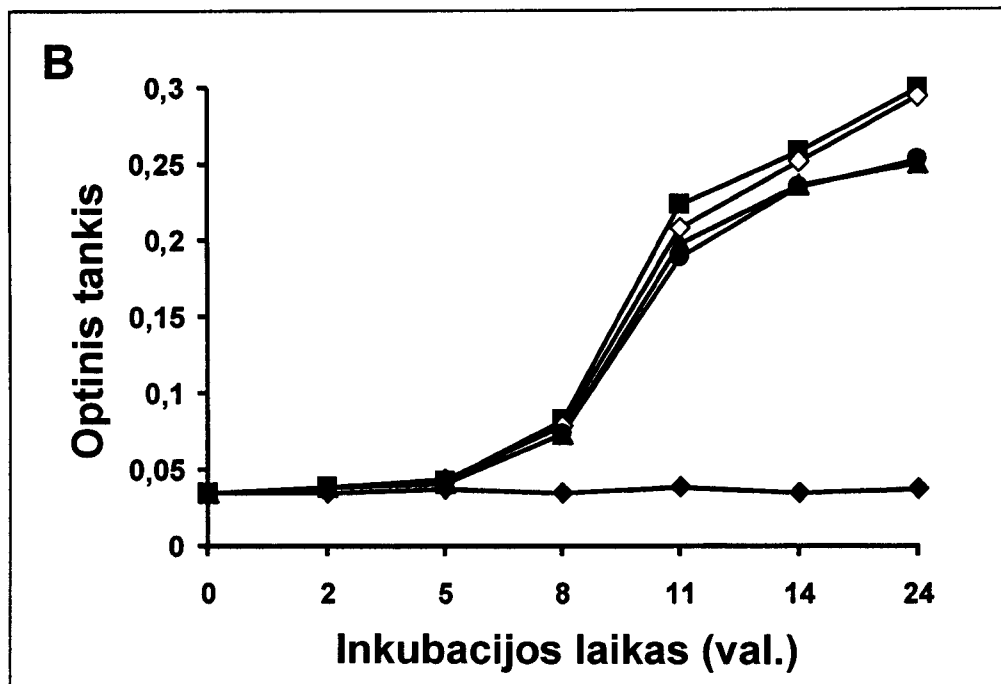


Fig. 3b

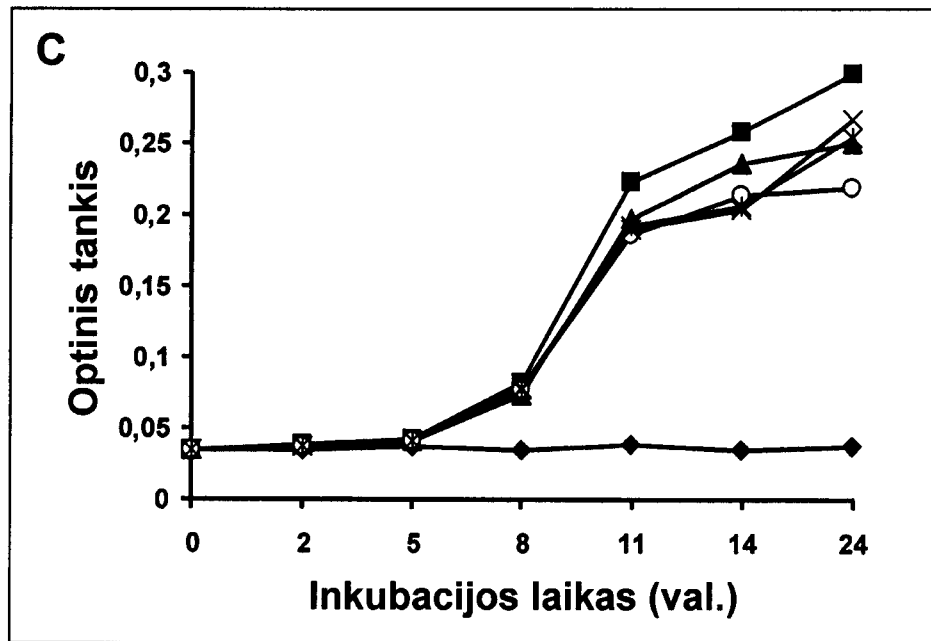


Fig. 3c

