



## (12) Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift

(97) EP 1 444 346 B2

(21) Deutsches Aktenzeichen: 602 25 586.4

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/EP02/09670

(96) Europäisches Aktenzeichen: 02 77 6950.4

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2003/020931

(86) PCT-Anmeldetag: 29.08.2002

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: 13.03.2003

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 11.08.2004

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: 12.03.2008

(97) Veröffentlichungstag  
des geänderten Patents beim EPA: 24.06.2015

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 03.12.2015

(51) Int Cl.:

**C12N 15/11 (2006.01)**

**C12N 5/10 (2006.01)**

**C12N 7/00 (2006.01)**

**A61K 31/713 (2006.01)**

### Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert

(30) Unionspriorität:

317229 P 01.09.2001 US  
385733 P 04.06.2002 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,  
GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR

(73) Patentinhaber:

Galapagos N.V., Mechelen, BE

(72) Erfinder:

ARTS, Gert-Jan, NL-2403 ES Alphen Ad Rijn, NL;  
LANGEMEIJER, Ellen, Vera, NL-2628 TG Delft, NL;  
PIEST, Ivo, NL-3645 VS Vinkeveen, NL; VAN ES,  
Helmut, Hendrikus, NL-2011 ZZ Haarlem, NL;  
MICHELS, Godefridus, Augustinus, NL-2352 EP  
Leiderdorp, NL

(74) Vertreter:

derzeit kein Vertreter bestellt

(54) Bezeichnung: SIRNA KNOCKOUT PRÜFVERFAHREN UND KONSTRUKTE

**Beschreibung****Gebiet der Erfindung**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft Polynukleotidvektor-konstrukte, Verfahren zu ihrer Herstellung und Zubereitungen für ihre Verwendung bei Verfahren, die die Menge der RNA- und/oder Proteinproduktion in Zellen aufgrund der intrazellulären Expression von "small interfering" Polyribonukleinsäuremolekülen senken.

**[0002]** Die genomische Forschung über die letzten Jahr-zehnte hat zu einer fast vollständigen Karte aller menschlichen Gene geführt und neue Richtungen in der medizinischen Forschung eröffnet. In dieser Postgenomik-Ära sind neue wissenschaftliche Disziplinen entstanden, wie die Proteomik und die funktionelle Genomik. Traditionelle pharmazeutische Firmen mit erheblichen F&E-Etats sind daran interessiert, Zugang zu neuen Plattformtechnologien der funktionellen Geno-mik und Proteomik zu erlangen. Was benötigt wird, sind bessere Screening-Technologien zur Identifikation neuer therapeutischer Ziele sowie bessere Zielvalidierungs-ansätze. Mit Ansätzen in allen Disziplinen der modernen Medizin hat die funktionelle Genomik das Potenzial, der Behandlung aller menschlicher Krankheiten ein signifikant neues Gesicht zu verleihen.

**[0003]** Pharmazeutische Firmen sind an zuverlässigen auf Knock-down basierenden Technologien interessiert, da ihre Arzneistoff-Screens mit kleinen Molekülen auf der Hemmung der Aktivität und der Wirkung eines exprimierten Proteins basieren. Folglich stellt das Blockieren der Expression oder Funktion eines potenziellen Ziels, entweder mittels Screening in einem zellulären Assay oder durch Einzelgenvalidierung, einen wichtigen Datensatz im Hinblick auf die Arzneistoff-fähigkeit des Ziels zu einem frühen Zeitpunkt im Arzneistoff-Entwicklungsverfahren bereit. Dieser Daten-satz bildet eine starke Grundlage für den Beginn eines Arzneistoff-Entwicklungprogramms auf Basis einer Ver-bindung, eines Antikörpers oder biologisch mit dem Ziel, eine wirksame Therapie zu entwickeln.

**[0004]** Die Untersuchung der Genfunktion bei Vertebraten wird durch die Komplexität des Genoms, die vielzellige Natur und das Fehlen an umfangreichen genetischen Werkzeugen behindert. Die Techniken zur Erzeugung stabiler transgener Zelllinien oder transgener Mäuse sind leistungsfähige, aber sehr zeit- und arbeitsintensive Ansätze, die nicht leicht mit hohem Durchsatz durchgeführt werden können.

**[0005]** Verschiedene Knock-down- oder Knock-out-Ansätze werden dazu verwendet, die Genfunktion in Säugetierzellen zu untersuchen (z. B. Antisense, Antikörper, Ribozyme, Aptamere, Zinkfingerproteine, chimäre RNA-DNA-Oligos usw.). Diese Technologien sind jedoch weder robust und leistungsfähig, noch können sie generisch auf alle Gene und alle Zelltypen angewendet werden.

**[0006]** RNA-Interferenz (RNAi) ist der posttranskriptionale Vorgang des Gen-Silencing, das durch doppelsträngige RNA (dsRNA) vermittelt wird, die in der Sequenz homolog zu der stillgelegten RNA ist, und wird bei Tieren und Pflanzen beobachtet. Die dsRNA wird zu Molekülen von 21–23 Nukleotiden (nts) prozessiert, die man als "small interfering" RNAs (siRNAs) bezeichnet und die den sequenzspezifischen Abbau der Ziel-RNA leiten (Scharp, 2001).

**[0007]** Auf die anfängliche Entdeckung der RNA-Interferenz in *C. elegans* (Fire et al., 1998) folgten zahlreiche Beispiele für Organismen, in denen das Einbringen von dsRNA den sequenzspezifischen Silencing-Effekt verursachen kann.

**[0008]** Die Entwicklung eines In-vitro-Systems unter Verwendung von Extrakten von Embryonen oder kultivierten Zellen von *Drosophila* hat den Einblick in den Mechanismus hinter dem sequenzspezifischen Silencing-Effekt beschleunigt (Elbashir et al., 2001b; Hammond et al., 2000; Zamore et al., 2000). Die dsRNA, die in diese Extrakte eingebracht wird, werden zu Fragmenten von 21–23 nts prozessiert. Die Extrakte sind jetzt derart "programmiert", dass sie Ziel-RNAs mit Sequenzen abbauen, die die dsRNA-Fragmente überlappen. Die Ziel-RNA wird in beiden Strängen, Sense und Antisense, in Abständen von 21–23 nts gespalten. Diese kleineren Spezies werden als "short interfering" RNAs (siRNAs) bezeichnet. Obgleich längere dsRNA-Spezies stärker als kürzere RNAs zu sein scheinen, wird der spezifische Silencing-Effekt durch Transfektion der siRNA von 21–23 nts direkt in die Zellen erhalten (Elbashir et al., 2001b).

**[0009]** Reife siRNA-Duplicates werden unter Bildung eines 21–23 nts langen RNA-Duplex mit 3'-Überhängen von 2 oder 3 nts präzise prozessiert; sie enthalten keine modifizierten Nukleotide und haben ein 5'-Phosphat (für seine Funktion nicht wesentlich) und eine 3'-Hydroxylgruppe. Ein siRNA-Duplex mit Überhängen von 2 oder 3 nts ist aktiver als Duplicates mit stumpfen Enden oder Überhängen von 4 nts. Extensionen am 3'-Terminus

von 17 nts oder größer entweder am Sense-Strang oder am Antisense-Strang führen zu einem Verlust der Aktivität zur Spaltung des komplementären Ziel-Strangs. Dies deutet darauf hin, dass der korrekte 3'-Terminus des Antisense-Strangs für die Aufrechterhaltung der Aktivität des siRNA-Duplex zum Abbau der Sense-Ziel-RNA wesentlich ist (Elbashir et al., 2001b).

**[0010]** Genetische Studien haben RNAi mit dem Transposonsilencing bei *C. elegans* in Verbindung gebracht. Die Co-Suppression durch posttranskriptionales Gen-Silencing (PGTS) in Pflanzen scheint durch einen verwandten Mechanismus zu funktionieren, der durch kleine "Führungs"- (guide-)RNAs von etwa 22 nts vermittelt wird.

**[0011]** Aufgrund genetischer und biochemischer Studien wurden mehrere Proteinfaktoren mit RNAi in Verbindung gebracht (Scharp, 2001). Die RDE-1-Genfamilie besteht aus einer großen Zahl an Mitgliedern (24 bei *C. elegans*), die gut konserviert ist. Mitglieder der RDE-1-Familie enthalten konservierte PIWI- und PAZ-Domänen mit unbekannten Funktionen. RDE-1-Homologe findet man in verschiedenen Spezies, und von Mitgliedern der RDE-1-Familie hat man impliziert, dass sie bei verschiedenen Prozessen wirken; RNAi, PTGS bei Pflanzen, Embryogenese bei *Drosophila*, Expression und Regulation kleiner temporärer RNAs.

**[0012]** Das Dicer-Protein ist ein Mitglied der RNase III-Familie, die in mehreren Spezies konserviert ist. Dicer enthält eine Helikase-Domäne, 1–2 dsRNA-bindende Domänen, 2 Domänen des RNase III-Typs und eine PAZ-Domäne. Dicer ist für die Erzeugung der funktionellen, 21 Nukleotide langen siRNAs aus längeren dsRNA-Komplexen erforderlich (Bernstein et al., 2001).

**[0013]** Bei *C. elegans* spielen let-7 und lin-4, kleine temporäre RNAs (stRNAs) von 21–22 nts, eine regulatorische Rolle während der Entwicklung. Diese erfüllen sie durch Erkennung von Sequenzen in den 3'-untranslatierten Regionen ihrer Zieltranskripte, was zu einer starken Repression der Expression führt (Reinhart et al., 2000). Die stRNAs werden aus längeren Vorläufer-transkripten prozessiert. Reife let-7-RNA wurde auch in Menschen nachgewiesen, und Vorläufer mit konservierten Sekundärstrukturen sind vorausgesagt worden (Pasquinelli et al., 2000).

**[0014]** Für die korrekte Prozessierung der stRNA let-7 wird Dicer benötigt (Grishok et al., 2001; Hutvagner et al., 2001). Folglich hat Dicer eine doppelte Funktion: Prozessierung von dsRNA in siRNA sowie Prozessierung von let-7-Vorläufern in reife let-7-stRNA. Die Produkte, die stRNA und die siRNA, haben einige Eigenschaften, die unterschiedlich sind, und einige Eigenschaften, die sie gemeinsam haben.

**[0015]** Die Unterschiede zwischen stRNA und siRNA sind u. a. (1) sowohl der Sense- als auch der Antisense-Strang der reifen siRNAs liegen in der Zelle vor; nur der Antisense-Strang der reifen stRNAs ist nachweisbar, (2) die duplizierte Region von stRNAs enthält einige G-U-Basenpaare und Fehlpaarungen im Gegensatz zu siRNAs, die zu 100% komplementäre Duplices haben, und (3) die Wirkungsweise für siRNA ist der RNA-Abbau, während von let-7-stRNA angenommen wird, dass sie zu einem Translationsblock führt.

**[0016]** stRNAs und siRNAs haben die Eigenschaften gemeinsam, dass (1) beide RNA-Spezies an der Repression der Genexpression beteiligt sind, (2) beide, reife siRNAs und reife stRNAs, 21–22 nts lang sind, (3) beide aus duplizierten längeren Vorläufer-RNAs erzeugt werden und (4) die Prozessierung in die aktiven Formen sowohl von stRNA als auch von siRNA durch das gleiche Enzym, Dicer, vermittelt wird.

#### Beschriebene Entwicklungen

**[0017]** RNAi stellt für Forscher ein zusätzliches genetisches Werkzeug zur Untersuchung von Genfunktionen bereit. Bei *C. elegans* hat man die Chromosomen I und III jetzt systematisch auf phänotypische Wirkungen hin analysiert. Der RNAi-Ansatz schafft zusätzliche Möglichkeiten bei Entwicklungsstudien. Klassische Knock-outs mit letalen Wirkungen während der Entwicklung könnten niemals in späteren Entwicklungsstadien analysiert werden. Mit RNAi kann das Einsetzen der Wirkung variiert werden, und Rollen in späteren Stadien der Entwicklung können untersucht werden.

**[0018]** Die Verwendung von RNAi in Säugerzellen ist problematisch, weil das Einbringen von langer (> 30 Basenpaare) dsRNA zu zwei hauptsächlichen intrazellulären Reaktionen führt: Aktivierung der von doppelsträngiger RNA abhängigen Proteinkinase PKR, was zu einem allgemeinen Block der Proteinsynthese führt, und Aktivierung von RNase L, die alle mRNAs angreift, über 2'-5'-Oligoadenylylsynthetase.

**[0019]** Bei Säugern führt das Auftreten von dsRNA in der Zelle, die oft während Virusinfektionen erzeugt wird, zu starken zellulären Reaktionen. Eine hauptsächliche Aktivität wird durch die Interferon-induzierbare dsRNA-

abhängige Proteinkinase (PKR) vermittelt, die an dsRNA bindet. Dies führt zur Autophosphorylierung und Aktivierung von PKR. Die aktivierte PKR phosphoryliert die alpha-Untereinheit des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 2 (eIF2-alpha) an der Position Serin-51. An GTP gebundener eIF2 liefert die Initiator-tRNA Methionin an die kleine ribosomale Untereinheit, und eIF2 wird in der GDP-gebundenen Form freigesetzt. Um eine kontinuierliche, fortlaufende Translation zu erhalten, muss eIF2 von dem GDP- in den GTP-gebundenen Zustand zurück überführt werden. Die Phosphorylierung von eIF2-alpha durch PKR verhindert diese Rückführung und blockiert dadurch die Einleitung der Translation. Infolgedessen führt dsRNA zu einem allgemeinen Translationsblock in Säugerzellen.

**[0020]** Von dsRNA ist auch bekannt, dass sie die Inter-feron-induzierte 2'-5'-Oligoadenylylsynthetase aktiviert. Nach der Aktivierung polymerisiert dieses Enzym ATP zu 2'-5'-verbundenen Nukleotidoligomeren (auch durch 2-5A angegeben). Die 2-5A-Oligomere aktivieren die Ribonuklease RNase L, was zum RNA-Abbau führt.

**[0021]** Weiterhin werden in Säugern einige mRNAs durch die nukleäre dsRNA-spezifische Adenosindesaminase (ADAR) editiert. Obwohl ADAR auf bestimmte Substrate, wie mRNAs für Glutamatatrezeptoren (gluR) im Gehirn, selektiv einwirkt, zeigt ihre Aktivität sehr wenig Sequenzspezifität und kann auf jedes dsRNA-Molekül oberhalb einer bestimmten minimalen Länge einwirken. Diese generische modifizierende Aktivität führt zur Desaminierung von Adenosin- zu Inosinresten, was zur Aufwindung der dsRNA-Helix führt.

**[0022]** In der Tat versagten dsRNA-Transfektionsansätze, die bei kultivierten Drosophila-Zellen funktionierten, bei verschiedenen aus Säugern stammenden kultivierten Zellen. Mikroinjektionsexperimente in Mäuseembryonen und -oozyten zeigten jedoch, dass unter diesen Bedingungen RNAi-Wirkungen beobachtet werden konnten. Dies legt nahe, dass RNAi in Säger-Systemen möglich ist.

**[0023]** Vor kurzem hat man gezeigt, dass RNAi bei einem Paneel von Säger-Zelllinien verwendet werden kann (Elbashir et al., 2001a). Die Ansatz basiert auf der direkten Transfektion der 21–23 nts langen siRNA-Duplicates in die Zellen. Dies umgeht die oben genannten intrazellulären Reaktionen, und führt zu sequenzspezifischem Silencing endogener und heterologer Gene.

**[0024]** Ein wichtiger Engpass beim siRNA-Transfektionsansatz ist seine begrenzte Anwendbarkeit auf die Ansteuerung von unterschiedlichen Zelltypen, insbesondere Primärzellen. Primärzellen kommen der In-vivo-Situation am nächsten und haben häufig die höchste physiologische Relevanz. Transfektionstechnologien für nicht-virale DNA oder siRNA unterliegen schwerwiegenden Beschränkungen im Hinblick auf diese Zellen und sind nicht effizient und zuverlässig. Eine praktische Verwendung dieser Ansätze erfordert eine signifikante Optimierung der Bedingungen, und ihnen fehlt es in der Regel an der Robustheit, die für Anwendungen im großen Maßstab notwendig ist. Die verwendeten Gentransferreagenzen sind oft toxisch und liefern niedrige Spiegel an lebensfähigen transduzierten Zellen. Im Wesentlichen gestatten sie keine generische siRNA-Anwendung auf eine breite Vielzahl an Zelltypen, einschließlich primärer Zelltypen, wie T-Zellen, B-Zellen, Mastzellen, Endothelzellen, Synoviozyten und Lungenepithelzellen. Ferner ergibt die Transfektion der siRNA eine kurze Knock-down-Wirkung. Für eine länger andauernde Knock-down-Wirkung in Zellen sind mehrere zusätzliche Transfektionen notwendig.

**[0025]** Deshalb erfordert eine breitere Anwendung der siRNA-Technologie weitere Forschung und Entwicklung, um diese Beschränkungen zu überwinden. Eine Implementierung des Gen-Knock-down im Genomik-Maßstab in Sägerzellen wird durch das Fehlen einer zuverlässigen, robusten und effizienten Gentransfertechnologie verhindert (siehe oben), die in einem breiten Spektrum von Zelllinien und Primärzelltypen anwendbar ist.

**[0026]** Hutvagner et al. ((2001) Science 293: 834–838) offenbart eine Kandidaten-RNA für den let-7-Vorläufer, die eine Haarnadelstruktur bildet, sich jedoch von der vorliegenden Erfindung dadurch unterscheidet, dass sie erste und zweite (RNA-)Sequenzen aufweist, die 28–29 nt lang sind und Fehlpaarungen enthalten, wodurch Auswölbungen entstehen.

**[0027]** Die vorliegende Erfindung überwindet die durch den Stand der Technik erkannten Beschränkungen und findet Anwendungen auf zahlreichen Gebieten, wie Genomik-Untersuchungen, Virenproduktion und Proteinproduktion.

**[0028]** Die Produktion rekombinanter Viren wird manchmal durch die Expression exogener Sequenzen kompliziert, die letale oder toxische Proteine codieren, die die Virenproduktion stören. Der Stand der Technik offenbart Systeme zur temporären Abschaltung der Proteinproduktion, einschließlich des Tet-Repressor-Systems

und des Ecdyson-Systems. Diese Systeme sind jedoch zeitraubend und beinhalten schwierige Klonierschritte zum Einbringen der Konstrukte in die Vektoren. Ein weiterer Nachteil der Repressorsysteme des Standards der Technik ist, dass man zur Expression des exogenen Gens oft eine Verbindung hinzugeben muss, die das Suppressorssystem selbst supprimiert, um die Genexpression einzuschalten. Die vorliegende Erfindung kann auf jedes Virusverpackungs- und Proteinproduktionssystem angewendet werden, um die Produktion durch selektiven Knock-down letaler oder rekombinanter Proteine während der Virus- bzw. der produzierenden Zellproduktionsphasen zu verbessern.

#### Zusammenfassung der Erfindung

**[0029]** Die vorliegende Erfindung betrifft einen Vektor, der sich für die Transfektion von Wirtszellen eignet, umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das sich für den Abbau eines spezifischen mRNA-Moleküls in einer Wirtszelle eignet, umfassend eine erste Leit-Polynukleotidsequenz, die aus 19 bis 22 Nukleotiden besteht und zu 19 bis 22 Nukleotiden der spezifischen mRNA-Sequenz in der Wirtszelle komplementär ist, wobei die erste Sequenz mit einer zweiten Sequenz, die zur Bildung einer Stamm-Schleife-Struktur fähig ist, wenn es sich bei der zweiten Sequenz um eine RNA-Sequenz handelt, kovalent gebunden ist, wobei die erste Sequenz im Wesentlichen aus einem Einzelstrang-DNA-Äquivalent einer RNA-Sequenz besteht und wobei das Polynukleotid weiterhin eine dritte Sequenz, die aus 19 bis 22 Nukleotiden besteht, die zu der ersten Sequenz komplementär ist und mit dem distalen Ende der zweiten Sequenz kovalent gebunden ist, umfasst und wobei alle Nukleotide in der ersten und dritten Sequenz miteinander eine Basenpaarung eingehen wobei die Nukleotide der ersten und dritten Sequenz alle einer in der spezifischen mRNA gefundenen Sequenz entsprechen und wobei ein pol-III-Promotor stromaufwärts von der ersten Sequenz liegt.

**[0030]** Eine andere Ausführungsform der Erfindung betrifft solche Vektoren die ein selbstdkomplementierendes Einzelstrangpolynukleotid enthalten, wobei die zweite Nukleotidsequenz eine Stamm-Schleife-bildende Region mit einer Sequenz umfasst, die von natürlich vorkommenden RNA-Sequenzen abgeleitet ist, die man in RNA-Molekülen findet, und kein spezifisches RNA-Molekül in einer Wirtszelle funktionell adressiert. Am stärksten bevorzugt sind die zweiten Sequenzen von anderen RNA-Molekülen als mRNA abgeleitet.

**[0031]** Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein In vitro-Verfahren zur Reduktion der Menge von mindestens einem in einer Wirtszelle befindlichen RNA-Molekül mit einer einzigartigen Sequenz, bei dem man die Zelle mit einem erfindungsgemäßen Vektor transfiziert, wobei das Polynukleotid eine erste Sequenz umfasst, die zu der RNA-Sequenz komplementär ist.

**[0032]** Ein anderer Aspekt der vorliegenden Offenbarung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines selbstdkomplementierenden einzelsträngigen Polynukleotids, das durch eine Polynukleotidsequenz, die eine Stamm-Schleife-Struktur bildet, kovalent gebundene komplementäre Sequenzen beinhaltet, bei dem man ein Einzelstrangpolynukleotid, das im Wesentlichen aus einer ersten Polynukleotidsequenz besteht, die mit einer zweiten Polynukleotidsequenz kovalent verbunden ist, die zwei Nukleotidsequenzen enthält, die zu einer komplementären Basenpaarung fähig sind, wodurch eine Stamm-Schleife-Struktur ausgebildet wird, die ein 3'-OH-terminales Ende aufweist, unter Bedingungen behandelt, unter denen die erste Sequenz als Matrize beginnend am 3'-OH-terminalen Ende für die Synthese einer dazu komplementären Sequenz dient.

**[0033]** Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Vektors, der die Sequenz eines Polynukleotids beinhaltet, wobei es sich bei dem selbstdkomplementierenden Polynukleotid um eine DNA-Sequenz handelt, und weiterhin eine vierte Sequenz umfasst, die an das freie Ende der ersten Sequenz gebunden ist, und wobei das Polynukleotid denaturiert wird, in ein doppelsträngiges Polynukleotid umgewandelt wird und in einen Vektor, der zur Transfektion einer Wirtszelle und zur Transkription des Polynukleotids fähig ist, ligiert wird.

**[0034]** Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Funktion einer natürlich vorkommenden Polynukleotidsequenz, bei dem man eine Wirtszelle mit einem erfindungsgemäßen Vektor transfiziert, wobei der Vektor eine Polynukleotidsequenz, die zu dem natürlich vorkommenden Polynukleotid komplementär ist, beinhaltet, und man eine Veränderung des Zellphänotyps nachweist.

**[0035]** Weitere Aspekte der Erfindung betreffen Bibliotheken von erfindungsgemäßen Vektoren. Weitere Aspekte der Offenbarung betreffen Verfahren zur Verringerung der Mengen an RNA oder an von RNA translatiertem Protein in einem Individuum, wobei man einen erfindungsgemäßen Vektor verabreicht und Zellen in dem Individuum transfiziert in einer Menge, die ausreicht, die Mengen der RNA in den Zellen zu senken.

**[0036]** Die vorliegende Erfindung stellt einen temporären Knock-down von Proteinen, wie letalen Proteinen, während der Produktion von Viren oder rekombinanten Proteinen bereit, wodurch es (1) die Replikation und Verpackung von Viren, welche für letale Proteine codierende Sequenzen enthalten, oder (2) die optimale Produktion von rekombinantem Protein ermöglicht. Die hier nachstehend beschriebenen Knock-down-Konstrukte werden in jede ausgewählte Verpackungszelle transfi-ziert, und diese transfizierten Zellen werden direkt verwendet. Das Knock-down-System verwendet Viruskonstrukte, die direkt zur Infektion von Zellen verwendet werden, und keine weitere Verbindung wird von dem Verfahren zur Induktion der Virus- oder Proteinproduktion benötigt.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

**[0037]** **Fig. 1** zeigt die Repression der Luciferase-Aktivität von pGL3-Fusionskonstrukten, die let-7-Zielsequenzen enthalten, durch let-7-siRNAs in PER.C6/E2A Zellen. PER.C6/E2A Zellen werden transient mit den pGL3-Fusionskonstrukten, die let-7-Zielsequenzen in jeder Orientierung enthalten (pGL3-tLet-7F, pGL3-tLet-7R), oder mit pGL3-control ohne let-7-Sequenzen in Kombination mit jedem der siRNA-Duplexe siRNA GL3.1, siRNA let-7.1, siRNA GL2.1 oder ohne siRNA transfiziert. Die Co-Transfektion von siRNA let-7.1 reprimiert spezifisch die Luciferase-Aktivität der Reporter pGL3-tLet7F und pGL3-tLet7R, aber nicht von pGL3-control. Eine Co-Transfektion der positiven Kontrolle siRNA GL3.1 zeigt eine Repression aller Reporterkonstrukte (pGL3-tLet-7F, pGL3-tLet-7R, pGL3-control).

**[0038]** **Fig. 2** ist eine Tabelle, die die Ergebnisse einer DNA-Datenbanksuche unter Verwendung der C.-elegans-let-7-Führungssequenz als Sonde darstellt. Drei vollkommene Übereinstimmungen wurde auf dem Hymangenom in den Chromosomen 9, 11, 19, 21, 22 und X gefunden.

**[0039]** **Fig. 3** beschreibt das Plasmid pIPspAdapt Let-7 gene D, das durch Insertion des Xba I/Hind III-Fragments von Let-7 Gen D in die Avr II/Hind III-Stellen von pIPspAdapt-deltaPolyA hergestellt wird.

**[0040]** **Fig. 4** zeigt die Reprogrammierung von Let-7-RNA auf eine andere Zielsequenz. Plasmidkonstrukte, die Let7gene22A-F enthalten, werden als Matrizen für zwei getrennte PCR-Reaktionen verwendet. Der Primer Let-7.N19-R4 wird in Kombination mit einem Vorwärts-Primer, zum Beispiel Let7gene22 F1-3, verwendet. Der Primer Let-7.N19-F4 wird in Kombination mit einem Rückwärts-Primer, zum Beispiel Let7gene22R1-2, verwendet. Die Produkte dieser zwei getrennten PCR-Reaktionen werden als Matrize für eine abschließende PCR-Reaktion verwendet. Nur die Außen-Primer Let7gene22 F1-3 und Let7gene22 R1-2 werden in dieser abschließenden PCR-Reaktion verwendet. Die aus dieser abschließenden Reaktion erhaltenen PCR-Produkte werden in pIPspAdapt6-deltaPolyA unter Verwendung der gleichen Strategie kloniert, wie für die Let7gene 22A-F-Fragmente beschrie-ben.

**[0041]** **Fig. 5** zeigt das Verfahren zur Erzeugung einer Bibliothek aus zufallsgemäß produzierten/isolierten sRNAs.

**[0042]** **Fig. 6** zeigt das Verfahren zur Herstellung von Konstrukten, die für einzelne chimäre sRNA codieren, die mit einer unbekannten Funktion einhergehende RNA enthalten können, und das automatisierbar und zur Konstruktion einer Bibliothek von chimären sRNA geeignet ist.

**[0043]** **Fig. 7** ist eine schematische Darstellung der Konstruktion und Verwendung einer adenoviralen chimären sRNA-Bibliothek.

**[0044]** **Fig. 8** ist eine schematische Darstellung der im Beispiel 2 verwendeten auf Luciferase basierenden Reporterkonstrukte und siRNA-Konstrukte,

**[0045]** **Fig. 9** zeigt die Hinunterregulation der Reporter, die die Zielsequenzen enthalten, die den Sequenzen der co-transfizierten RNAs entsprechen.

**[0046]** **Fig. 10** ist ein Vergleich der Wildtyp-let-7-Schleife, die 30 Nukleotide lang ist, und einer kürzeren, 12 Nukleotide langen Schleife auf Basis der Wildtyp-let-7-Schleife. Die fettgedruckten Nukleotide zeigen die Nukleotide, die aus der Wildtyp-let-7-Schleife deletiert wurden, um die 12 Nukleotide lange Schleife 12 (L12) zu erzeugen.

**[0047]** **Fig. 11** zeigt weitere Schleifensequenzen, die hinsichtlich ihrer Knock-down-Effizienz untersucht wurden. Diese Schleifen (L1, L2, L3, L4, L5, L6, L11 und L12) variieren in der Größe von 11 bis 16 Nukleotiden.

**[0048]** **Fig.** 12 zeigt die Knock-down-Effizienzen von Konstrukten, die in der Länge von 11 bis 30 Nukleotiden variierende Schleifensequenzen umfassen. Diese Konstrukte werden im Kontext eines GL2-Ziels/Führers synthetisiert. Die Knock-down-Effizienzen wurden in einem transienten Transfektionsexperiment, wie im Beispiel 3 beschrieben, gemessen.

**[0049]** **Fig.** 13A ist eine schematische Darstellung von genomischen Human-Let-7-Konstrukten.

**[0050]** **Fig.** 13B ist eine schematische Darstellung von Expressionsplasmiden auf Basis von Let-7 zum Ersetzen der RNAs.

**[0051]** **Fig.** 14 zeigt die transiente Transfektion der auf let-7 basierenden Expressionsplasmide an PER.C6/E2A-Zellen und einen Vergleich der Knock-down-Effizienz von Expressionsplasmiden auf Basis von let-7 mit Schleifensequenzen unterschiedlicher Länge.

**[0052]** **Fig.** 15 ist eine schematische Darstellung der reprogrammierten chimären let-7-Klone und der Reporterkonstrukte auf Basis von Luciferase pGL3-control oder pGL3-tLet-7F oder pGL3-tLet-7R oder pGL2.

**[0053]** **Fig.** 16 zeigt die Spiegel an Luciferase-Reporter für die reprogrammierten chimären let-7-Klone.

**[0054]** **Fig.** 17 zeigt Northern-Blots, die die Expression der von dem Konstrukt pIPspAdapt-Let-7-gGL3 abgeleiteten RNA-Spezies in PER.C6.E2A-Zellen zeigen.

**[0055]** **Fig.** 18 zeigt die Expressionsplasmide, die andere Sequenzen als let-7 oder GL3 enthalten und ebenfalls chimäre RNA-Moleküle mit der korrekten Länge und der erwarteten Sequenz exprimieren.

**[0056]** **Fig.** 19 zeigt, wie der Let-7-Promotor durch Elemente des menschlichen U6-snRNA-Promotors ersetzt wird. Damit die Promotoraktivität effizient ist, ist das erste Nukleotid des Transkripts ein G und das Transkriptionsterminationssignal ist eine Abfolge von 5 oder mehr T. Die exprimierte RNA enthält eine Führungssequenz von 19–21 nts (die gegen ein Ziel gerichtet ist) und eine durch eine Schleifensequenz verbundene Sequenz, die mit der Führungssequenz eine Basenpaarung eingehen kann.

**[0057]** **Fig.** 20 zeigt Northern-Blots von Proben von Zellen, die mit den adenoviralen Expressionsvektoren auf Basis des U6-Promotors transfiziert sind. Die Blots zeigen die Expression der RNA-Spezies und die Prozessierung in eine Spezies mit einer Größe, die mit derjenigen der endogenen Let-7-RNA vergleichbar ist. Spur 1 enthält nicht-infizierte Zellen, Spur 2 enthält die mit U6 (+1) L12 gLet7 infizierten Zellen, Spur 3 enthält mit U6 (+1) L13 gLet7 infizierte Zellen.

**[0058]** **Fig.** 21 ist ein Vergleich der Knock-down-Effizienz der Reporterplasmide mit den Let-7-Zielsequenzen mit verschiedenen Promotoren und verschiedenen Schleifensequenzen. Die Schleife L12 (SEQ ID NR: 30) ist in den **Fig.** 10 und **Fig.** 11 dargestellt. Die Schleife L13 (SEQ ID NR: 66) ist 14 Nukleotide lang.

**[0059]** **Fig.** 22 ist ein Transfektionsexperiment mit der adenoviralen Superinfektion von Ad-EGFP. Die Infektion mit dem Adenovirus hatte keine Wirkung auf die Knock-down-Aktivität, die durch die transient transfizierten Plasmide erhalten wurde, unter den in diesem Beispiel verwendeten Bedingungen.

**[0060]** **Fig.** 23 zeigt Northern-Blots von Proben von Zellen, die mit dem adenoviralen Expressionskonstrukt auf Basis des Let-7-Promotors infiziert werden, die die Expression der RNA-Spezies und die Prozessierung in eine Spezies mit einer Größe zeigen, die mit derjenigen synthetischer siRNAs vergleichbar ist.

**[0061]** **Fig.** 24 zeigt einen Vergleich der Knock-down-Effizienz von zwei Expressionskonstrukten auf Basis des viralen U6-Promoters mit verschiedenen Schleifensequenzen und den erfolgreichen Knock-down durch die viralen Expressionskonstrukte.

**[0062]** **Fig.** 25A ist eine schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Konstruktion der Bibliothek, die die Verwendung der Sapl-Stellen und eines E.-coli-Todesgens zeigt.

**[0063]** **Fig.** 25B ist eine schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für die Konstruktion der Bibliothek. Entwicklung des adenoviralen Vektors für Inserts von 56 nts.

**[0064]** **Fig.** 26 ist eine schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für die Konstruktion der Bibliothek. Entwicklung des adenoviralen Vektors für Inserts von 51 nts.

**[0065]** **Fig.** 27 zeigt das erfolgreiche Knock-down endogener GNAS durch adenovirale Knock-down-Konstrukte, wie mittels Echtzeit-PCR gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass der Knock-down-Effekt von der MOI abhängt.

**[0066]** **Fig.** 28 zeigt die Spezifität der adenoviralen Knock-down-Konstrukte, die gegen endogene GNAS gerichtet sind.

**[0067]** **Fig.** 29A–C zeigen das erfolgreiche Knock-down mehrerer endogener mRNA durch adenovirale Knock-down-Konstrukte, wie durch Echtzeit-PCR gemessen. Der Knock-down-Effekt hängt von der MOI und von der Zeit ab.

**[0068]** **Fig.** 30 zeigt den funktionellen Knock-down von GNAS. Adenoviruskonstrukte, die gegen GNAS gerichtete sRNA codieren, ergeben einen spezifischen Knock-down von GNAS auf funktioneller Ebene.

#### Detaillierte Beschreibung

**[0069]** Die folgenden Definitionen werden in der Beschreibung und in den Beispielen verwendet, um zum Verständnis des Umfangs der vorliegenden Erfindung zu beitragen.

**[0070]** "Chimäre RNA", wie hier verwendet, bedeutet ein RNA-Molekül, das aus mindestens zwei Polynukleotid-sequenzen hergestellt ist, die kovalent miteinander verbunden und von mindestens zwei verschiedenen RNA-Molekülen abgeleitet sind, die in der gleichen oder in verschiedenen Spezies vorkommen oder nicht vorkommen können.

**[0071]** "Führungssequenz", wie hierin verwendet, bedeutet eine Polynukleotidsequenz, die zu einer Zielsequenz komplementär ist.

**[0072]** "Letales Protein" bedeutet Proteine, welche die Zelle abtöten können, in der das Protein produziert wird, wenn Sie in einer letalen Menge produziert werden. Letale Proteine beinhalten Proteine, die eine Apoptose verursachen, wie Bax, Bcl-Xs, Bad und Bak, Fas und Casp1, und Proteine, welche die Virusreplikation hemmen, die Proliferation hemmen oder die Proteinsynthese sowohl auf Ebene der Transkription als auch der Translation hemmen. Weitere spezifische Beispiele für toxische Proteine sind Tiam, Rac, Rho und Ras in voller Länge.

**[0073]** "siRNA", wie hierin verwendet, bedeutet ein doppelsträngiges kurzes interferierendes RNA-Molekül mit einer Länge von nicht mehr als etwa 23 Nukleotiden. Die wissenschaftliche Literatur beschreibt, dass siRNA den sequenzspezifischen Abbau einer Ziel-mRNA vermittelt.

**[0074]** "sRNA", wie hierin verwendet, bedeutet ein einzel- oder doppelsträngiges RNA-Molekül mit weniger als etwa 25 Nukleotiden. sRNA umfasst sowohl stRNA- als auch siRNA-Moleküle.

**[0075]** "stRNA", wie hier verwendet, bedeutet ein einzelsträngiges kleines temporäres RNA-Molekül, das zu einer 3'-untranslatierten Region in RNA in einer Wirtszelle komplementär ist.