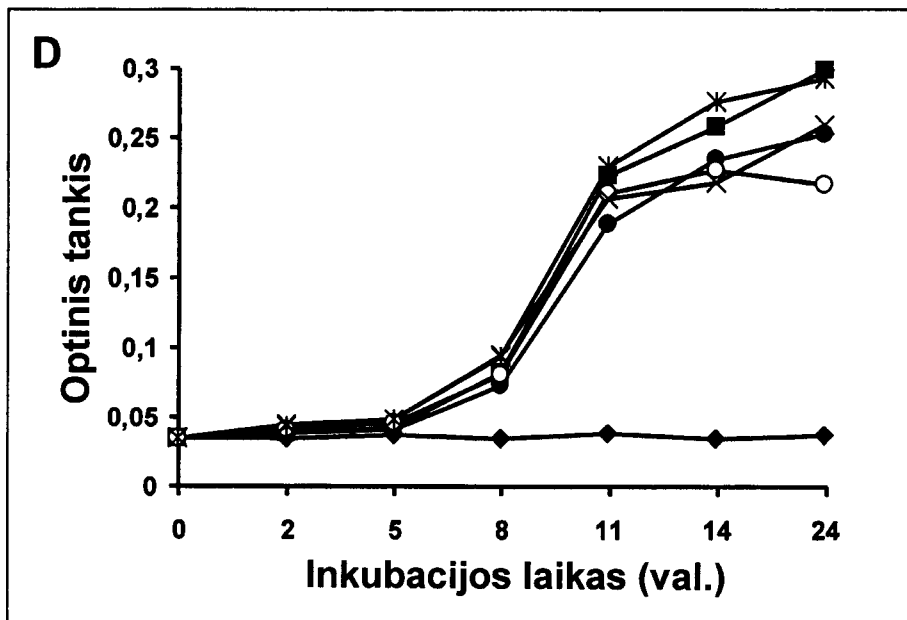


Fig. 3d

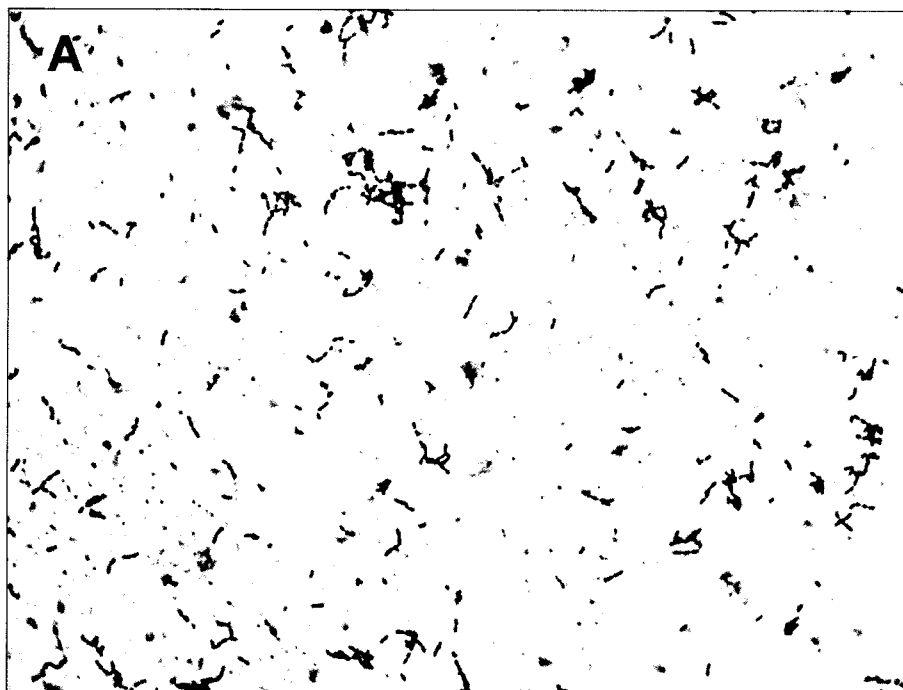


Fig. 4a

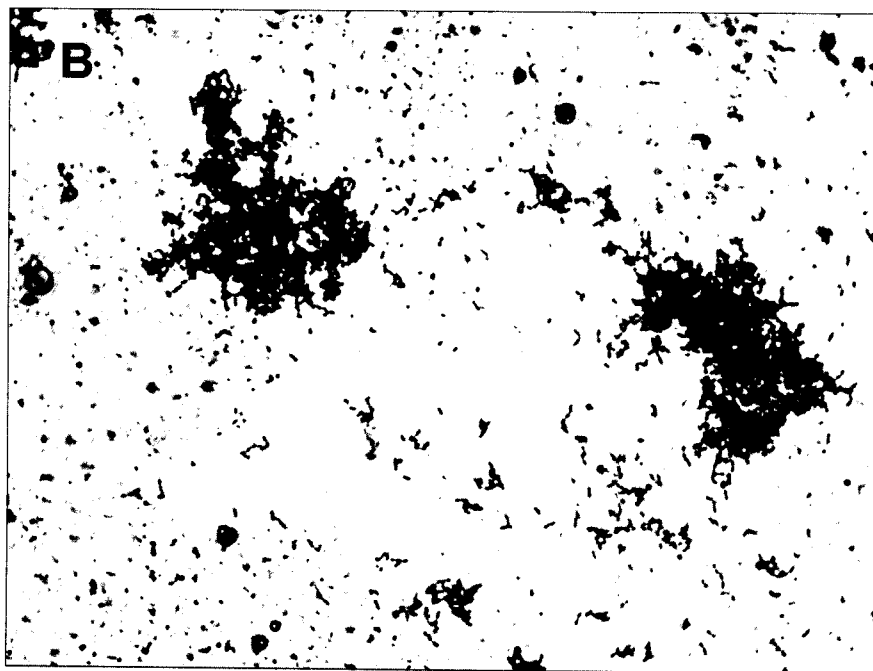