**[0076]** "Stamm-Schleife", wie hierin verwendet, bedeutet ein einzelsträngiges Polynukleotid, das zwei Sequenzen von Basenpaaren, die einander komplementieren und die Bildung einer komplementierenden Duplexstruktur in dem einzelsträngigen Polyribonukleotid ermöglichen, und eine nicht-komplementierende Schleifensequenz enthält, welche die zwei Sequenzen von Basenpaaren verbindet. Die komplementierenden Basenpaare, die den Stammteil der Schleife bilden, bestehen aus mindestens zwei und stärker bevorzugt mindestens drei Basenpaaren in der Länge. Bei bestimmten speziellen Ausführungsformen, bei denen das (die) Stamm-Basenpaar(e) der komplementierenden Sequenz der ersten und der dritten Sequenz entspricht/entsprechen, können eines oder mehrere der komplementierenden Stamm-Basenpaare der zweiten Sequenz doppelt als ein die erste und dritte Sequenz komplementierendes Basenpaar wirken. Unter diesen speziellen Umständen wird der Stammteil der zweiten Sequenz derart betrachtet, dass er nur ein komplementierendes Basenpaar oder keine komplementierenden Basenpaare enthält.

**[0077]** "Zielsequenz", wie hierin verwendet, bedeutet eine Polyribonukleotidsequenz, die in der mRNA in einer Wirtszelle vorliegt.

**[0078]** "Transfizieren", wie hier verwendet, bedeutet jede mögliche Weise des Einführens einer Nukleinsäure in eine Zelle, wie sie einem Fachmann bekannt ist. Es beinhaltet, ist aber nicht beschränkt auf Transduktion z. B. durch Calciumphosphat oder Reagenzien auf Basis von Liposomen, Infektion durch z. B. Virenvektoren, Pagen, Elektroporation, über ein Tränkverfahren, oder Einbringen der Nukleinsäure unter Verwendung eines physikalischen Verfahrens, wie Mikroinjektion oder Beschuss mit DNA-beschichteten Teilchen.

**[0079]** Das in einem erfindungsgemäßen Vektor enthaltene selbstkomplementierende Einzel-strangpolynukleotid umfasst eine erste Führungssequenz und eine zweite Sequenz, die eine Stamm-Schleife-Struktur innerhalb der zweiten Sequenz bilden kann, wenn es sich bei der zweiten Sequenz um RNA handelt, eine dritte Sequenz, welche die erste Führungssequenz komplementiert und mit dem distalen Ende der zweiten Sequenz kovalent verbunden ist, wobei alle Nukleotide in der ersten und dritten Sequenz eine Basenpaarung eingehen können. Die bevorzugten selbstkomplementierenden Polynukleotide umfassen eine zweite Nukleotid-sequenz, die eine Stamm-Schleife-bildende Region umfasst, die von anderen RNA-Molekülen als mRNA abgeleitet ist.

**[0080]** Die vorliegende Erfindung stellt bereit, dass die erste Sequenz eine Führungssequenz ist, die eine Steuerung der stRNA, siRNA, sRNAs oder chimären RNA, die durch das einzelsträngige Polynukleotid des Vektors codiert wird, zu einer mRNA mit einer komplementären Sequenz in dem Wirtszellsystem bewirkt. Die erste und die dritte Polynukleotidsequenz haben eine Länge, die aus 19 bis 22 Nukleotiden und am stärksten bevorzugt aus etwa 19 oder etwa 21 Nukleotiden besteht, die sämtlich einer Sequenz entsprechen, die man in einer spezifischen mRNA findet. Die RNA in der Wirtszelle ist eine mRNA. Die mRNA in der Wirtszelle kann eine bekannte mRNA sein, die für ein Protein bekannter Funktion codiert, oder es kann unbekannt sein, ob sie mit irgendeinem bestimmten Protein oder einer bestimmten zellulären Funktion in Zusammenhang steht.

**[0081]** Bevorzugte Stamm-Schleife-Sequenzen basieren auf Stamm-Schleife-Regionen, von denen dem Fachmann bekannt ist, dass sie in RNA-Molekülen, wie tRNA-, snRNA-, rRNA-, mtRNA- oder strukturellen RNA-Sequenzen, vorkommen. Ein Fachmann kann Stamm-Schleife-RNA-Strukturen leicht unter Verwendung prädiktiver Computermodellierungsprogramme identifizieren, wie Mfold (M. Zuker, D. H. Mathews & D. H. Turner Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide In RNA Biochemistry and Biotechnology, 11–43, J. Barciszewski & B. F. C. Clark, Hrsg., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, (1999)), RNAstructure (Mathews, D. H.; Sabina, J.; Zuker, M. und Turner, D. H., "expanded sequence dependence of thermodynamic Parameters improves Prediction of RNA secondary structures", Journal of Molecular Biology, 1999, 288, 911–940), RNAfold im Vienna RNA-Paket (Ivo Hofacker, Institut für theoretische Chemie, Wahringerstr. 17, A-1090 Wien, Österreich), Tinoco-Plot (Tinoco, I. Jr., Uhlenbeck, O. C. & Levine, M. D. (1971) Nature 230, 363–367), ConStruct, das nach konservierten Sekundärstrukturen sucht (Lück, R., Steger, G. & Riesner, D. (1996), Thermodynamic Prediction of conserved secondary structure: Application to RRE-element of HIV, tRNA-like element of CMV, and mRNA of prion Protein. J. Mol. Biol. 258, 813–826; und Lück, R., Graf, S. & Steger, G. (1999), ConStruct: A tool for thermodynamic controlled prediction of conserved secondary structure. Nucleic Acids Res. 21, 4208–4217.), FOLDALIGN, (J. Gorodkin, L. J. Heyer und G. D. Stormo. Nucleic Acids Research, Bd. 25, Nr. 18 S. 3724–3732, 1997a; und J. Gorodkin, L. J. Heyer und G. D. Stormo. ISMB5; 120–123, 1997b) sowie RNAdraw (Ole Matzura und Anders Wennborg Computer Applications in the Biosciences (CABIOS), Bd. 12 Nr. 3 1996, 247–249).

**[0082]** RNA-Stamm-Schleife-Strukturen findet man auch in Datenbanken, wie der Datenbank für kleine RNA (Karthika Perumal, Jian Gu, Yahua Chen und Ram Reddy, Department of Pharmacology, Baylor College of Medicine, USA), der Datenbank für nicht-codierende RNAs (Erdman VA, Barciszewska MZ, Szymanski M, Hochberg A. the non-coding RNAs as riboregulators (2001) Nucleic Acids Res. 29: 189–193), der Datenbank für rRNA der großen Untereinheit (Wuyts J., De Rijk P., Van de Peer Y., Winkelmans T., De Wachter R. (2001) The European Large Subunit Ribosomal RNA database. Nucleic Acids Res. 29(1): 175–177), der Datenbank für rRNA der kleinen Untereinheit (Wuyts, J., Van de Peer, Y., Winkelmans, T., De Wachter R. (2002) The European database an small subunit ribosomal RNA. Nucleic Acids Res. 30, 183–185), der snoRNA-Datenbank für Spaltthefe (Lowe und Eddy, Science 283: 1168–1171, 1999), für Archaea (Omer, Lowe, Russel, Ebhardt, Eddy und Dennis Science 288: 517–522, 2000), für Arabidopsis thaliana: (Brown, Clark, Leader, Simpson und Lowe RNA 7: 1817–1832, 2001), tRNA-Sequenzen und Sequenzen von tRNA-Genen (Mathias Sprinzl, Konstantin S. Vassilenko, <http://www.uni-bayreuth.de/departments/biochemie/trna/>), der ribosoma-lens-5S-RNA-Datenbank (Szymanski M, Barciszewska MZ, Erdman VA, Barciszewski J, "5S ribosomal RNA database" (2002)

Nucleic Acid Res. 30: 176–178), dem Nucleic Acid Database Project (NDB) an der Rutgers University (<http://ndbserver.rutgers.edu/NDB/>), der RNA Structure Database ([www.RNABase.org](http://www.RNABase.org)).

**[0083]** Unter Verwendung dieser Programme kann man eine RNA-Stamm-Schleife-Sequenz identifizieren, die dann modifiziert werden kann, um mehrfache Schleiferegionen zu entfernen, so dass eine kürzere, leichter zu synthetisierende Stamm-Schleife-Sequenz erhalten wird. Stärker bevorzugte Stamm-Schleife-Sequenzen sind von der let-7-Nukleotidsequenz oder einem Teil davon oder einer künstlich erzeugten Polynukleotidsequenz, die darauf basiert, abgeleitet.

**[0084]** Am stärksten bevorzugte Stamm-Schleife-Regionen bestehen im Wesentlichen aus einer let7-Sequenz, die man in der Wirtszelle findet, oder einem Teil davon, einer anderen natürlich vorkommenden RNA-Sequenz oder einem Teil davon oder einer künstlichen Polynukleotid-Sequenz, die zur Bildung einer Schleifenstruktur fähig ist, wenn es sich bei einem solchen Polynukleotid um RNA handelt. Durch Beseitigen der mehrfachen Schleifensegmente aus diesen Sequenzen, die durch die vorstehend genannten Computerprogramme vorausgesagt werden, werden Stamm-Schleifen-Sequenzen hergestellt, die leichter zu synthetisieren und handzuhaben sind. Am stärksten bevorzugte Stamm-Schleife-Sequenzen sind von den let-7-Nukleotidsequenzen abgeleitet.

**[0085]** Die Schleifenstruktur hat vorzugsweise eine Länge von etwa 4 bis etwa 30 Nukleotiden, eine stärker bevorzugte Länge ist etwa 4 bis etwa 13 Nukleotide, und eine am stärksten bevorzugte Länge ist eine Länge von etwa 6 bis etwa 12 Nukleotiden. Eine spezielle Ausführungsform von Schleifensequenzen umfasst die künstlichen Sequenzen auf Basis bekannter RNA-Schleifensequenzen, die aus etwa 11 bis etwa 16 Nukleotiden bestehen. Beispiele für bevorzugte Schleifensequenzen sind in den **Fig. 10** und **Fig. 11** aufgeführt.

**[0086]** Ein besonders bevorzugtes Polynukleotid der vorliegenden Offenbarung umfasst ferner eine vierte Nukleotidsequenz, die im Wesentlichen aus einem Einzelstrang-DNA-Äquivalent einer RNA-Sequenz besteht, wobei die Funktion der vierten Sequenz darin besteht, ein orientiertes Klonieren in einen Vektor zu gestatten, wobei die vierte Sequenz an ein freies Ende der ersten oder dritten Sequenz kovalent gebunden ist, und wobei die RNA-Sequenz dazu fähig ist, in der Wirtszelle enzymatisch abgespalten zu werden, was zur In-situ-Herstellung eines RNA-Polynukleotids führt, das eine erste oder dritte Sequenz mit einem freien 3'- oder 5'-Ende aufweist.

**[0087]** Die vierte Nukleotidsequenz kann vorzugsweise von RNA-Vorläufern, wie Ribozymen, tRNA-Vorläufer, rRNA-Vorläufer, mikroRNA-Vorläufer, durch Ribozyme erkannten RNAs oder durch RNase P erkannten RNAs abgeleitet werden. Ribozyme spalten sich selbst derart, dass ein freies 31 oder 5'-Ende an der ersten oder dritten Nukleotidsequenz erzeugt wird. Alternativ spalten Ribozyme die durch sie erkannten RNA-Sequenzen, wodurch ein freies 3'- oder 5'-Ende an der ersten oder dritten Nukleotidsequenz erzeugt wird. In der Wirtszelle vorhandene Enzyme prozessieren RNA-Vorläufer. Diese vierten Nukleotidsequenzen sind vorzugsweise derart gestaltet, dass sie durch Enzyme gespalten werden, die in der Wirtszelle vorhanden sind.

**[0088]** Die vorstehend genannten vierten Sequenzen können auch von "Überhang"-Sequenzen abgeleitet sein, die man natürlicherweise findet, wie Sequenzen, die sich über den komplementierenden Teil von RNAs in der "mikroRNA"-Familie hinaus erstrecken. MikroRNAs (miRNAs) gehören zu einer wachsenden Klasse nicht-codierender RNAs von 21–24 Nukleotiden mit let-7-RNA und lin-4-RNA als Gründungsmitgliedern. MikroRNA-Moleküle findet man in den Genomen einer Reihe von Spezies, einschließlich Würmern, Fliegen, Menschen und Pflanzen, und sie werden gewöhnlich von etwa 70 nts langen RNA-Vorläufern mit Haarnadel-Struktur exprimiert. Diese RNA-Vorläufer mit Haarnadel-Struktur können auch in einem Cluster aus mehreren Vorläufern vorliegen. Normalerweise akkumuliert nach der Prozessierung nur ein Strang der duplizierten Region des Vorläufers in der Zelle als 21–24 Nukleotide lange RNA. Beispiele für identifizierte miRNAs sind in Lagos-Quintana, M et al. Science (2001) 294: 853, Lau et al. Science (2001) 294: 858, Lee und Ambros Science (2001) 294: 862 beschrieben.

**[0089]** Ein am stärksten bevorzugtes dsDNA-Polynukleotid umfasst eine vierte Sequenz, deren Funktion darin besteht, dass sie ein orientiertes Klonieren in einen erfindungsgemäßen DNA-Vektor gestattet, wie nachstehend ausführlicher beschrieben. Die dsDNA-Polynukleotidsequenzen können Restriktionsstellen an jedem Ende enthalten, die für eine Spaltung durch ein Restriktionsenzym oder zwei verschiedene Restriktionsenzyme empfänglich sind, so dass effizientes Klonieren möglich ist. Die erhaltenen Termini der dsDNA-Oligonukleotide haben vorzugsweise überhängende (entweder 5'- oder 3'-überhängende) Nukleotidsequenzen, die den Vektorinser-tionsstellen entsprechen. Das dsDNA-Polynukleotid, das die spaltbaren Restriktionsstellen an den Termini enthält, kann durch molekularbiologische Standard-techniken erzeugt werden, zum Beispiel durch

Hybridisierung zweier komplementärer ssDNA-Oligo-nukleotide. Alternativ können zwei hybridisierte DNA-Oligonukleotide, die nur Restriktionsstellen an ihren 5'-Termini besitzen, an ihren komplementären 3'-Termini enzymatisch verlängert werden, so dass die völlig komplementäre doppelsträngige DNA hergestellt wird. Außerdem kann der Fachmann Klonierungstechniken für stumpfe Enden und PCR verwenden, um alternative Synthesewege zu entwickeln und das hierin beschriebene orientierte Klonieren zu erzielen.

**[0090]** Die vorstehend genannten vierten und fünften Sequenzen können von der DNA-Sequenz transkribiert werden oder nicht, die in einem erfindungsgemäßen DNA-Vektor vorhanden ist, können aber eine Funktion als Teil des stromaufwärts gelegenen Promoters oder des stromabwärts gelegenen Terminationssignals ausüben. Infolgedessen kann die vierte Sequenz das Startsignal für die Transkription durch RNA-Polymerase enthalten, und die fünfte Sequenz ein Stoppsignal umfassen, wie eine Sequenz aus mehreren "T", die in eine fünfte RNA-Sequenz mit mehreren "U"-Nukleotiden transkribiert. Nach der Transkription kann die vierte Sequenz mit Ausnahme von einem bis etwa fünf und stärker bevorzugt einem bis etwa drei "G"-Nukleotiden nicht in RNA transkribiert werden.

**[0091]** Unter einem bestimmten Aspekt der vorliegenden Offenbarung verwendet das Verfahren zur Herstellung des selbstkomplementierenden Polynukleotids ein Zwischen-Polynukleotid, das im Wesentlichen aus einer ersten Sequenz besteht, die aus etwa 19 bis etwa 22 Nukleotiden besteht, wobei die erste Sequenz mit einer zweiten Sequenz, die zur Bildung einer Stamm-Schleifenstruktur fähig ist wenn die zweite Sequenz eine RNA-Sequenz ist, kovalent verbunden ist, worin die erste Sequenz im Wesentlichen aus einer RNA-Sequenz, einem einzelsträngigen DNA-Äquivalent davon oder einer RNA- oder DNA-Sequenz, die zu der RNA-Sequenz komplementär ist, besteht. mRNA-Sequenzen, die für Protein codierende Sequenzen sind, sind eine spezielle Ausführungsform der Verfahren und Zusammensetzungen der vorliegenden Offenbarung.

**[0092]** Die selbstkomplementierenden Einzelstrangpolynukleotide können durch chemische Synthese synthetisiert werden. Das Syntheseverfahren erfordert, dass die Zielsequenz der RNA bekannt ist, eine 19 bis 22 nt lange Sequenz, die dieser entspricht, hergestellt und die Synthese fortgesetzt wird, um die Stamm-Schleife-Sequenz von etwa 4 etwa 30 Nukleotiden, stärker bevorzugt von 6 etwa 13 Nukleotiden, hinzuzufügen. Das isolierte synthetische Polynukleotid kann zur Herstellung eines Vektors für die Verwendung als Zwischenprodukt bei der Ausführung der vorliegenden Erfindung verwendet oder weiter verlängert werden, so dass es die komplementierende dritte Sequenz enthält.

**[0093]** In der Praxis werden etwa zwei bis etwa fünf Sequenzen aus einer einzelnen RNA-Sequenz zur Herstellung einer entsprechenden Anzahl von Vektoren, die die selbstkomplementierenden Polynukleotide enthalten, ausgewählt. Das vorliegende Verfahren, das noch detaillierter beschrieben wird, verwendet diesen "redundanten" Satz von Vektoren, die die selbstkomplementierenden einzelsträngigen Polynukleotide enthalten, um die optimale Wahl der RNA-Sequenz festzustellen, die nur eine einzigartige RNA adressiert, die in einer Familie von RNA mit homologen Sequenzregionen vorliegen kann. Alternativ kann eine Sequenz gestaltet werden, die gegen mehrere RNA-Ziele gerichtet ist, wenn ein Knock-down von mehr als einem RNA-Ziel, z. B. von RNAs, die zu einer Familie gehören, gewünscht wird.

**[0094]** Ein anderes Verfahren zur Herstellung des selbstkomplementierenden Polynukleotids, das die dritte Sequenz enthält, beinhaltet die Behandlung eines einzelsträngigen Polynukleotids, das im Wesentlichen aus einer ersten Polynukleotidsequenz besteht, die mit einer zweiten Polynukleotidsequenz kovalent verbunden ist, die zwei Nukleotidsequenzen enthält, die zur komplementären Basenpaarung und dadurch zur Bildung einer Stamm-Schleife-Struktur fähig sind, und die einen 3'-OH-Terminus hat, unter derartigen Bedingungen, dass die erste Sequenz beginnend am 3'-OH-Terminus für die Synthese einer komplementären Sequenz dazu als Matrize dient.