Fig. 4b

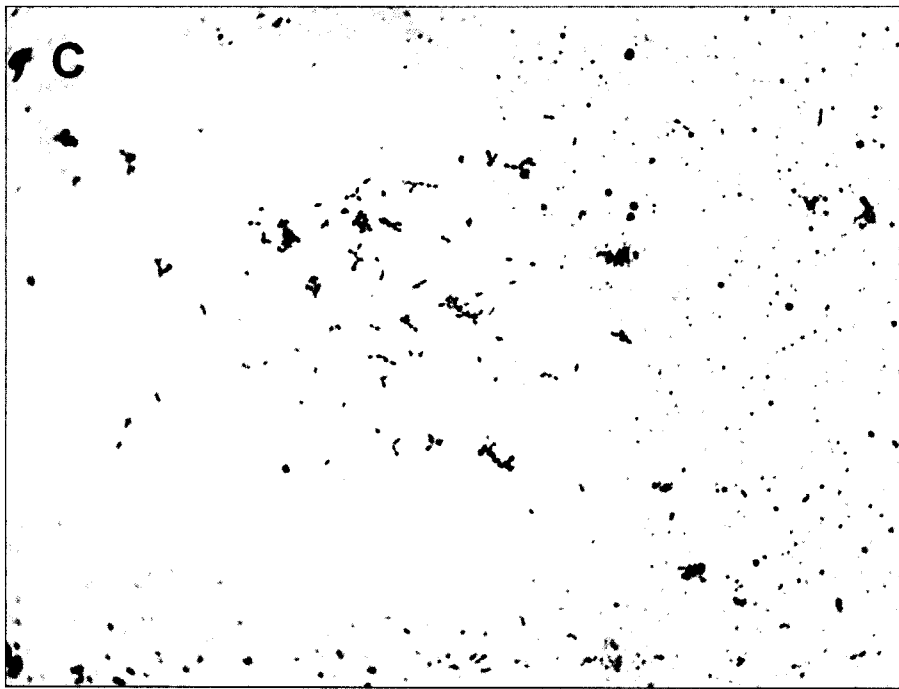


Fig. 4c

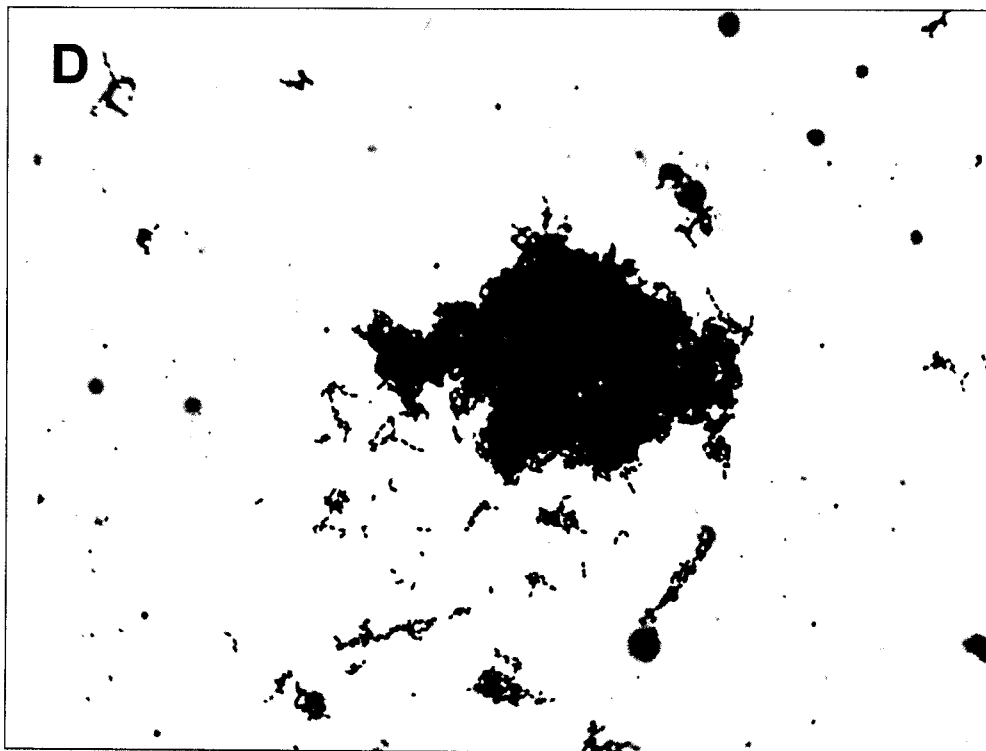


Fig. 4d

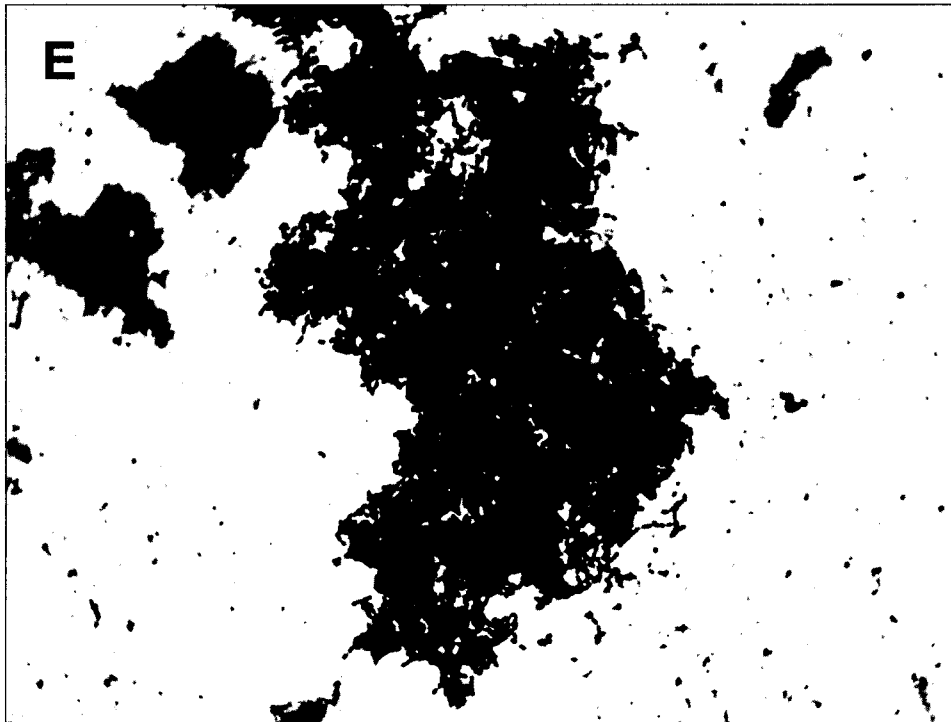


Fig. 4e

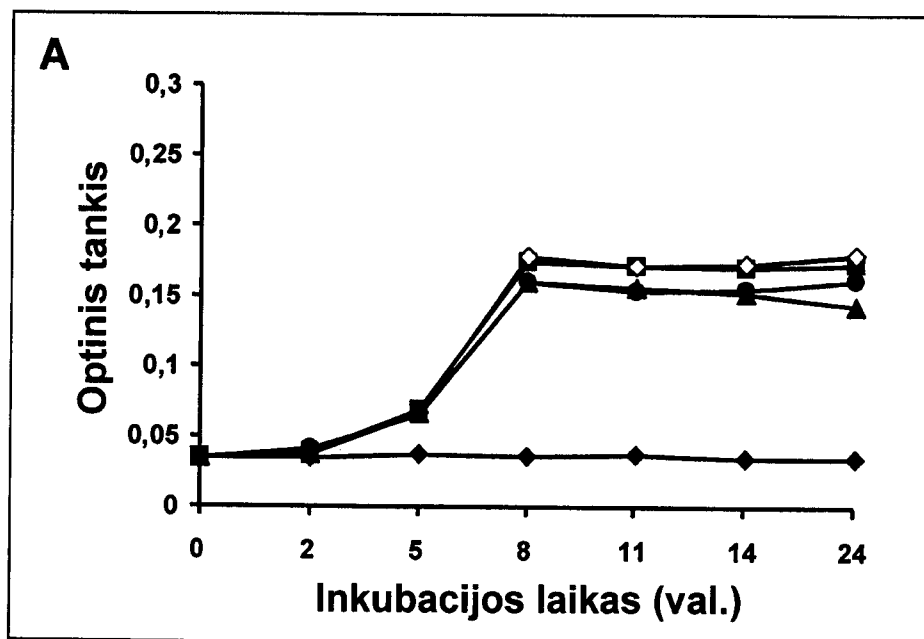


Fig. 5a