**[0095]** Das Polynukleotid, das infolge der Extensionsreaktion unter Verwendung der Matrize oder durch chemische Synthese produziert worden ist, umfasst eine erste Nukleotidsequenz und eine dritte Nukleotidsequenz, die durch eine zweite Nukleotidsequenz kovalent, die zur Bildung einer Stamm-Schleife-Struktur fähig ist, verbunden sind, so dass alle Nukleotide in der ersten Sequenz und in der dritten Sequenz zur Basenpaarung miteinander fähig sind. Die zu der ersten Sequenz komplementäre dritte Sequenz ist mit dem distalen Ende der zweiten Sequenz kovalent verbunden.

**[0096]** Bei einer speziellen Ausführungsform des Zwischen-Polynukleotids der Vektoren der vorliegenden Erfindung enthält die zweite Nukleotidsequenz mindestens eine Nukleotidsequenz, die dazu fähig ist, enzymatisch abgespalten zu werden. Eine stärker bevorzugte Ausführungsform umfasst eine zweite Sequenz, die mindestens zwei enzymatische Spaltstellen aufweist. Ein besonders bevorzugtes Zwischen-Poly-nukleo-

tid umfasst eine zweite Polynukleotidsequenz, die den Stammteil der Stamm-Schleife-Struktur einschließlich mindestens einer der enzymatischen Spaltstellen codiert.

**[0097]** Eine andere spezielle Ausführungsform umfasst ein Polynukleotid-Zwischenprodukt, worin sich mindestens eine enzymatische Spaltstelle an den 5'- und/oder 3'-Enden der zweiten Sequenz befindet. Enzymatische Spaltstellen bestehen aus Nukleotidsequenzen, die mindestens vier bis etwa acht Basenpaare enthalten und sind dem Fachmann bekannt. Solche Sequenzen können etwa zwei etwa zwanzig zusätzliche Nukleotide zu der Länge der zweiten Sequenz hinzufügen und anstelle der komplementierenden Nukleotide eingesetzt werden, welche die 5'- und 3'-Enden der Schleifensequenzen festlegen. Solche verlängerten Sequenzen können aus etwa zwölf bis etwa 50 Nukleotiden bestehen. Bevorzugte verlängerte künstliche Schleifensequenzen bestehen aus etwa zehn bis etwa 36 Nukleotiden.

**[0098]** Die vorliegende Erfindung betrifft Vektor-konstrukte, die das selbstkomplementierende Polynukleotid und eine pol-III-Promotorsequenz umfassen, die sich stromaufwärts von der ersten Sequenz des Polynukleotids befindet. Die erfindungsgemäße selbstkomplementierende DNA-Polynukleotidsequenz kann vorzugsweise in einen Plasmid-DNA-Vektor, einen viralen Adenovirus-DNA-Vektor, einen adenoassoziiertes-Virus-Vektor oder einen Herpesvirus eingesetzt werden. Der DNA-Plasmidvektor kann allein oder mit verschiedenen Vektoren komplexiert zugeführt werden. Die DNA, die DNA/Vektor-Komplexe oder die rekombinanten Viruspartikel werden an der Behandlungsstelle lokal verabreicht, wie nachstehend erläutert. Vorzugsweise werden rekombinante Vektoren, die zur Expression der erfindungsgemäßen Polynukleotide fähig sind, lokal zugeführt, wie unten beschrieben, und persistieren in den Zielzellen. Nachdem es exprimiert wurde, wird das selbstkomplementierende RNA-Molekül prozessiert und zur endogenen Ziel-RNA geführt, an der es die Funktion des Abbaus der Ziel-RNA ausübt.

**[0099]** Die Promotorsequenzen sind die Pol III-Promotoren. Die Pol III-Promotoren beinhalten diejenigen Promotoren, die aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus 5S-rRNA-, tRNA-, VA-RNA-, Alu-RNA-, H1- und kleinen nukleären U6-RNA-Promotoren besteht.

**[0100]** Bei der Vektorkonstruktion können die erfindungsgemäßen Polynukleotide zusätzlich zu dem Promotor mit einer oder mehreren regulatorischen Regionen verbunden werden. Die Auswahl der geeigneten regulatorischen Region oder Regionen ist eine Routineangelegenheit innerhalb der gewöhnlichen Fähigkeiten des Fachmanns. Andere regulatorische Regionen als Promotoren sind u. a. Enhancer, Suppressor usw.

**[0101]** Zusätzlich zu rekombinanten Adenovirus-(dsDNA-)Systemen sind andere Virenverpackungssysteme, wie ssDNA-Viren, zum Beispiel adenovirusassoziiertes Virus (AAV), für die Verwendung als Vektorgrundgerüst bei der vorliegenden Erfindung verwendbar. Außerdem sind andere dsDNA-Viren, wie zum Beispiel Epstein-Barr-Virus, Herpessimplex-Virus, Baculovirus oder Vaccinia-viren, als Vektorgrundgerüstkonstrukte bei der vorliegenden Erfindung einsetzbar. Jedes dieser Systeme hat ein anderes Wirtsspektrum.

**[0102]** Für die Expression in AAV wird das Polynukleotid in einen AAV-Expressionsvektor kloniert. Zur Produktion rekombinanter AAV-Partikel werden 293-Zellen mit Adenovirus Typ 5 infiziert; 4 Stunden später werden die infizierten Zellen mit dem AAV-Expressionsplasmid-Oligonukleotid-DNA-Konstrukt und einem AAV-Helperplasmid, pAAV/Ad (Samulski et al., (1989) J. Virol. 63: 3822–3828) co-transfiziert. Mit der Produktion von rekombinantem AAV unterliegen die 293-Zellen einer Zytopathologie, wobei sie kugelförmig werden und ihre Fähigkeit zur Adhäsion an eine Gewebekulturoberfläche verlieren. Nach der Entwicklung der maximalen Zytopathologie wird der Überstand geerntet und, wenn notwendig, eingeengt (Halbert et al. 1997. J. Virol. 71: 5932–5941).

**[0103]** Für die Vaccinia-virus-Expression kann ein replikationskompetentes Vaccinia-virus verwendet werden. Das Polynukleotid wird mit einem Vaccinia-virus-Promotor, zum Beispiel P11, operativ verbunden. Vorzugsweise wird der Vaccinia-virus-Stamm MVA verwendet, weil er rekombinante Gene exprimiert; aber eine Deletion enthält, die ihn in vielen Säugerzellen replikationsinkompetent macht. Folglich kann das Polynukleotid in den Ziel-Säugerwirtszellen exprimiert werden, ohne dass sich die durch Vaccinia-virus induzierte Zytopathologie entwickelt. Das rekombinante Vaccinia-virus wird durch Infektion von Hühnerembryo-fibroblasten (CEF) mit Vaccinia und Co-Transfektion eines Transfervektors produziert, in den das erfindungsgemäße Polynukleotid und ein Markergen (beta-Galaktosidase), funktionell mit einem Vaccinia-Promotor, wie P11, verbunden und durch genomische Sequenzen flankiert, ligiert wurde. Das Konstrukt wird durch homologe Rekombination in das Vaccinia-Genom inseriert. Rekombinante Viren können durch In-situ-Färbung hinsichtlich der beta-Galaktosidase-Expression mit X-Gal (Wyatt et al. (1995) Virology 210: 202–205) identifiziert werden.

**[0104]** Weitere Vektorsysteme sind u. a. die nicht-viralen Systeme, die das Einbringen von DNA, die für die selbstkomplementierende einzelsträngige RNA codiert, oder der RNA selbst in einen Patienten erleichtern. Zum Beispiel kann ein DNA-Vektor, der eine gewünschte Sequenz codiert, mittels Lipofektion in vivo eingebracht werden. Synthetische kationische Lipide, die derart gestaltet sind, dass sie die Schwierigkeiten begrenzen, auf die man bei der Liposomen-vermittelten Transfektion trifft, können zur Herstellung von Liposomen für die In-vivo-Transfektion eines Gens verwendet werden, das einen Marker codiert (Felgner et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413–7); siehe Mackey et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8027–31; Ulmer et al. (1993) Science 259: 1745–8).

**[0105]** Die Verwendung kationischer Lipide kann die Einkapselung negativ geladener Nukleinsäuren fördern und zudem die Fusion mit negativ geladenen Zellmembranen (Felgner und Ringold (1989) Nature 337: 387–8). Besonders geeignete Lipidverbindungen und -zusammen-setzungen für den Transfer von Nukleinsäuren sind in den internationalen Patentveröffentlichungen WO 95/18863 und WO 96/17823 und im U.S.-Patent Nr. 5 459 127 beschrieben. Die Verwendung von Lipofektion zum Einbringen exogener Gene in die spezifischen Organe in vivo hat bestimmte praktische Vorteile, und das Steuern der Transfektion zu bestimmten Zelltypen wäre in einem Gewebe mit zellulärer Heterogenität, zum Beispiel Pankreas, Leber, Niere und Gehirn, besonders vorteil-haft. Lipide können zu Zielsteuerungszwecken mit anderen Molekülen chemisch gekoppelt werden. Zielge-steuerte Peptide, z. B. Hormone oder Neurotransmitter und Proteine, zum Beispiel Antikörper, oder Nicht-Peptid-Moleküle können mit Liposomen chemisch gekoppelt werden. Andere Moleküle sind ebenfalls zur Erleich-terung der Transfektion einer Nukleinsäure in vivo geeignet, zum Beispiel ein kationisches Oligopeptid (z. B. internationale Patentveröffentlichung WO 95/21931), von DNA-Bindungsproteinen abgeleitete Peptide (z. B. internationale Patentveröffentlichung WO 96/25508) oder ein kationisches Polymer (z. B. internationale Patent-Veröffentlichung WO 95/21931).

**[0106]** Die stärker bevorzugten viralen Vektoren, die zur Ausführung der vorliegenden Erfindung geeignet sind, sind die E1-deletierten adenoviralen Vektoren, wobei die E1-, E2A-deletierten Vektoren am stärksten bevorzugt sind. Die stärker bevorzugten adenoviralen Vektoren sind u. a. die E1-deletierten Serotyp-5-Adeno-virusvektoren, wobei die E1-, E2A-deletierten Vektoren am stärksten bevorzugt sind. Vektoren können auch aus anderen Adenovirus-Serotypen und entsprechenden Verpackungszellen, die Sequenzen für die viralen Proteine enthalten, die aus diesen Vektorgrundgerüsten deletiert wurden, hergestellt werden.

**[0107]** Die bevorzugten Adenovirusvektor/Verpackungszelle-Kombinationen sind diejenigen Kombinationen, wobei die Verpackungszelle und der Vektor keinerlei überlappende adenovirale Sequenzen enthalten, wo-bei eine Überlappung die statistische Möglichkeit der Produktion replikationskompetenter Adenoviruspartikel liefern würde. Bevorzugte Verpackungszellen, die zur Produktion solcher Vektoren geeignet sind, sind u. a. die 293- und 911-Zellen, wobei die am stärksten bevorzugten Zellen die PER.C6-Zelllinie ist. Die modifizierte PER.C6/E2A-Zelllinie ist eine spezielle Ausführungsform, welche die E1-, E2A-deletierten Adenovirusvektor-konstrukte mit nicht-überlappenden adenoviralen E1-, E2A-Sequenzen komplementiert, und ist bei der Praxis der vorliegenden Erfindung am stärksten bevorzugt.

**[0108]** Die erfindungsgemäßen Vektoren, wie hierin beschrieben, sind auch bei Verfahren zum Senken der Mengen an RNA oder Protein, das von der RNA transkribiert wird, in einer Wirtszelle oder einem Individuum geeignet, wobei man die Zelle oder das Individuum mit einem erfindungsgemäßen Vektor transfiziert. Bevor-zugte erfindungsgemäße Vektoren umfassen die vorstehend erwähnte erste Nukleotidsequenz und eine dritte Nukleotidsequenz, die durch eine zweite Nukleotidsequenz, die zur Bildung einer Stamm-Schleife-Struktur fähig ist, kovalent verbunden ist, so dass alle Nukleotide in der ersten Sequenz und in der dritten Sequenzen zur Basenpaarung miteinander fähig sind, und wobei die zweite Nukleotidsequenz eine Stamm-Schleife-bildende Region umfasst, die von natürlich vorkommenden RNA-Sequenzen abgeleitet ist, die man in anderen RNA-Molekülen als mRNA findet, wie zum Beispiel tRNA-, snRNA-, rRNA-, mtRNA- oder strukturelle RNA-Sequenzen. Bevorzugte Stamm-Schleife-Sequenzen sind von der let-7-Nukleotidsequenz oder einem Teil davon oder einer künstlich erzeugten Polynukleotidsequenz, die darauf basiert, abgeleitet. Die Verabreichung des vorste-hend genannten Vektors an ein Individuum umfasst die Verabreichung einer Menge an Vektor, die bewirkt, dass die Mengen der RNA in den transfizierten Zellen des Individuums gesenkt werden.

**[0109]** Der bevorzugte erfindungsgemäße Vektor, der ein Polynukleotid enthält, das einen Promotor umfasst, der mit einer Sequenz eines selbstkomplementierenden Polynukleotids operativ verbunden ist, kann hergestellt werden, indem man das selbstkomplementierende Polynukleotid denaturiert, das erhaltene denaturierte Poly-nukleotids in ein doppelsträngiges Polynukleotid umwandelt und das doppelsträngige Polynukleotid in einen Vektor ligiert, der fähig ist, eine Wirtszelle zum transfizieren und das Polynukleotid zu transkribieren. Alternativ kann das selbstkomplemen-tierende Polynukleotid als zwei einzelsträngige Polynukleotide chemisch synthe-

tisiert werden, die zur Hybridisierung miteinander fähig sind, gefolgt von Ligation in den Vektor. Die Ligation kann vorzugsweise in ein Adapterplasmid erfolgen, das durch Co-Transfektion mit einem Helfermolekül zur Bildung eines transfizierbaren Virusvektorpartikels in einer Verpackungszelllinie verwendet werden kann.

**[0110]** Eine weitere Ausführungsform des Vektorkonstrukts, das das selbstkomplementierende Polynukleotid codiert, ist diejenige, wobei die zweite Nukleotidsequenz mindestens eine Nukleotidsequenz enthält, die dazu fähig ist, enzymatisch abgespalten zu werden. Eine stärker bevorzugte Ausführungsform umfasst eine zweite Sequenz, die mindestens zwei enzymatische Spaltstellen hat. Bei dieser Ausführungsform kann die zweite Sequenz, die jede beliebige Länge haben kann, durch enzymatische Spaltung entfernt und durch eine Stamm-Schleife-Sequenz ersetzt werden. Bei einer weiteren Ausführungsform codiert die zweite Nukleotidsequenz für ein Gen, das sich zur Erleichterung der Klonierung von Stamm-Schleife-Sequenzen in den Vektor eignet. Bei einer weiteren speziellen Ausführungsform ist das Gen, das zur Erleichterung der Klonierung von Stamm-Schleife-Sequenzen in den Vektor geeignet ist, das E.-coli-Todesgen ccdB.

**[0111]** Die erfindungsgemäßen Vektoren können einem Patienten durch eine Vielzahl von Verfahren verabreicht werden. Sie können direkt zu Zielgeweben gegeben werden, mit kationischen Lipiden komplexiert, in Liposomen verpackt oder den Zielzellen durch andere, im Stand der Technik bekannte Verfahren zugeführt werden. Eine lokalisierte Verabreichung an die gewünschten Gewebe kann mittels Katheter, Infusionspumpe oder Stent, mit oder ohne Einbringen des selbstkomplemen-tierenden Polynukleotids in Biopolymere, erfolgen. Alternative Zufuhrwege beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf intravenöse Injektion, intramuskuläre Injektion, subkutane Injektion, Aerosol-Inhalation, orale (Tabletten- oder Pillenform), topische, systemische, okulare, intraperitoneale und/oder intrathekale Zufuhr.

**[0112]** Vorzugsweise sind die Virusvek-toren, die bei Gentherapie-Verfahren der vorliegenden Offenbarung verwendet werden, replikationsdefektiv. Diesen replikationsdefektiven Vektoren fehlt gewöhnlich mindestens eine Region, die zur Replikation des Virus in der infizierten Zelle notwendig ist. Diese Regionen können entweder (ganz oder teilweise) beseitigt oder durch jede Technik, die einen Fachmann bekannt ist, nicht-funktionell gemacht werden. Diese Techniken beinhalten die vollständige Entfernung, Substitution, teilweise Deletion oder Hinzufügung von einer oder mehreren Basen in einer (für die Replikation) wesentlichen Region. Derartige Techniken können *in vitro* (an der isolierten DNA) oder *in situ* unter Verwendung der Techniken zur genetischen Manipulation oder durch Behandlung mit mutagenen Mitteln erhalten werden. Vorzugsweise behält das replikationsdefektive Virus die Sequenzen seines Genoms bei, die zur Einkapselung der Viruspartikel notwendig sind.

**[0113]** Bei anderen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden adenoassoziierte Viren ("AAV") verwendet. Bei den AAV-Viren handelt es sich um verhältnismäßig kleine DNA-Viren, die in stabiler und stellspezifischer Weise in das Genom der infizierten Zellen integrieren. Sie sind zur Infektion eines breiten Spektrums an Zellen fähig, ohne irgendeine Wirkung auf das Wachstum, die Morphologie oder die Differenzierung der Zellen zu verursachen, und sie scheinen nicht an Pathologien beim Menschen beteiligt zu sein.

**[0114]** Es ist ebenfalls möglich, einen DNA-Vektor *in vivo* als nacktes DNA-Plasmid einzubringen (siehe die U.S.-Patente 5 693 622, 5 589 466 und 5 580 859). Nackte DNA-Vektoren für die Gentherapie können in die gewünschten Wirtszellen durch im Stand der Technik bekannte Verfahren eingebracht werden, z. B. Transfektion, Elektroporation, Mikroinjektion, Transduktion, Zellfusion, DEAE-Dextran, Calciumphosphat-Fällung, Verwendung eines Gen-Gewehrs oder Verwendung eines DNA-Vektor-Transporters (siehe z. B. Wilson, et al. (1992) J. Biol. Chem. 267: 963–7; Wu und Wu, (1988) J. Biol. Chem. 263: 14621–4; Hartmut et al. kanadische Patentanmeldung Nr. 2 012 311, angemeldet am 15. März 1990; Williams et al. (1991). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2726–30). Rezeptorvermittelte DNA-Zufuhransätze können ebenfalls verwendet werden (Curiel et al. (1992) Hum. Gen. Ther. 3: 147–54; Wu und Wu, (1987) J. Biol. Chem. 262: 4429–32).

**[0115]** Die vorliegende Erfindung betrifft bei einer bestimmten Ausführungsform eine Zusammensetzung, die einen erfindungsgemäßen Vektor enthaltend ein selbstkomplementierendes Polynukleotid umfasst, der zum Hinunterregulieren oder Blockieren der Expression spezifischer Polypeptide oder spezifischer nicht-codierender RNA-Moleküle verwendet wird. Die Nukleinsäure codiert ein selbstkomplementierendes sRNA-Molekül, das durch eine Stamm-Schleife-RNA-Sequenz kovalent verbunden ist. Bei dieser Ausführungsform ist die Nukleinsäure mit Signalen operativ verbunden, welche die Expression der Nukleotidsequenz ermöglichen, und wird in eine Zelle unter Verwendung rekombinanter Vektorkonstrukte eingebracht, welche die Polynukleinsäure exprimieren, nachdem der Vektor in die Zelle eingebracht worden ist. Beispiele für geeignete Vektoren sind u. a. Plasmide, Adenoviren, adenoassoziierte Viren, Retroviren und Herpesviren.

**[0116]** Die vorliegende Erfindung stellt biologisch verträgliche Zusammensetzungen bereit, welche die erfundungsgemäßen Vektoren umfassen. Eine biologisch verträgliche Zusammensetzung ist eine Zusammensetzung, die fest, flüssig, ein Gel sein oder eine andere Form haben kann, in der der erfundungsgemäße Vektor in einer aktiven Form gehalten wird, z. B. in einer Form, die fähig ist, eine biologische Aktivität zu bewirken. Zum Beispiel ist ein Vektor fähig, eine Zielzelle zu transfizieren. Eine bevorzugte biologisch verträgliche Zusammensetzung ist eine wässrige Lösung, die unter Verwendung von z. B. Tris-, Phosphat- oder HEPES-Puffer, die Salzionen enthalten, gepuffert ist. Gewöhnlich ist die Konzentration an Salzionen ähnlich wie physiologische Spiegel. Biologisch verträgliche Lösungen können Stabilisierungs- und Konservierungsmittel enthalten. Bei einer stärker bevorzugten Ausführungsform ist die biokompatible Zusammensetzung eine pharmazeutisch annehmbare Zusammensetzung.

**[0117]** Diese Zusammensetzungen können zur Verabreichung auf topischem, oralem, parenteralem, intranasalem, subkutanem und intraokularem Weg formuliert werden. Parenterale Verabreichung soll bedeuten, dass sie intravenöse Injektion, intramuskuläre Injektion und intraarterielle Injektions- oder Infusionstechniken beinhaltet. Die Zusammensetzung kann parenteral in Dosierungseinheitsformulierungen verabreicht werden, die bekannte nicht-toxische, physiologisch annehmbare Standardträger, Hilfsstoffe und Vehikel, wie gewünscht, enthalten.

**[0118]** Pharmazeutische Zusammensetzungen zur oralen Verabreichung können unter Verwendung im Stand der Technik bekannter pharmazeutisch annehmbarer Träger in für die orale Verabreichung geeigneten Dosierungen formuliert werden. Diese Träger ermöglichen es, dass die pharmazeutischen Zusammensetzungen als Tabletten, Pillen, Dragées, Kapseln, Flüssigkeiten, Gele, Sirupe, Aufschlämmungen, Suspensionen und dergleichen für die Einnahme durch den Patienten formuliert werden. Pharmazeutische Zusammensetzungen zur oralen Verwendung können durch Kombination von Wirkstoffen mit einem festen Excipienten, gegebenenfalls Mahlen des erhaltenen Gemischs und Verarbeiten des Gemischs von Granulaten nach Zugabe geeigneter Hilfsstoffe, wenn gewünscht, zu Tabletten oder Drageekernen hergestellt werden. Geeignete Excipienten sind Kohlenhydrat- oder Protein-Füllstoffe, wie Zucker, einschließlich Lactose, Saccharose, Mannit oder Sorbit; Stärke aus Mais, Weizen, Reis, Kartoffel oder anderen Pflanzen; Cellulose, wie Methylcellulose, Hydroxypropylmethyl-cellulose oder Natriumcarboxymethylcellulose; Gummen, einschließlich Gummi arabicum und Tragant; und Proteine wie Gelatine und Kollagen. Wenn gewünscht, können Auflöse- oder Solubilisierungsmittel, wie das vernetzte Polyvinylpyrrolidon, Agar, Alginsäure oder ein Salz davon, wie Natriumalginat, hinzugefügt werden. Drageekerne können in Verbindung mit geeigneten Überzügen verwendet werden, wie konzentrierten Zuckerlösungen, die auch Gummi arabicum, Talk, Polyvinyl-pyrrolidon, Carbopol-Gel, Polyethylenglykol und/oder Titandioxid, Lacklösungen und geeignete organische Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemische enthalten können. Farbstoffe oder Pigmente können zu den Tabletten oder Dragee-Überzügen zur Produktkennzeichnung oder, um die Menge an Wirkstoff, d. h. die Dosierung, zu kennzeichnen, hinzugefügt werden.

**[0119]** Pharmazeutische Zubereitungen, die oral verwendet werden können, beinhalten Push-fit-Kapseln aus Gelatine sowie weiche, verschlossene Kapseln aus Gelatine und einen Überzug, wie Glycerin oder Sorbit. Push-fit-Kapseln können Wirkstoffe im Gemisch mit Füllstoff oder Bindemitteln, wie Lactose oder Stärken, Gleitmittel, wie Talk oder Magnesiumstearat, und gegebenenfalls Stabilisatoren enthalten. In weichen Kapseln können die Wirkstoffe in geeigneten Flüssigkeiten, wie Fettölen, Flüssigkeit oder flüssigem Polyethylenglykol mit oder ohne Stabilisatoren gelöst oder suspendiert werden.

**[0120]** Bevorzugte sterile injizierbare Zubereitungen können eine Lösung oder eine Suspension in einem ungiftigen, parenteral annehmbaren Lösungsmittel oder Verdünnungsmittel sein. Beispiele für pharmazeutisch annehmbare Träger sind Kochsalzlösung, gepufferte Kochsalzlösung, isotonische Kochsalzlösung (z. B. Mononatrium- oder Dinatriumphosphat, Natrium-, Kalium-, Calcium- oder Magnesiumchlorid oder Gemische solcher Salze), Ringer-Lösung, Dextrose, Wasser, steriles Wasser, Glycerin, Ethanol und Kombinationen davon. 1,3-Butandiol und sterile fixierte öle werden geeigneterweise als Lösungsmittel oder Suspendierungsmedien eingesetzt. Jedes milde fixierte Öl, einschließlich synthetischer Mono- oder Diglyceride, kann eingesetzt werden. Fettsäuren, wie Ölsäure, finden ebenfalls Verwendung bei der Herstellung injizierbarer Zubereitungen.

**[0121]** Das Zusammensetzungsmittel kann auch ein Hydrogel sein, das aus einem biokompatiblen oder nicht-zytotoxischen Homo- oder Heteropolymer, wie einem hydrophilen Polyacrylsäurepolymer, hergestellt wird, das als Arzneistoff-absorbierender Schwamm dienen kann. Bestimmte von ihnen, wie insbesondere diejenigen, die aus Ethylen- und/oder Propylenoxid erhalten werden, sind kommerziell erhältlich. Ein Hydrogel kann direkt auf die Oberfläche des zu behandelnden Gewebes, zum Beispiel während eines chirurgischen Eingriffs, aufgebracht werden.

**[0122]** Bevorzugte erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzungen umfassen einen replikations-defektiyen rekombinannten viralen Vektor und das durch die vorliegende Erfindung identifizierte Polynukleotid. Eine spezielle Ausführungsform der erfindungsgemäßen Zusammensetzung beinhaltet auch einen Transfektions-verstärker, wie Poloxamer. Ein Beispiel für ein Poloxamer ist Poloxamer 407, das kommerziell erhältlich (BASF, Parsippany, NJ) und ein nichttoxisches, biokom-patibles Polyol ist. Ein mit rekombinannten Viren im-prägniertes Poloxamer kann direkt auf die Oberfläche des zu behandelnden Gewebes, zum Beispiel während eines chirurgischen Eingriffs, aufgebracht werden. Poloxamer besitzt im Wesentlichen die gleichen Vorteile wie Hydrogel, hat aber eine niedrigere Viskosität.

**[0123]** Die erfindungsgemäße Formulierung kann, wie für die besondere behandelte Indikation benötigt, auch mehr als einen Wirkstoff enthalten, vorzugsweise solche mit komplementären Aktivitäten, die sich gegenseitig nicht nachteilig beeinflussen. Alternativ oder zusätzlich kann die Zusammensetzung ein zytotoxisches Mittel, Cytokin oder ein wachstumshemmendes Mittel umfassen. Solche Moleküle liegen in Kombination geeigneter-weise in Mengen vor, die für den beabsichtigten Zweck wirksam sind. Die Formulierungen, die zur In-vivo-Verabreichung verwendet werden sollen, müssen steril sein. Dies wird leicht mittels Filtration durch sterile Fil-trations-membranen erzielt.

**[0124]** Die erfindungsgemäßen Wirkstoffe können auch in Mikrokapseln, die zum Beispiel durch Grenzflächen-polymerisation hergestellt werden, zum Beispiel Hydroxymethylcellulose- oder Gelatine-Mikrokapseln bzw. Poly(methylmethacrylat)-Mikrokapseln, in kolloidalen Arzneistoffzufuhrsystemen (zum Beispiel Liposomen, Albu-min-Mikrokügelchen, Mikroemulsionen, Nanopartikel und Nanokapseln) oder in Makroemulsionen eingefangen werden. Solche Techniken sind in Remington's Pharmaceutical Sciences (1980); 16. Ausgabe, Osol, A. Hrsg. offenbart.

**[0125]** Zubereitungen mit verzögerter Freisetzung können hergestellt werden. Geeignete Beispiele für Zu-berei-tungen mit verzögerter Freisetzung sind u. a. semipermeable Matrizen aus festen hydrophoben Poly-meren, die den Antikörper enthalten, wobei die Matrizen die Form von geformten Gegenständen, z. B. Fil-men oder Mikrokapseln, haben. Beispiele für Matrizen mit verzögerter Freisetzung sind u. a. Polyester, Hydro-gele (zum Beispiel Poly-(2-hydroxyethylmethacrylat) oder Poly(vinylalkohol)), Polylactide (U.S.-Patent Nr. 3 773 919), Copolymere von L-Glutaminsäure und gamma-Ethyl-L-glutamat, nicht-abbaubares Ethylen-Viny-lacetat, abbaubare Milchsäure-Glycolsäure-Copolymere, wie LUPRON DEPOT™ (injizierbare Mikrokügelchen aus Milchsäure-Glycolsäure-Copolymer und Leuprolidacetat), und Poly-D-(-)-3-hydroxybuttersäure. Während Polymere, wie Ethylen-Vinylacetat und Milchsäure-Glycolsäure, die Freisetzung von Molekülen für mehr als 100 Tage ermöglichen, geben bestimmte Hydrogele Proteine für kürzere Zeiträume frei.

**[0126]** Die vorliegende Offenbarung stellt Behandlungsverfahren bereit, die die Verabreichung einer wirksa-men Menge einer erfindungsgemäßen Zusammensetzung an einen Menschen oder ein anderes Tier um-fassen. Eine therapeutisch wirksame Dosis betrifft diejenige Menge des erfindungsgemäßen Polynukleotids, die die Symptome oder den Zustand bessert. Die therapeutische Wirksamkeit und die Toxizität solcher Ver-bindungen können durch pharmazeutische Standardverfahren in Zellkulturen oder Versuchstieren bestimmt werden, z. B. die ED50 (die bei 50% der Bevölkerung therapeutisch wirksame Dosis) und die LD50 (die für 50% der Bevölkerung letale Dosis). Das Dosisverhältnis von toxischen zu therapeutischen Wirkungen ist der therapeutische Index, und er kann als das Verhältnis LD50/ED50 ausgedrückt werden. Pharmazeutische Zu-sammen-setzungen, die hohe therapeutische Indices aufweisen, sind bevorzugt. Die aus Zellkulturassays und Tier-studien erhaltenen Daten werden zur Formulierung eines Dosierungsbereichs für die Verwendung beim Menschen verwendet. Die Dosierung solcher Verbindungen liegt vorzugsweise innerhalb eines Bereichs der zirkulierenden Konzentrationen, der die ED50 bei wenig oder keiner Toxizität einschließt. Die Dosierung variiert innerhalb dieses Bereichs je nach der eingesetzten Dosierungsform, der Empfindlichkeit des Patienten und dem Verabreichungsweg.

**[0127]** Für jedes Polynukleotid der vorliegenden Offenbarung kann die therapeutisch wirksame Dosis zu Beginn entweder in Zellkulturassays oder in Tiermodellen, üblicherweise Mäusen, Kaninchen, Hunden oder Schweinen, untersucht werden. Das Tiermodell wird auch dazu verwendet, einen wünschenswerten Konzen-trationsbereich und Verabreichungsweg zu erzielen. Diese Information kann dann zur Bestimmung geeigneter Dosen und Wege für die Verabreichung bei Menschen verwendet werden. Die genaue Dosierung wird vom einzelnen Arzt angesichts des zu behandelnden Patienten gewählt. Dosierung und Verabreichung werden der-art eingestellt, dass ausreichende Spiegel des Wirkstoffs bereitgestellt werden oder die gewünschte Wirkung beibehalten wird. Zusätzliche Faktoren, die in Betracht gezogen werden können, sind u. a. die Schwere des Krankheitszustandes, das Alter, Gewicht und Geschlecht des Patienten; die Ernährungsweise, die gewünsch-te Dauer der Behandlung, das Verabreichungsverfahren, die Zeit und Häufigkeit der Verabreichung, die Arz-

neistoffkombination(en), Reaktionsempfindlichkeiten und die Toleranz der/Re-aktion auf die Therapie. Lange wirkende pharmazeutische Zusammensetzungen können je nach der Halbwertzeit und der Ausscheidungsrate der bestimmten Formulierung alle 3 bis 4 Tage, jede Woche oder einmal alle zwei Wochen verabreicht werden.

**[0128]** Wie hier vorstehend erläutert, können rekombinante Viren zum Einschleusen von DNA, die selbst-komplementierende Einzelstrangpolynukleotide codiert, sowie von selbstkomplementierender einzelsträngiger RNA verwendet werden. Erfindungsgemäße rekombinante Viren werden im Allgemeinen in Form von Dosen zwischen etwa 10<sup>4</sup> und etwa 10<sup>14</sup> pfu formuliert und verabreicht. Im Falle von AAVs und Adenoviren werden vorzugsweise Dosen von etwa 10<sup>6</sup> bis zum 10<sup>11</sup> pfu verwendet. Der Begriff pfu ("plaque forming unit") entspricht dem Infektionsvermögen einer Suspension von Virionen und wird durch Infektion einer geeigneten Zellkultur und Messen der Anzahl an gebildeten Plaques bestimmt. Die Techniken zur Bestimmung des pfu-Titers einer Viruslösung sind im Stand der Technik gut dokumentiert.

**[0129]** Selbstkomplementierende Polynukleotide der vorliegenden Offenbarung können in einem pharmazeutischen annehmbaren Träger verabreicht werden. Die Dosierungsspiegel können je nach der gemessenen therapeutischen Wirksamkeit angepasst werden.

**[0130]** Unter einem anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung wird der Polynukleotidvektor in das Ziel-ge-webe unter Verwendung eines der hier beschriebenen Vektorzufuhrsysteme überführt. Dieser Transfer wird entweder ex vivo bei einem Verfahren, bei dem die Nukleinsäure im Labor auf Zellen überführt und die modifizierten Zellen dann einem Menschen oder einem anderen Tier verabreicht werden, oder in vivo bei einem Verfahren, bei dem die Nukleinsäure direkt auf Zellen innerhalb des Menschen oder des anderen Tieres über-führt wird, durchgeführt. Bei bevorzugten Ausfüh-rungsformen wird ein Adenovirusvektorsystem für die Zufuhr des Expressionsvektors verwendet. Wenn gewünscht, wird ein gewebespezifischer Promotor in dem Expressionsvektor verwendet, wie oben beschrieben.

**[0131]** Nicht-virale Vektoren können unter Verwendung eines der im Stand der Technik bekannten Verfah-ren in Zellen eingebracht werden, einschließlich Calciumphos-phat-Co-Präzipitation, Lipofektion (synthetische anio-nische und kationische Liposomen), rezeptorvermittelter Gen-Zufuhr, Injektion nackter DNA, Elektropo-ration und bioballistischer oder Partikelbeschleunigung.

**[0132]** Die vorliegende Erfindung kann zur In-vitro-Validierung von Arzneistoffzielen und zum Screening nach neuen Arzneistoffzielen mittels Gen-Knock-down in zellulären Assays sowie in Tierstudien zur Entwicklung einer In-vivo-Zielvalidierung von Therapeutika verwen-det werden.

**[0133]** Die vorliegende Erfindung betrifft auch Verfahren und Zusammensetzungen für die Zufuhr und Expression von Führungsnukleinsäure(n), die RNA mit bekannter oder unbekannter Funktion adressier(t/en), mit ho-hem Durchsatz in einen Wirt. Es sind Verfahren beschrieben, wobei man einen Wirt mit den adenoviralen Vektoren, welche die selbstkomplementierenden RNA-Moleküle einschließlich der Führungsnukleinsäure(n) in dem Wirt exprimieren, infiziert, einen veränderten Phänotyp, der in dem Wirt durch den Knock-down der Ziel-RNA-Nukleinsäuren induziert wird, identifiziert und dadurch dem (den) durch die Zielnukleinsäuren codierten Produkt(en) eine Funktion zuweist. Die Verfahren können vollständig automatisiert und in einem Format mit mehreren Vertiefungen durchgeführt werden, so dass eine bequeme Analyse von Probennukleinsäurebiblio-theken mit hohem Durchsatz möglich wird, wobei die Proben für die bei diesem Verfahren verwendeten Füh-rungssequenzen codieren.

**[0134]** Die vorliegende Erfindung kann dazu verwendet werden, Bibliotheken von erfindungsgemäßigen Vek-to-ren herzustellen. Diese Bibliotheken können als einzelnes, kompartimentalisiertes Element oder als verschie-dene Elemente herstellt werden, wobei jedes Element im Wesentlichen aus einem Vektor besteht, der für eine einzigartige Nukleotidsequenz codiert. Alternativ kann eine Bibliothek herstellt werden, die Pools von Vektoren enthält.