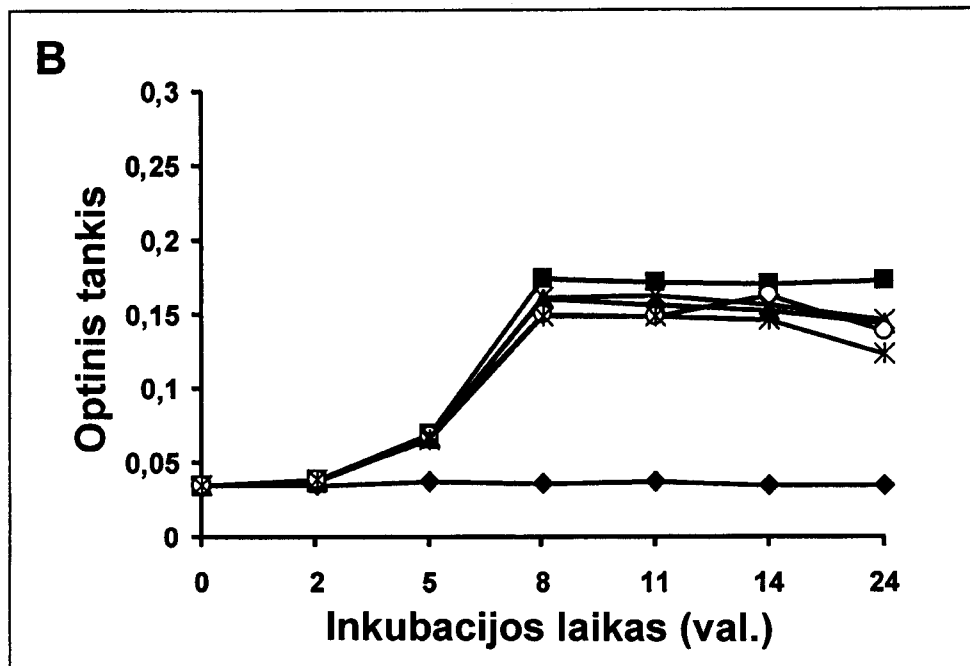


Fig. 5b

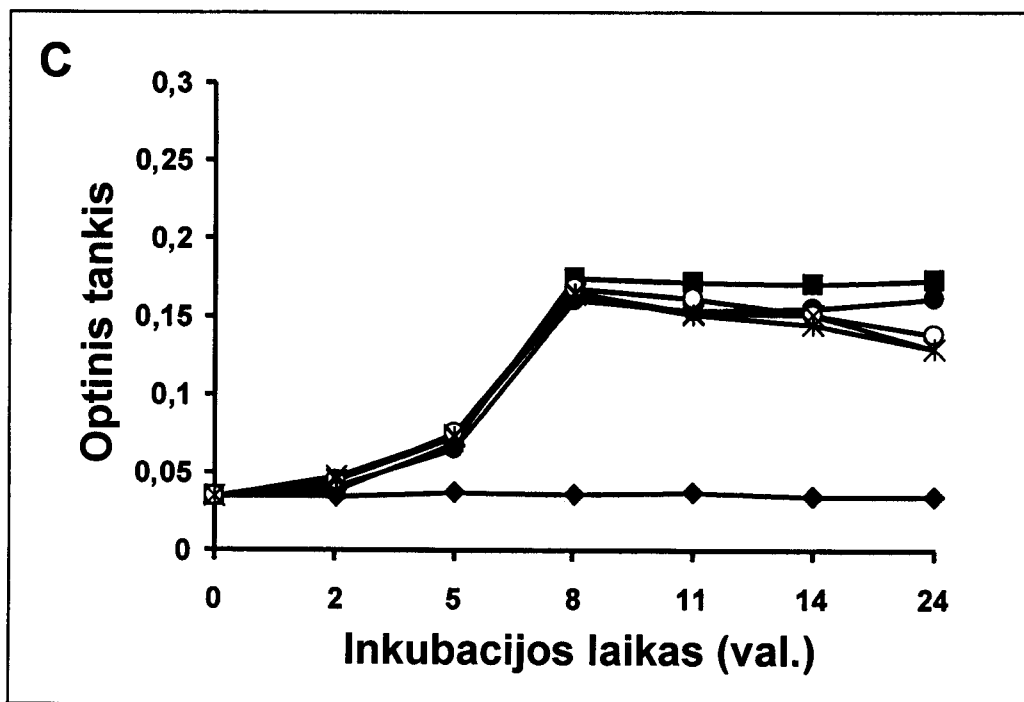


Fig. 5c