**[0135]** Die Bibliotheken können so verwendet werden, dass sie zur Aufklärung der Funktionen von Wirtszel-len-RNA-Molekülen, die das einzigartige Polynukleotid enthal-ten, das sich in jedem Kompartiment der Biblio-thek befindet, oder anders gesagt, zur Bestimmung der Funktion einer natürlich vorkommenden Polynukleotid-sequenz beitragen, wobei man eine Wirtszelle mit einem erfindungsgemäßigen Vektor transfiziert, wobei der Vektor eine Polynukleotidsequenz enthält, die zu einem Teil des natürlich vorkommenden Polynukleotids kom-pplementär ist, und eine Veränderung im zellulären Phänotyp ermittelt. Jeder Vektor in der Bibliothek kann in eine oder mehrere Zellen eingebracht und Veränderungen in der Proteinexpression oder im Phänotyp können beobachtet werden. Die Vektoren können Plasmide umfassen oder in ein Virusvektorkonstrukt eingebracht

werden. Alternativ kann mehr als ein Vektor in eine einzelne Wirtszelle eingebracht werden, wodurch mehr als eine Führungssequenz eingebracht wird. Bevorzugte Virusvektoren umfassen Adenovirus-, Retrovirus- und AAV-Vektoren. Stärker bevorzugt sind die Adenovirusvektoren und am stärksten bevorzugt sind die Adenovirusvektoren, die ein replikationsdefizientes Konstrukt umfassen, das in einer Verpackungszelle mit komplementären Sequenzen zu der im Vektor selbst enthaltenen Sequenz vermehrt werden kann.

**[0136]** Die vorliegende Erfindung stellt einen temporären Knock-down von Proteinen, wie letalen Proteinen, während der Virusproduktion bereit, wodurch die Replikation und Verpackung von Viren ermöglicht wird, die für letale Proteine codierende Sequenzen enthalten. sRNA kann für einen Knock-down der Genexpression während der Virusproduktion mit jedem beliebigen Virus und jeder beliebigen Virusverpackungszelllinie verwendet werden. Dementsprechend betrifft die vorliegende Offenbarung ein Verfahren zur Herstellung von viralen Vektoren, die für ein toxisches Protein codieren, bei dem man

- (a) eine Polynukleotidsequenz, wie hier beschrieben, mit einer ersten Sequenz, die zu der für das toxische Protein codierenden mRNA komplementär ist, in eine Zelle einführt,
- (b) den viralen Vektor in diese Zelle einführt,
- (c) die Zellen unter Bedingungen kultiviert, die die Expression der Polynukleotidsequenz und die Replikation des viralen Vektors ermöglichen und
- (d) die viralen Vektoren gewinnt.

**[0137]** Ein bevorzugtes Verfahren der vorliegenden Offenbarung verwendet Virusverpackungszellen, die mit dem Polynukleotid stabil transfiziert sind.

**[0138]** Die Virusproduktion unter Verwendung von Adenovirus, Retrovirus oder Alphavirus profitiert von solchen Knock-down-Verfahren, und Beispiele für Verpackungszellen beinhalten unter anderen adenovirale Verpackungszellen, wie PER.C6-Zellen und Derivate davon, HEK293-Zellen, 293- und 911-Zellen. Außerdem eignet sich die sRNA-Knock-down-Methodik zur Verbesserung der Produktion rekombinanter Proteine. Solche Proteinproduktionsverfahren profitieren von der Hinuntermodulation der Expression heterologer Proteine, bevor der optimale Produktionszelltiter für die Proteinproduktion erreicht wird.

**[0139]** Die vorliegende Erfindung kann auf jedes virale Verpackungs- und Proteinproduktionssystem angewendet werden, ohne dass eine Optimierung notwendig ist. Die hier beschriebenen Knock-down-Konstrukte können in jede gewählte Verpackungszelle transfiziert werden, und diese transfizierten Zellen werden direkt verwendet. Die vorliegende Erfindung verwendet Viruskonstrukte, die direkt zur Infektion von Zellen verwendet werden, und keine weitere Verbindung wird von dem System zur Induktion der Virus- oder Proteinproduktion benötigt.

**[0140]** Die Sequenzen zwischen dem Transkriptionsstart und dem 5'-Ende der Expressionskassette, die zur Expression exogener Gene verwendet wird, können zum Knock-down der Expression dieser exogenen Gene während der Virusproduktion verwendet werden. Erfindungsgemäße Polynukleotide, wobei die Polynukleotide Führungssequenzen enthalten, die gegen die Sequenz zwischen dem Transkriptionsstart und dem 5'-Ende der Expressionskassette gerichtet sind, werden mit dem (den) viralen Plasmid(en), das (die) die Sequenz für das toxische Protein trägt (trägt), in die Verpackungszellen co-transfiziert. Alternativ wird ein erfindungsgemäßer Vektor verwendet, der Polynukleotide codiert, die die Expression von Zielsequenzen durch Abbau der mRNA hinuntermodulieren. Der Vektor kann transient oder zur Erzeugung eines stabilen Derivats der Verpackungszelllinie verwendet werden.

**[0141]** Die verschiedenen Aspekte der vorliegenden Erfindung werden in den folgenden nicht-beschränkenden Beispielen weiter beschrieben.

## BEISPIELE

Beispiel 1: Ein Reporterassaysystem auf Basis der let-7-Zielsequenz zur Überwachung der Repression

**[0142]** Beispiel 1 beschreibt die Entwicklung eines Reporterassaysystems, das ein Verfahren zum Messen des Knock-down eines leicht zu testenden Gens bereitstellt. Dieses System wird dazu verwendet festzustellen, ob siRNAs und chimäre RNAs die Expression des leicht zu testenden Luciferasegens verringern können. Das System besteht aus zwei Komponenten. Die erste Komponente ist ein Reporter-DNA-Molekül, das auf dem pGL3-Luciferase-Reportervektor basiert (von Promega erhältlich) und derart modifiziert wurde, dass es eine let-7-Zielsequenz enthält, die von der auf Chromosom 22 befindlichen let-7-Sequenz des Menschen abgeleitet ist. Dieses Reporterkonstrukt wird folgendermaßen bezeichnet: Der Name beginnt mit einem "p", was

darauf hindeutet, dass das Konstrukt sich in einem Plasmid befindet, dann folgt der Name des Reportergens (z. B. GL3 oder GL2), danach wird die Zielsequenz beginnend mit einem "t" genannt, wodurch angezeigt wird, dass es sich um die Zielsequenz (target) handelt. Zum Beispiel: beschreibt pGL3-tLet7 ein Plasmid, welches das GL3-Gen als Reporter und Let7-Sequenzen als Ziel für die Knock-down-RNA enthält. Die zweite Komponente ist eine siRNA oder ein Plasmid, das siRNA oder chimäre RNAs exprimiert. siRNAs sind doppelsträngige kurze interferierende RNA-Moleküle, die nicht länger als etwa 23 Nukleotide sind. Chimäre RNAs, wie hier verwendet, betrifft ein RNA-Molekül, das aus mindestens zwei Polynukleotidsequenzen konstruiert ist, die kovalent miteinander verbunden sind und von mindestens zwei verschiedenen RNA-Molekülen abgeleitet sind, die aus der gleichen oder von verschiedenen Spezies stammen können. Die wissenschaftliche Literatur beschreibt, dass siRNA den sequenzspezifischen Abbau einer Ziel-mRNA vermitteln. In der vorliegenden Anmeldung werden diese siRNAs wie folgt bezeichnet: siRNA, gefolgt von dem Namen des Zielgens, z. B. ist siRNA GL3.1 eine Duplex-siRNA, die gegen das GL3-Gen gerichtet ist. In diesem Beispiel werden ein Reporterkonstrukt, eine siRNA und eine interne Kontrolle, die zur Normalisierung der Luciferase-Aktivität verwendet wird, (Renilla: pRL-TK) miteinander kombiniert und zur Transfektion von Wirtszellen verwendet, und die Luciferase-Aktivität wird gemessen. Wenn die siRNA zu einem Knock-down der Expression der Luciferase-mRNA führt, wird eine Verringerung der Luciferase-Aktivität im Verhältnis zu den Kontrollen beobachtet. Das Reportersystem ist nachstehend beschrieben. Die Beschreibung ist nur als Beispiel gedacht und dient keinesfalls zur Beschränkung der Erfindung.

**[0143]** Das Reportersystem basiert auf dem Luciferase-Reportervektor pGL3 (Promega). Die let-7-Ziel-DNA-Sequenz (5'-ACTATAACAACCTACTACCTCA-3' SEQ ID NR: SEQ ID NR: 1) wird knapp außerhalb der codierenden Region von GL3 in einen pGL3-Reportervektor eingesetzt, so dass sie eine GL3-mRNA exprimiert, die die let-7-Zielsequenz enthält.

#### A. Konstruktion von pGL3-tLet-7-Reporterkonstrukten.

**[0144]** Der Vektor pGL3-control (GenBank Zugangsnummer U47296) wird an seiner einzigen Xba I-Stelle linearisiert, die sich unmittelbar 3' von der für GL3 codierenden Sequenz befindet. Die doppelsträngige let-7-Ziel-DNA-Sequenz wird unter Verwendung komplementärer DNA-Oligonukleotide (Oligo 1 und Oligo 2) erzeugt. Um die Klonierung in die Xba I-Stelle von pGL3 zu erleichtern, sind Oligo 1 und Oligo 2 derart gestaltet, dass nach der Hybridisierung die so erzeugte doppelsträngige let-7-Ziel-DNA 5'-Überhänge an jedem Ende hat, die mit einer Xba I-Restriktionsstelle kompatibel sind. Die Hybridisierung von Oligo 1 und Oligo 2 erfolgt durch Mischen der Oligos in äquimolaren Mengen auf eine Endkonzentration von 0,5 nmol/μl jeweils in Hybridisierungspuffer [10 nM Tris-HCl (pH 7,9), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl], gefolgt von Inkubation des Gemisches für 1 Minute bei 90°C und 60 Minuten bei 37°C. Die hybridisierten Oligos werden dann in die Xba I-Stelle des linearisierten pGL3-Vektors unter Verwendung üblicher Techniken ligiert, wie in Sambrook et al. beschrieben.

**[0145]** Die Let-7-Ziel-DNA-Sequenz ist SEQ ID NR: SEQ ID NR: 1:

5' -ACTATAACAACCTACTACCTCA-3'

**[0146]** Sequenzen der DNA-Oligos (5'- nach 3'):

OLIGO 1 5' -CTAGTACTATAACAACCTACTACCTCA-3' (SEQ ID NR: SEQ ID NR: 2)

OLIGO 2 5' -CTAGTGAGGTAGTAGGTTGTATAGTA-3 (SEQ ID NR: SEQ ID NR: 3)

**[0147]** Die hybridisierten Oligos 1 und 2 ergeben die folgende doppelsträngige Struktur:  
Sca I-Stelle: (AGTACT)

OLIGO 1 5' -CTAGTACTATAACAACCTACTACCTCA-3'

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

OLIGO 2 3' -ATGATATGTTGGATGATGGAGTGATC-5'

**[0148]** Unterstrichene Nukleotide bezeichnen die Xba I-kompatiblen Enden. Die Klonierung der Oligos in den Vektor führt zu einer zusätzlichen Sca I-Stelle (fett gedruckte Nukleotide), die die Selektion von Klonen mit dem Insert erleichtert und die Unterscheidung zwischen Klonen mit einem Insert in Vorwärts-(F)-Orientierung

oder Klonen mit einem Insert in Rückwärts-(R)-Orientierung ermöglicht. Die ursprüngliche Xba I-Stelle aus dem Ausgangsvektor pGL3-control wird durch das Klonierungsverfahren zerstört und fehlt somit in den Klonen mit Insert. Die Klone werden auf die Anwesenheit des Inserts getestet, indem eine PCR direkt an den transformierten Bakterien mit folgenden Primern durchgeführt wird:

OLIGO 3 5'-CATCTTCGACGCAGGTGTCGCA-3' (SEQ ID NR: SEQ ID NR: 4) (Position 1668–1689 entsprechend dem Promega-Katalog und der U47296-Sequenz)

OLIGO 4 5'-CCATCGTTCAGATCCTTATCGA-3' (SEQ ID NR: SEQ ID NR: 5) (Position 2210–2189 entsprechend dem Promega-Katalog und der U47296-Sequenz)

**[0149]** Die angegebenen Positionen basieren auf dem Vektor pGL3-control (Zugangsnummer U47296).

**[0150]** Unter Verwendung von Oligo 3 (SEQ ID NR: SEQ ID NR: 4) und Oligo 4 (SEQ ID NR: SEQ ID NR: 5) als Primern und Kolonie-DNA als Matrize sind PCR Produkte, die von Klonen ohne Insert erzeugt werden, 543 Basenpaare lang; mit einem Insert entweder in Vorwärts-(F)- oder in Rückwärts-(R)-Orientierung sind die PCR-Produkte 569 Basenpaare lang.

**[0151]** Die Orientierung des Inserts wird durch eine zweite PCR-Runde unter Verwendung zweier Primer-Kombinationen weiter analysiert:

1) Oligo 1 (SEQ ID NR: SEQ ID NR: 2) und Oligo 3 (SEQ ID NR: SEQ ID NR: 4): PCR mit der let-7-Zielsequenz in R-Orientierung erzeugt ein DNA Fragment von 297 bp; die F-Orientierung erzeugt kein DNA-Produkt.

2) Oligo 1 (SEQ ID NR: SEQ ID NR: 2) und Oligo 4 (SEQ ID NR: SEQ ID NR: 5): PCR mit der let-7-Zielsequenz in der F-Orientierung ergibt ein DNA-Fragment von 302 bp; die R-Orientierung erzeugt kein DNA-Produkt.

**[0152]** Das durch erfolgreiche Klonierung der let-7-Ziel-DNA-Sequenzen in Vorwärtsorientierung in die Xba I-Stelle von pGL3 erzeugte Plasmid wird als pGL3-tlet-7F bezeichnet. Ebenso wird das durch erfolgreiche Klonierung der let-7-Ziel-DNA-Sequenzen in der Rückwärtsorientierung in die Xba I-Stelle von pGL3 erzeugte Plasmid als pGL3-tlet-7R bezeichnet. Beide Klone, pGL3-tlet-7F und pGL3-tlet-7R, werden in weiteren Experimenten verwendet.

#### B. siRNAs

**[0153]** Die siRNAs, die pGL3 und pGL2 ansteuern (als negative Kontrolle verwendet; Zugangsnummer X65324) sind in Elbashir et al. (2001) Nature 411: 494–498 beschrieben. siRNAs sind doppelsträngige RNAs, die die Zielsequenz und deren Komplement enthalten. Zwei Uridin-Reste werden an das 3'-Ende der RNAs angefügt.

siRNA-GL2.1:

GL2-Ziel-DNA-Sequenz

5' .. CGTACGCGGAATACTTCGA.. 3' - (SEQ ID NR: 6)

siRNA-GL2.1-

**Sense**            5' -CGUACGCGGAAUACUUUCGAUU-3' (SEQ ID NR: 7)  
                       ||||||| / ||||| / ||||| / |||||

**-Antisense**    3' -UGCAUGCGCCUUUAUGAAGCU-5' (SEQ ID NR: 8)

siRNA-GL3.1:

GL3-Ziel-DNA-Sequenz

5' .. CTTACGCTGAGTACTTCGA.. 3' - (SEQ ID NR: 9)

## siRNA-GL3.1-

**Sense** 5' -CUUACGCUGAGUACUUCGAUU-3' (SEQ ID NR: 10)  
                   ||||| ||||| |||||

**Antisense** 3' -UGAAUGCACUCAUGAAGCU-5' (SEQ ID NR: 11)

[0154] Die siRNA, die die let-7-Zielssequenz adressiert, ist:

## siRNA-let7.1:

## Let-7-Ziel-DNA-Sequenz

5' . . TATACAACCTACTACCTCA . . 3' (SEQ ID NR: 12)

## siRNA-let7.1-

**Sense** 5' -UAUACAAACCUACUACCUCAUU-3' (SEQ ID NR: 13)  
                   ||||| ||||| |||||

**Antisense** 3' -UUAAAUGUUGGAUGAUGGAGU-5' (SEQ ID NR: 14)

[0155] Jedes RNA-Oligo-Paar wird hybridisiert, wie in Elbashir et al. (2001) Nature 411: 494–498 beschrieben, um die Duplex-siRNA zu erhalten.

## C. Co-Transfektion von pGL3-Reporterkonstrukten und der siRNAs

[0156] Das let-7-Zielsteuerungssystem wird getestet, indem man ein DNA/RNA-Gemisch, das aus drei Komponenten besteht, in Wirtszellen (z. B. Hela- oder PER.C6/E2A-Zellen) transfiziert:

1. Reporterkonstrukte auf Basis von Luciferase
  - a. pGL3-control(Promega) oder
  - b. pGL3-tLet-7F oder
  - c. pGL3-tLet-7R
2. Interne Kontrolle zur Normalisierung
  - a. pRL-TK (Promega; Zug.-Nr. AF025846)
3. Duplex-siRNA
  - a. siRNA-GL3.1 oder
  - b. siRNA-let-7.1 oder
  - c. siRNA-GL2.1

## Tag 1:

[0157] Hela- oder PER.C6/E2A-Zellen werden 20 Stunden vor der Transfektion in ein Format mit 96 Vertiefungen zu 4,5 X 104 Zellen/100 µl Medium (DMEM + 10% hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum für Hela-Zellen; DMEM +10% nicht-hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum für PER.C6/E2A-Zellen)/Vertiefung überimpft.

## Tag 2:

[0158] Pro Vertiefung werden DNA/RNA-Gemische in 25 µl (Gesamtvolumen) OptiMEM herstellt, die Folgendes enthalten:

1. 0,25 µg pGL3-control oder  
 0,25 µg pGL3-tLet-7F oder  
 0,25 µg pGL3-tLet-7R
2. 25 ng pRL-TK
3. 66,5 ng siRNA-GL3.1 oder  
 66,5 ng siRNA-let-7.1 oder  
 66,5 ng siRNA-GL2.1 oder  
 keine siRNA

**[0159]** LipofektAMINE2000 (0,8 µl) und OptiMEM (24,2 µl) werden für 7–10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und zu jedem DNA/RNA-Gemisch hinzugefügt. Dieses Gemisch (Endvolumen 50 µl) wird für 15–25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zu den Zellen hinzugefügt, von denen das Medium entfernt worden ist. Die Zellen werden für 48 Std. in einem 37°C-Brutschrank unter 10% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Tag 4:

**[0160]** Die Zellen werden geerntet, lysiert und die Leuchtkäfer-Luciferase- und Renilla-Luciferase-Aktivitäten werden unter Verwendung des Dual-Luciferase-Kits (Promega) gemäß den Anweisungen des Herstellers gemessen. Der absolute Leuchtkäfer-Luciferase-Wert (luc) jeder Probe wird durch seinen internen absoluten Renilla-Luciferase-Wert (ren) dividiert, um den relativen luc/ren-Wert zu erhalten. Diese relativen luc/ren-Werte werden mit der Kontrollprobe verglichen, in der keine siRNA enthalten ist.