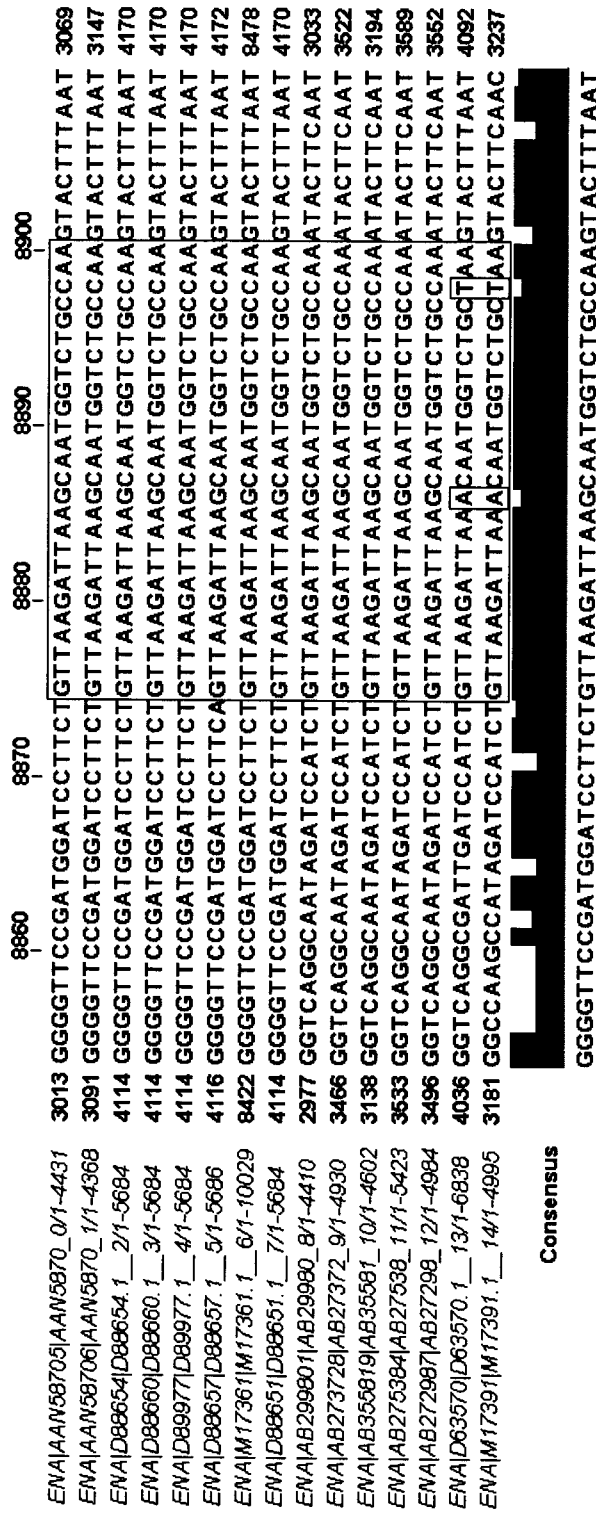


Fig. 6

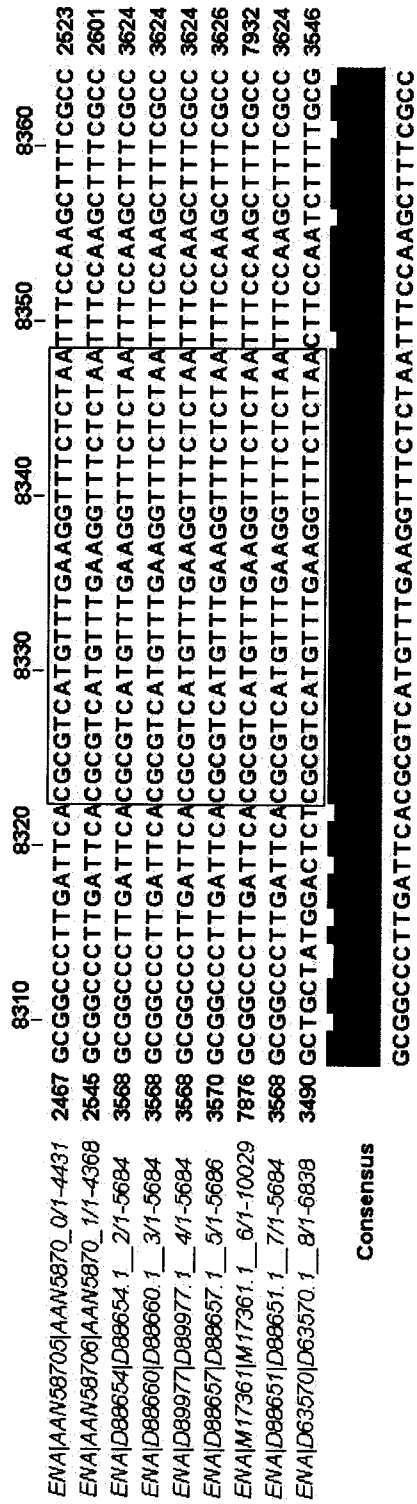


Fig. 7

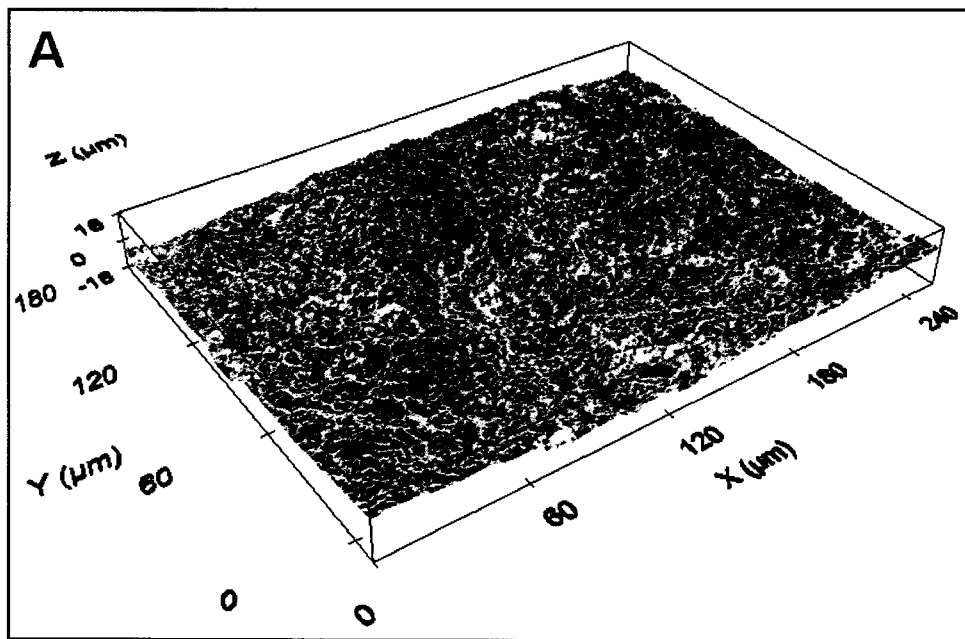