**[0161]** Die Ergebnisse der transienten Transfektion an PER.C6/E2A sind in **Fig. 1** gezeigt. Sie zeigt die Repression der Luciferase-Aktivität von pGL3-Fusionskonstrukten, die let-7-Zielsequenzen enthalten, durch let-7-siRNAs in PER.C6/E2A-Zellen. PER.C6/E2-A-Zellen werden mit den pGL3-Fusionskonstrukten, die let-7-Zielsequenzen in jeder Orientierung enthalten (pGL3-tLet-7F, pGL3-tLet-7R), oder mit pGL3-control, das keine let-7-Sequenzen enthält, in Kombination mit jedem der siRNA-Duplices siRNA GL3.1, siRNA let-7.1, siRNA GL2.1 oder ohne siRNA transient transfiziert. Die Co-Transfektion von siRNA let-7.1 reprimiert spezifisch die Luciferase-Aktivität der Reporter pGL3-tLet7F und pGL3-tLet7R, aber nicht von pGL3-control. Die Co-Transfektion der positiven Kontrolle siRNA GL3.1 zeigt eine Repression aller Reporterkonstrukte (pGL3-tLet-7F, pGL3-tLet-7R, pGL3-control).

#### Beispiel 2: Test chimärer let-7-RNAs

**[0162]** Dieses Beispiel beschreibt die Herstellung von chimären RNAs auf Basis von let-7, die im Hinblick auf ihre Fähigkeit zum Knock-down der Genexpression in dem in Beispiel 1 beschriebenen System getestet werden.

**[0163]** Die zwei komplementären RNA-Stränge der siRNA-Duplices des Beispiels 1 werden unter Verwendung einer RNA-Schleife-Struktur kovalent verbunden, wodurch ein einziges RNA-Molekül hergestellt wird, das beide siRNA-Stränge enthält. Dies ergibt eine Molekülfaltung in einen RNA-Duplex mit einer Schleifenstruktur auf einer Seite des Duplex und einem 3'-Überhang von 2 Uridin-Resten auf der anderen Seite des Duplex. Moleküle, die diese Schleifenstruktur und die Sequenzen enthalten, werden als chimäre RNAs bezeichnet. Die Konstrukte werden wie folgt bezeichnet: Schleife-RNA, gefolgt von dem Gen, gegen das sie gerichtet sind, z. B. ist Schleife-RNA-GL2.2 ein chimäres RNA-Molekül, das eine Schleife enthält, die gegen GL2 gerichtet ist. Der Zusatz ".2" soll anzeigen, dass die RNA eine Schleife enthält, im Gegensatz zu dem im Beispiel 1 verwendeten Zusatz ".1", der eine Duplex-RNA ohne Schleifenstruktur angibt. Die hier verwendete Schleifenstruktur ist die let-7-Schleife und ist als Beispiel gedacht und soll keinesfalls die Erfindung zu beschränken.

**[0164]** Ein solches chimäres RNA-Molekül ist nachstehend dargestellt (siehe auch sR-hLet7.2- wie nachstehend). Die komplementären RNA-Regionen sind in Großbuchstaben dargestellt, während die Schleifenregion und 3'-Uridine in kleinen Buchstaben dargestellt sind. Die Schleifenregion ist zudem unterstrichen.

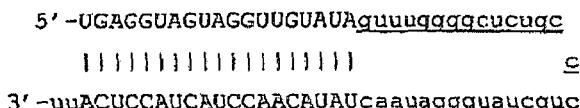
**[0165]** Lineare Darstellung einer chimären RNA (SEQ ID NR: 15):

5' -

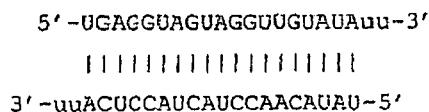
UGAGGUAGUAGGUUGUUAAguuuggggcucugcccugcuaugggauaacUAUACAAACC  
UACUACCUCAuu - 3'

während einer Hybridisierungsreaktion hybridisieren die komplementären Regionen des obigen chimären RNA-Moleküls und bilden eine Stamm-Schleife, wie nachstehend gezeigt. Ein siRNA Molekül ist zum Vergleich gezeigt.

**[0166]** Stamm-Schleife Struktur von chimärer RNA:



siRNA:



**[0167]** Zusätzlich können chimäre RNAs mit 5'- und 3'-Extensionen erzeugt werden. Die Sequenz der 5'- und 3'-Extensionen basiert auf der angrenzenden let-7L-RNA-Sequenz:

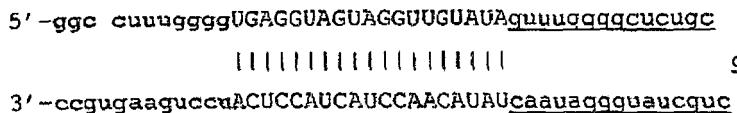
5' -Terminus: 5' -GCCUUJUGGGG.. (SEQ ID NR: 16)

3' -Terminus: ..CCGUGAAGUCCU-3' (SEQ ID NR: 17)

**[0168]** Diese Extensionssequenzen unterscheiden sich von den von Hutvagner et al. (2001) Science 293: 834–838 beschriebenen Extensionen durch eine Base, um die Transkriptionseffizienz der T7-RNA-Polymerase zu erhöhen.

**[0169]** Ein chimäres RNA-Molekül mit 5'- und 3'-Exten-sionen ist nachstehend gezeigt. Die 5'- und 3'-Exten-sionen sind fettgedruckt.

**[0170]** Stamm-Schleife-Struktur von chimärer RNA mit 3'- und 5'-Extensionen (SEQ ID NR: 18):



**[0171]** Die Synthese chimärer let-7-siRNAs kann durch Invitro-Transkription der chimären RNA unter Verwendung von T7-RNA-Polymerase erzielt werden, wie nachstehend beschrieben. Die Matrize für die Polymerase ist in pUC19 klonierte DNA.

#### A. Co-Transfektion der pGL3-Reporterkonstrukte mit siRNA oder chimären RNAs

**[0172]** Ebenso wie im vorhergehenden Beispiel werden im Beispiel 2 Zellen mit einem Gemisch von DNA und RNA transfiziert. Die RNA-Komponente enthält Proben mit Schleife-RNA-Versionen. Das DNA/RNA-Gemisch besteht aus folgenden Komponenten:

1. DNA-Reporterkonstrukt auf Basis von Luciferase
  - a. pGL3-control oder
  - b. pGL3-tLet-7F oder
  - c. pGL3-tLet-7R
2. Interne Kontrolle zur Normalisierung
  - a. pRL-TK
3. Hybridisierte RNA
  - a. siRNA-GL2.1-Duplex, gegen GL2 gerichtete siRNA (kleiner RNA-Duplex mit Überhängen) oder
  - b. siRNA-GL3.1-Duplex, gegen GL3 gerichtete siRNA (kleiner RNA-Duplex mit Überhängen) oder
  - c. hybridisierte Schleife-RNA-GL3.2, siRNA mit einer gegen GL3 gerichteten Verbindungsschleife oder
  - d. siRNA-Let7.1-Duplex, gegen Let-7-Sequenzen gerichtete siRNA (kleiner RNA-Duplex mit Überhängen) oder
  - e. hybridisierte Schleife-RNA-Let-7.2, siRNA mit einer gegen Let-7-Sequenzen gerichteten Verbindungs-schleife

**[0173]** Die Reporterkonstrukte auf Basis von Luciferase und die RNAs sind in **Fig. 8** schematisch dargestellt. **Fig. 9** zeigt die Hinunterregulation der Reporter, die die Zielsequenzen enthalten, die den Sequenzen der co-transfizierten RNAs entsprechen. Wie im Beispiel 1 gezeigt, verursacht wiederum die siRNA GL3.1 eine spezi-

fische Verringerung der Expressionsspiegel aller Reporter, da sie sämtlich die Zielsequenz tragen. Die siRNA Let-7.1 zeigt nur Repression der Reporter pGL3-tLet7F und pGL3-tLet7R, aber nicht von pGL3-control. Das Kontrolle siRNA GL2.1 zeigt keine signifikante Repression eines Reporterkonstrukts. Die chimären RNA-Versionen mit der Verbindungsschleife zwischen den Duplex-Regionen, Schleife-RNA-GL3.2 und Schleife-RNA-Let7.2, zeigen die gleiche sequenzspezifische Verringe-rung der Reporter wie die entsprechenden siRNAs, die aus den unabhängigen RNA-Strängen bestehen, die siRNAs GL3.1 bzw. Let-7.1. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die RNAs, in denen beide Stränge mit einer Schleife verbunden sind, genauso gut funktionieren wie die siRNA, die aus zwei unabhängigen Strängen besteht.

#### B. Erzeugung von DNA-Fragmenten, die chimäre RNA-Moleküle codieren

**[0174]** Die Matrize für RNA-Polymerase ist doppelsträngige DNA. Die DNA-Matrize wird mittels PCR unter Verwendung überlappender Oligos erzeugt, die an ihren 3'-Enden komplementär sind. Die Oligos sind nachstehend dargestellt.

Oligonukleotide:

T7-pre-hLet7L.3-F (SEQ ID NR: 19):

5' -CCGAAGCTTA ATACGACTCA CTATAGGCCT TTGGGGTGAG GTAGTAGGTT  
GTATAGTTG GGGCTCTGCC CTGCTATG-3'

Pre-hLet7L.3-R (SEQ ID NR: 20):

5' -CGCATGAATT CGCCGGCACT TCAGGTGAG GTAGTAGGTT GTATAGTTAT  
CCCATAGCAG GGCAGAG-3'

T7-pre-GL3.3-F (SEQ ID NR: 21):

5' -CCGAAGCTTA ATACGACTCA CTATAGGCCT TTGGGGTCGA AGTACTCAGC  
GTAAGGTTG GGGCTCTGCC CTGCTATG-3'

Pre-GL3.3-R (SEQ ID NR: 22):

5' -CGCATGAATT CGCCGGCACT TCAGGTGAG AGTACTCAGC GTAAGGTTAT  
CCCATAGCAG GGCAGAG-3'

**[0175]** Die Oligonukleotidpaare (T7-pre-hLet7L.3-F mit PrehLet7L.3-R; T7-pre-GL3.3-F mit Pre-GL3.3-R) werden in einem Molverhältnis von 1:1 zu 40 µM in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,9, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl gemischt. Das Gemisch wird für 5 Minuten bei 95°C, drei Minuten bei 65°C inkubiert, und man lässt die 3'-Enden hybridisieren, indem man langsam (30 min) die Temperatur auf 20°C verringert. In dem nachstehenden Schema sind die Vorwärts-(F)-Oligos in Großbuchstaben und die Rückwärts-(R)-Oligos in kleinen Buchstaben dargestellt.

Hybridisierte Pre-hLet7L.3-Oligos:

5'-.GTATAGTTG GGGCTCTGCC CTGCTATG-3' (SEQ ID NR: 76)

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

(SEQ ID NR: 77) 3'-gagacgg gacgataccc tattgatatg..-5'

Hybridisierte Pre-GL3.3-Oligos:

5'-.GTAAGGTTG GGGCTCTGCC CTGCTATG-3' (SEQ ID NR: 78)

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

SEQ ID NR: 79) 3'-gagacgg gacgataccc tattggaatg..-5'

**[0176]** Von den hybridisierten Oligos werden 2 µl im Extensionsgemisch (40 µl Endvolumen), das aus 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 7,5 mM Dithiothreitol, 33 µM jedes dNTP, 20 U DNA-Polymerase I, großes (Klenow-)Fragment, besteht, für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Extension der hybridisierten Pre-hLet7L.3-Oligos:

```
5'~...GTATAGTTG GGGCTCTGCC CTGCTATGGG ATAA-->
      ||||| | | | | |
<--ac cccgagacgg gacgataccc tattgatatg..-5'
```

Extension der hybridisierten Pre-GL3.3-Oligos:

```
5'~...GTAAGGTTG GGGCTCTGCC CTGCTATGGG ATAA-->
      ||||| | | | | |
<--ac cccgagacgg gacgataccc tattggaatg..-5'
```

**[0177]** Die durch die Extension der Oligos erzeugten DNA-Fragmente sind nachstehend in ihrer Gänze dargestellt. Die Sequenzen sind als doppelsträngige DNA angegeben; der obere Strang (Großbuchstaben) 5' nach 3'; der untere Strang (kleine Buchstaben) 3' nach 5'. T7-Promotor (nts 9–26); Klonierungsstellen: Hind III-Stelle (nts 4–9); EcoR I-Stelle (nts 119–124); Restriktionsstelle für Linearisierung Cac8I oder Nae I (nts 113–118).

Pre-hLet7L.3:

```
1 5'-CCGAAGCTTA ATACGACTCA CTATAGGCCT TTGGGGTCAA AGTAGTAGGTT GTATAGTTG
 3'-ggcttcgaat tatgctgagt gatatccggaa aaccccaactc catcatccaa cattatcaaacc

61 GGGCTCTGCC CTGCTATGGG ATAACTATAC AACCTACTAC CTCACCTGAA GTGCCGGCGA
  cccgagacgg gacgataccc tattgatatg ttggatgtg gagtgactt cacggccgct

121 ATTCAATGCG-3' (SEQ ID NR: 23)
  taagtacgc-5' (SEQ ID NR: 24)
```

Pre-GL3.3:

```
1 5'-CCGAAGCTTA ATACGACTCA CTATAGGCCT TTGGGGTCAA AGTAGTAGGTT GTAAGGTTG
 3'-ggcttcgaat tatgctgagt gatatccggaa aaccccaagct tcattgatcg cattccaaac

61 GGGCTCTGCC CTGCTATGGG ATAACTATAC CCTGAGTACT TCGACCTGAA GTGCCGGCGA
  cccgagacgg gacgataccc tattggaatg tcatctatga agctggactt cacggccgct

121 ATTCAATGCG-3' (SEQ ID NR: 25)
  taagtacgc-5' (SEQ ID NR: 26)
```

### C. Klonierung von DNA-Fragmenten in pUC19

**[0178]** Die PCR-Produkte werden mit Hind III und EcoR I gespalten und in pUC19, das mit den gleichen Enzymen gespalten wurden, unter Verwendung veröffentlichter Verfahren (Sambrook et al.) kloniert.

### D. In-vitro-Transkription unter Verwendung von T7-RNA-Polymerase

**[0179]** Die Matrizen werden mit Cac8I oder Nae I linearisiert und zur In-vitro-Transkription mit T7-RNA-Polymerase (Promega) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. Anschließend wird die DNA-Matrize mit DNase (Promega) gemäß den Anweisungen des Herstellers entfernt.

**[0180]** Die in vitro synthetisierte RNA wird unter Verwendung des gleichen Hybridisierungsprotokolls, wie für die siRNA-Oligo-Gemische im Beispiel 1, selbst-hybridisiert. Transfektionen werden durchgeführt, wie im Beispiel 1 beschrieben, ausgenommen dass die selbst-hybridisierte RNA die im Beispiel 1 verwendete siRNA ersetzt.

**[0181]** Die linearen Sequenzen der chimären RNAs, die unter Verwendung dieses Verfahrens erzeugt werden, sind nachstehend zusammen mit einer Stamm-Schleife-Darstellung jeder chimären RNA dargestellt. Die Sequenzen in Großbuchstaben sind die Regionen, die zur Basenpaarung innerhalb der RNA fähig sind, eine der Sequenzen kann mit der Zielsequenz hybridisieren; in diesen Fällen der ersten Region in Großbuchstaben.

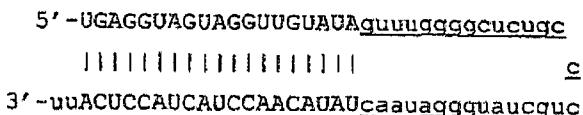
**[0182]** Im folgenden Abschnitt setzen sich die Namen für die RNA-Moleküle wie folgt zusammen: "s" steht für siRNA, "R" steht für RNA und "h" deutet auf eine Humansequenz hin. Wenn Pre im Namen vorhanden ist, zeigt dies, dass die Moleküle 5'- und 3'-Extensionen enthalten.

sR-hLet7.2-as (Schleife-RNA-Let7.2)

**[0183]** Durch die let-7-Schleife verbundene let7-siRNAs ohne 5'- und 3'-Extensionen:

5' -

UGAGGUAGUAGGUUGGUUAAguuuuggggcucugcccugcuaugggauaacUAUACAAACC  
UACUACCUAuu-3' (SEQ ID NR : 27)

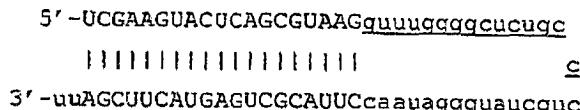


sR-GL3.2-as (Schleife-RNA-GL3.2)

**[0184]** Durch die let-7-Schleife verbundene GL3-siRNAs ohne 5'- und 3'-Extensionen:

5' -

UCGAAGUACUCAGCGUAAGguuuuggggcucugcccugcuaugggauaacCUUACGCUGA  
GUACUUCGAuu-3' (SEQ ID NR: 28)



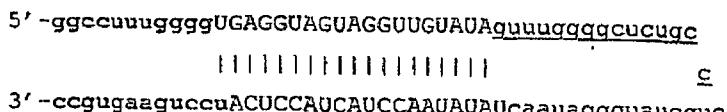
Pre-hLet7L.3

**[0185]** Durch die let-7-Schleife verbundene let-7-siRNAs mit 5'- und 3'-Extensionen:

(SEQ ID NR: 18) :

5' -

ggccuuuggggUGAGGUAGUAGGUUGGUUAAguuuuggggcucugcccugcuaugggaua  
acUAUACAAACCUACUACCUACCUCAuccugaagugcc-3'



PRe-GL3.3

**[0186]** GL3 siRNAs, die über die let-7-Schleife verbunden sind und die 5'- und 3'-Extensionen tragen:  
(SEQ ID NR: 29)

5' -ggccuuuggggUCGAAGUACUCAGCGUAAGGguuuggggcucugcccugcuauggauaa  
cCUUACGGCUGAGUACUU~~CGA~~uccguugaagggcc-3'

**[0187]** Die Sequenzen in Großbuchstaben sind die Bereiche der Komplementarität in dem RNA-Molekül, von denen eine der Sequenzen mit der Zielsequenz Basenpaare bilden kann; in diesen Fällen dem ersten Bereich mit Großbuchstaben.