Fig. 8a

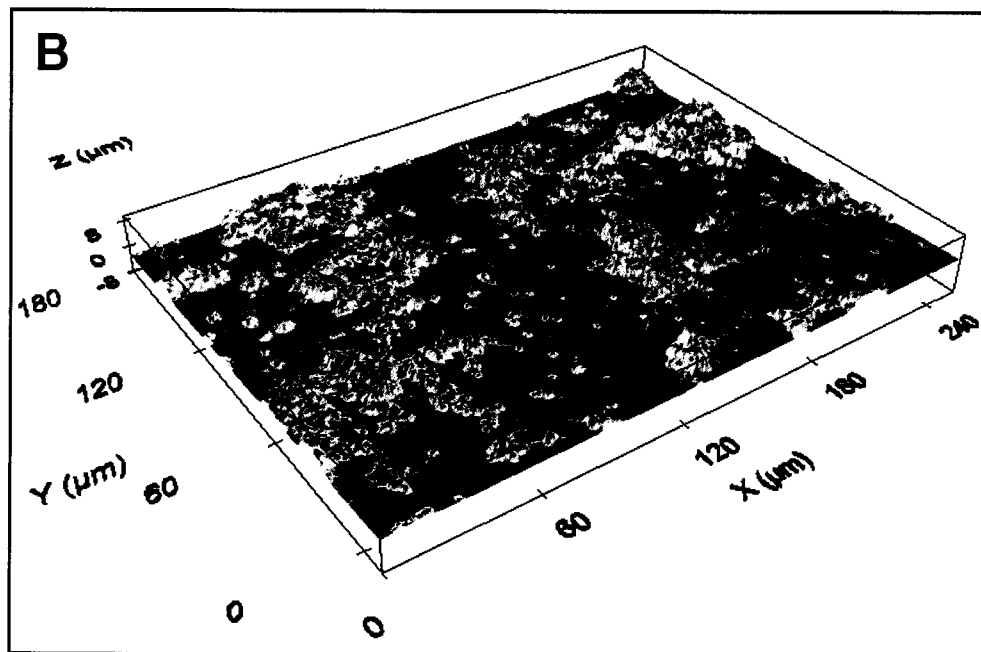


Fig. 8b

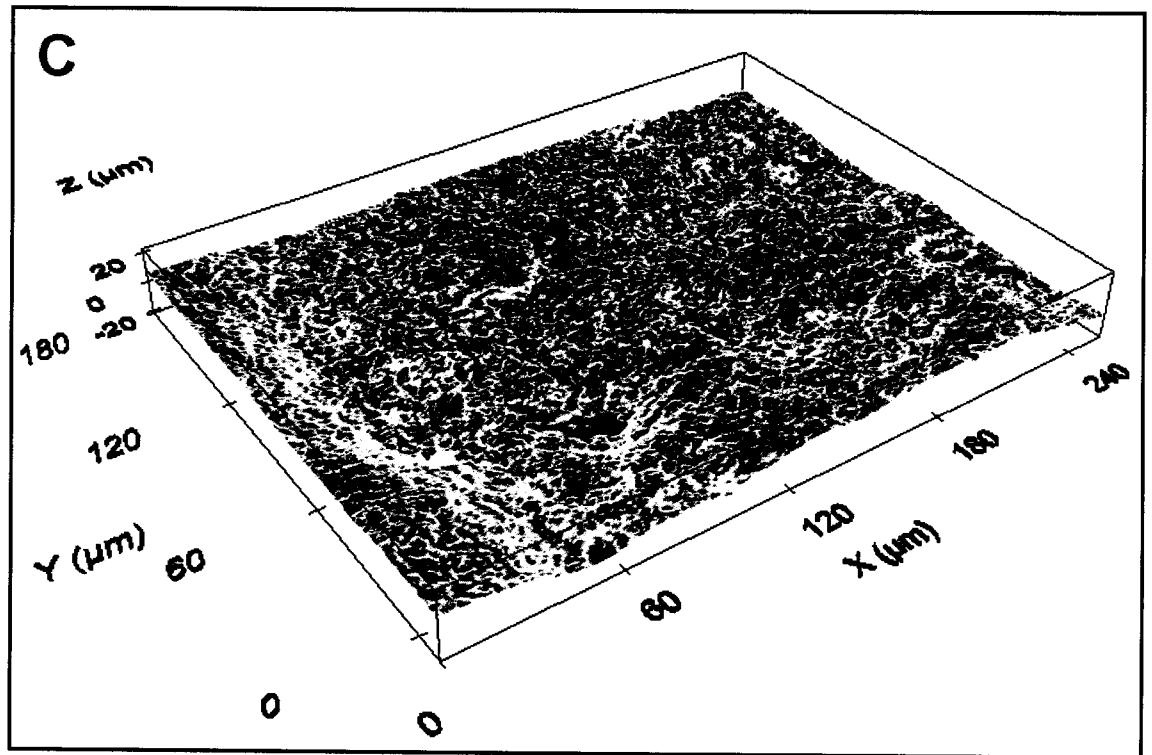


Fig. 8c

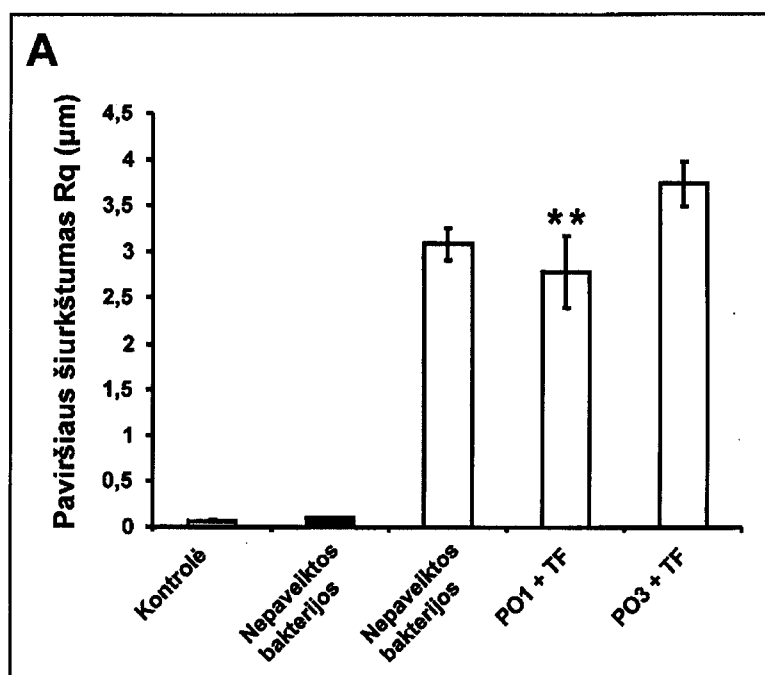


Fig. 9a

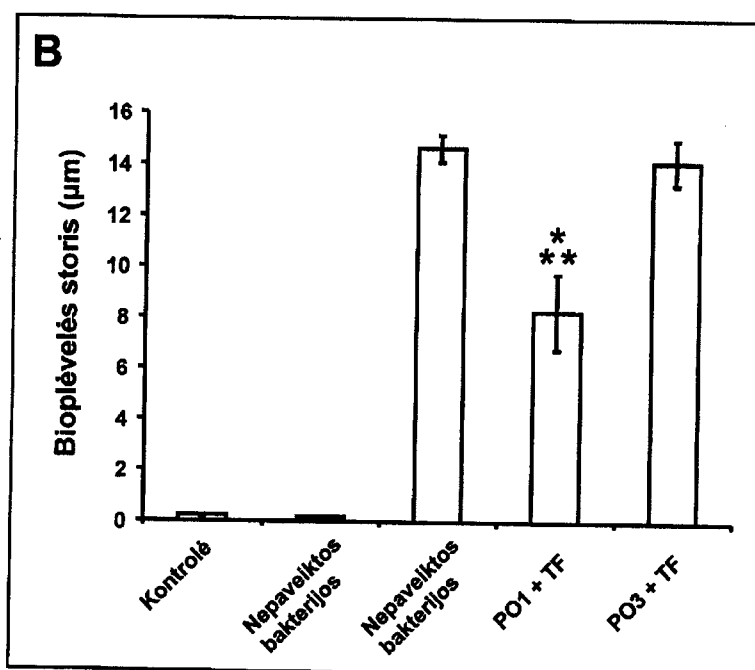


Fig. 9b