**[0188]** Die RNAs sR-hLet7.2-as und sR-GL3.2-as werden chemisch synthetisiert und können ebenfalls durch das vorstehende Verfahren erzeugt werden.

#### E. Analyse der funktionellen Verbindungs-Schleifen-Sequenzen.

**[0189]** Die Größe der Wildtyp Let-7 Verbindungsschleife ist 30 Nukleotide (5'-GUUUGGGGCUCUGCCCCUG-CUAUGGGAUAAAC-3' (SEQ ID NR: 75)).

**[0190]** Am besten bevorzugt man die Erzeugung synthetischer Oligos und kloniert sie in einen Expressionsvektor (siehe unten). Die Oligos sind jedoch vorzugsweise nicht zu lang, damit eine effiziente Oligosynthese ermöglicht wird. Man kann die Größe der Führungssequenzen nicht drastisch ändern, die Schleifen-Sequenz ist jedoch 30 nt und kann gekürzt werden (siehe Fig. 10 und Fig. 11). Verschiedene Schleifen-Sequenzen werden ausgewählt auf der Basis der Wildtyp Let-7 Schleifen-Sequenz oder anderer mikroRNA Schleifen-Sequenzen (Lagos-Quintana, M et al. Science (2001) 294: 853, Lau, et al. Science (2001) 294: 858, Lee and Ambros Science (2001) 294: 862.

**[0191]** Die ausgewählten Derivate der Let-7-Schleife beruhen auf der vorhergesagten Sekundärfaltung der Let-7-Schleife. Zwei stabile Strukturen der Let-7-Schleife sind vorhergesagt (siehe SEQ ID NR: 35 bis 41, und 45 unten). Die vorgewölbten 12 Nukleotide und der vorhergesagte GGG/CCC-Stamm in der Schleife sind in der Struktur 2 deletiert, was zu Schleife L12 (SEQ ID NR: 30) (siehe ebenfalls **Fig. 10** und **Fig. 11**) führt. Das Deletieren des UGGG/CCUG-Teils des vorhergesagten Stamms und der vorgewölbten Nukleotide in der Schleife in der Struktur 1 führt zu Schleife 11 (SEQ ID NR: 31).

**[0192]** Die ausgewählten Schleifen der mikroRNAs werden ausgewählt, da sie kürzer sind und sie die gleiche Organisation der 5'-Führungs-Schleife-Basenpaarungssequenz-3' wie die Let-7-RNA aufweisen. Schleifen von mikroRNAs mit der umgekehrten Organisation, 5'-Basenpaarungssequenz-Schleife-Führung-3' können ebenfalls funktionell sein. Im Zusammenhang mit der GL2-Führungssequenz werden Konstrukte mittels PCR, wie oben beschrieben, synthetisiert, und ihre Knock-Down-Edffizienzen auf den GL2-Reporter werden in einem transienten Transfektionsexperiment wie in Beispiel 3 beschrieben gemessen und mit dem Wildtyp Let-7-Schleife verglichen (**Fig. 12**). Alle Schleifen zeigen Knock-Down-Effekte, die für GL2 spezifisch sind, und die den GL3-Reporter nicht beeinflussen. Die Schleifen-Sequenzen von nur 12 Nukleotiden (beispielsweise L12) führen zum spezifischen Knock-Down des GL2-Reporters.

### Beispiel 3: Let-7-Promotor zur Expression

**[0193]** Dieses Beispiel beschreibt ein DNA-Expressionskonstrukt, das siRNA produziert, und die Identifikation und Klonierung des Human-let-7-Promotors und der genomischen Human-let-7-Sequenz in einem DNA-Vektor. Der Let-7-Promotor wird in dem Expressionskonstrukt zur Herstellung von siRNAs verwendet. Wie oben beschrieben können andere Promotoren genauso verwendet werden.

[0194] In diesem Beispiel sind enthalten:

1. Ergebnisse einer DNA-Datenbanksuche mittels let-7-Führungssequenz als Sonde;  
2. Vorhergesagte Sekundärstrukturen der RNAs, transkribiert aus genomischen let-7 Klonen;  
3. Beschreibung der Isolation des Human-let-7-Promotors;  
4. Beschreibung der Isolation des genomischen Human-let-7-Klons; und  
5. Verfahren zur Modifikation der genomischen let-7-Konstrukte.

## A. Klonierung des Let-7-Promotors

**[0195]** Eine DNA-Datenbanksuche mit der let-7-Führungssequenz als Sonde führt zu drei perfekten Übereinstimmungen auf dem Humangenom, auf Chromosom 9, 11 und 22, und zu fünf nahezu perfekten Übereinstimmungen auf den Chromosomen 9, 21, X, 19 und 5 (siehe ebenfalls Pasquinelli et al., (2000) Nature 408: 86–89):

1) >ref|NT\_011523.4|Hs22\_11680 Homo sapiens Chromosom 22

Abfrage: 1 tgagggttagtaggttgtatagt 21 (SEQ ID NR: 32)

Sbjct: 2667925 tgaggtaqtaggttatatagt 2667905

2) >ref|NT\_009215.3|Hs11\_9372 Homo sapiens Chromosom 11

Abfrage: 1 tgagggttagtaggttgtatagt 21 (SEQ ID NR: 32)

Sbjct: 1342370 tqaggttagttaggttgtatagt 1342390

3) >ref|NT\_025808.2|Hs9\_25964 Homo sapiens Chromosom 9

Abfrage: 1 tgaggtagtagttgtatagt 21 (SEQ ID NR: 32)

Sbjct: 77615 tgaggtagtacatgtatagt 77605

4) >ref|NT\_011512.3|Hs21\_11669 Homo sapiens Chromosome 21

Abfrage: 1 tgaggtagtagtgttat 18 (SEQ ID NR: 33)

Digitized by srujanika@gmail.com

5) [View Log](#) 011700-511-V 11056 Name: [John Doe](#), [John Doe](#)

Abfrage: 1 tgaggtagtagttgtatagt

Abfrage: 1 tgaggttagttagttgtatagt 21 (SEQ ID NR: 32)

11111111111111111111

Abfrage: 1 tgaggtagtaggttgt 17 (SEQ ID NR: 34)

1996-1997 学年第一学期 期中考试卷

**[0196]** Alle Stellen sind potentielle Kandidaten für das let-7-Gen. Von diesem Stellen werden die RNA-Strukturen vorhergesagt, die sich zu RNA Duplex-Strukturen ähnlich der let-7-RNA (nachstehend schematisch gezeigt) falten. Zum Vergleich ist in der **Fig.** 2 die potentielle Struktur in die folgenden Segmente unterteilt: 5'-Extensioen, let-7 Antisense, Schleife, let-7 Sense und 3'-Extensioen. Die let-7 Antisense Sequenz ist unterstrichen.

**[0197]** Die folgenden Literaturstellen stellen Computerprogramme zur Vorhersage der Sekundärstruktur der drei vorhergesagten RNAs bereit, die von der vorstehenden menschlichen Chromosomen-DNA transkribiert wurden:

- M. Zuker, D. H. Mathews & D. H. Turner, "Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide", In RNA Biochemistry and Biotechnology (1999) 11–43, J. Barciszewski & B. F. C. Clark, eds, NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, (mfold version 3. 1)
- D. H. Mathews, J. Sabina, M. Zuker & D.
- H. Turner, "Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure", J. Mol. Biol. (1999) 288: 911–940.

**[0198]** Die folgende Vorhersage der Sekundärstruktur ergibt sich aus der Verwendung des mfold Programms Version 3.1 von Zuker und Turner (wobei die let-7-Antisense-Sequenz unterstrichen ist).

1) NT\_011523.4 | Hs22\_11680 Homo sapiens Chromosom 22

**Struktur 1**

Faltungsbasen 1 bis 81

Anfangs-dG = -36.1

SEQ ID NR: 35

10	20	30	
U UG	U GU	-----	U
U GGG GAG AGUAGGUUGUAUAGUU		UGGGGC \	
A CCU UUC UCAUCUAACAUAAUCAA		GUCCCG C	
A^GU - UG	UAGGGUAUC	U	
80 70 60 50 40			

**Struktur 2**

Faltungsbasen 1 bis 81

Anfangs-dG = -34.4

SEQ ID NR: 35

10	20	30	40	
U UG	U GU	UGGGGCUCUG	UG	
U GGG GAG AGUAGGUUGUAUAGUU		CCC	C	
A CCU UUC UCAUCUAACAUAAUCAA		GGG	U	
A GU - UG	UA----- ^ UA			
80 70 60	50			

**[0199]** In Hutvagner et al., (2001) Science 293: 834–838 werden Vorhersagen und die experimentellen Daten für längere Vorstufen (4 zusätzliche Basenpaare an den Enden), die von dieser genomischen Stelle hergeleitet sind, beschrieben.

2) NT\_009215.3|Hs11\_9372 Homo sapiens Chromosom 11

Struktur 1

Faltungsbasen 1 bis 80

Anfangs-dG = -33.7

SEQ ID NR: 36

	10	20	30	40	
U	UU	G U		UAGAAUUAC	AA
CCCAGG	<u>GAG</u>	<u>UAG</u>	<u>AGGUUGGUUAUAGUU</u>		AUC G
GGGUUC	UUC	AUC	UCCGACAUGUCAA		UAG G
-^	CU	G C		-----	AG
80		70	60		50

3) NT\_025808.2|Hs9\_25964 Homo sapiens Chromosom 9

Struktur 1

Faltungsbasen 1 bis 83

Anfangs-dG = -36.6

SEQ ID NR: 37

	10	20	30		
G-	U GU		.-UUA	UC	
UGGGA	<u>GAG</u>	<u>AGUAGGUUGGUUAUAGUU</u>	GGG \		
AUCCU	UUC	UCAUCUAACAUAAUCAA	CCC A		
CA^	- UG		\ ---	AC	
80		70	60	40	
				A--- A	
				CC C	
				GG U	
				UAGA G	
				50	

## Struktur 2

Faltungsbasen 1 bis 83

Anfangs-dG = -35.8

SEQ ID NR: 37

10	20	30	40
G-	U <u>GU</u>	UUAGG ACA	C
UGGGA <u>GAG</u>	AGUAGGUUGUAUAGUU	GUC CCCA	C
AUCCU UUC	UCAUCUAACAUAAUCAA	UAG GGGU	A
CA - UG	----- A--^	C	
80	70	60	50

4) NT\_025808.2|Hs9\_25964 Homo sapiens Chromosom 9, A (302576-302677)

## Struktur 1

Faltungsbasen 1 bis 102

Anfangs-dG = -49.1

SEQ ID NR: 38

10	20	30	40
U   A AGU	-----	UG	
UGCUCU UCAG	<u>GAGGUAGUAGAUUGUAUAGUUGU</u>	GGGGUAG \	
AUGAGG AGUC	UUCCGUUAUCUAACAUAAUCAAUA	UCCCAUU A	
G^ - CC-	GAGGACUUG	UU	
100	90	80	70
		60	50

5) NT\_011512.3|Hs21\_11669 Homo sapiens Chromosom 21:21 D

## Struktur 1

Faltungsbasen 1 bis 92

Anfangs-dG = -42.1

SEQ ID NR: 39

10	20	30	40
A UU G U	UA G UA AC		
GUGUGC UCCGGG <u>GAG UAG AGGUUGUAUGGUU</u>	GA U C \		
CACACG AGGUUC UUC AUC UCCAACAAUGUCAA	UU A G C		
^ - CU G U	-- G GG UC		
90	80	70	60
		50	

5) NT\_011512.3|Hs21\_11669 Homo sapiens Chromosom 21:21 D

## Struktur 1

Faltungsbasen 1 bis 92

Anfangs-dG = -42.1

SEQ ID NR: 39

10	20	30	40	
A	UU	G U	UA	G UA AC
GUGUGC UCCGGG GAG UAG AGGUUGUAUGGUU GA U C \				
CACACG AGGUUC UUC AUC UCCAACAUGUCAA UU A G C				
^ . -	CU	G U	--	G GG UC
90	80	70	60	50

## Struktur 2

Faltungsbasen 1 bis 92

Anfangs-dG = -40.8

SEQ ID NR: 39

10	20	30	40	
A	UU	G U	-----	A UU
GUGUGC UCCGGG GAG UAG AGGUUGUAUGGUU UAG G \				
CACACG AGGUUC UUC AUC UCCAACAUGUCAA GUC C A				
-	CU	G U	UUGAGG^ C AC	
90	80	70	60	50

6) NT\_011799.5|HsX\_11956 Homo sapiens Chromosom X Arbeits-  
Entwurf-Sequenzsegment:X B

## Struktur 1

Faltungsbasen 1 bis 96

Anfangs-dG = -48.0

SEQ ID NR: 40

10	20	30	40	
-	U GU	.-UUA	UC	
GUGCU CUGUGGGA GAG AGUAGAUUGUAUAGUU GGG \				
CAUGG GGCACCCU UUC UCAUCUGACAUUAUCAA CCC A				
^ U	- UG	\ ---	AU	
90	80	70		
		50		
		C UU		
		AUC \		
		UAG G		
		- AG		
		60		

Struktur 2

Faltungsbasen 1 bis 96

Anfangs-dG = -47.5

SEQ ID NR: 40

```

      10      20      30      40
      -      U GU      ---- | UCAU
GUGCU CUGUGGGGA GAG AGUAGAUUGUAUAGU UUUAGGG A
CAUGG GGCACCCU UUC UCAUCUGACAUUAUCA AGGUUCU C
      U      - UG      AUAG ^ ACCC
      90      80      70      60      50
    
```

7) NT\_011091.5|Hs19\_11248 Homo sapiens Chromosom 19; 19 c

Struktur 1

Faltungsbasen 1 bis 122

Anfangs-dG = -65.8

SEQ ID NR: 41

```

      10      20      30      40      50
      | C .-CC CU G      U GGA---- A
CCUGCCG GCCCC GGG GAG UAGGAGGUUGUAUAGU GA GG C
GGCGGGC CGGGG CCC UUC AUCCUCCGGCAUAUCA CU CC A
      ^ C \ -- CU G      - AGAGGAA C
      120     110      80      70      60
      90      100
      AGGCUGCG UG
      CCC \
      GGG C
      CA----- CA
    
```

**[0200]** Durch Einschränken der Länge der Sequenzen, die in Chromosom 19 entdeckt wurden, auf 80 Nukleotide, wird eine vorhergesagte Stamm-Schleife-Struktur ähnlich wie bei den Sequenzen auf den anderen Chromosomen, ausgehend von der 5'-Richtung mit den ersten basenpaarenden Nukleotiden produziert. Der endogene Promotor für let-7 wird mit PCR auf einer genomischen Human-DNA kloniert. Es werden Primer für alle drei genomischen Stellen erarbeitet, die die let-7-Sequenzen flankieren (beispielsweise 5'-TGAGGTAG-TAGGTTGTATAGT-3' SEQ ID NR: 32). Zwei verschiedene Rückwärtsprimer, die 3'- der 3'-let-7-Extensionssequenz hybridisieren, werden verwendet. Zudem werden drei verschiedene Vorwärtsprimer, die 5' der 5'-let-7-Extension hybridisieren, verwendet. Zur Gewährleistung, dass ein vollständig funktioneller, aber dennoch minimaler let-7-Promotor identifiziert wird, hybridisieren die drei Vorwärtsprimer bei verschiedenen Abständen stromaufwärts der let-7-Transkriptionsstartstelle. Die folgenden Beispiele verwenden die Sequenzen, die aus Chromosom 22 hergeleitet sind. Die Sequenzen aus den anderen Chromosomen können entsprechend verwendet werden. Die Primer für Chromosom 22 sind nachstehend aufgeführt.

**[0201]** Oligonukleotide (5' nach 3') zur Lokalisierung

NT\_011523. 4lHs22\_11680 Homo sapiens Chromosom 22:  
 Let7gene22 F1 5' -GCACGTTCTAGAGAATCCCTGTGCCCTGGTG  
 (SEQ ID NR: 42)  
 Let7gene22 F25 ' -GCACGTTCTAGACCGTGAAGCCGCTACTCAGC  
 (SEQ ID NR: 43)  
 Let7gene22 F3 5' -GCACGTTCTAGAGGGTTGACAGTCGTATCTGC  
 (SEQ ID NR: 44)  
 Let7gene22 R15 ' -CCGTGCAAGCTTGTCACTTCTCAGTAG  
 (SEQ ID NR: 45)  
 Let7gene22 R25 ' -CCGTGCAAGCTTCCTGCCACTGAGCTGGCCAG  
 (SEQ ID NR: 46)

**[0202]** Die Sequenzen, die mit den genomischen Regionen übereinstimmen, sind unterstrichen. Die anderen 5'-Sequenzen werden zur Erleichterung der Klonierung hinzugefügt (XbaI-Stelle in den Primern Let7gene22 F1-3, Hind III in den Primern Let7gene22 R1-2).

**[0203]** Verschiedene Primer-Kombinationen werden verwendet, um genomische Fragmente zu erhalten:

Name Fragment	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
Let7gene22A	Let7gene22 F3	Let7gene22 R1
Let7gene22B	Let7gene22 F2	Let7gene22 R1
Let7gene22C	Let7gene22 F1	Let7gene22 R1
Let7gene22D	Let7gene22 F3	Let7gene22 R2
Let7gene22E	Let7gene22 F2	Let7gene22 R2
Let7gene22F	Let7gene22 F1	Let7gene22 R2

**[0204]** Die PCR-Fragmente werden mit den Enzymen Xba I und Hind III gespalten und in die Avr II-Stelle und die Hind III-Stelle von pIPspAdapto-deltaPolyA kloniert, wodurch die CMV-Promotorsequenz ersetzt wird (siehe **Fig. 3**). pIPspAdapto-deltaPolyA wurde folgendermaßen aus pIPspAdapt6 konstruiert. pIPspAdapt6 wurde in dem Methylase-negativen E. coli-Stamm DM1 gezüchtet, um die Methylierung der zweiten Xba-Stelle zu verhindern. Die DNA wurde isoliert und mit XbaI gespalten, wodurch ein 142 bp-Fragment, das das Poly-A-Signal enthielt, ausgeschnitten wurde. Der religierte Vektor wird als pIPspAdapt6deltaPolyA bezeichnet.

**[0205]** Diese Konstrukte mit den genomischen Fragmenten Let7gene22A-F werden in Säugetierzellen (wie in Beispiel 1 beschrieben) transfiziert und auf Expression von let-7-RNA und seine Wirkung auf die Repression von pGL3-tlet7 untersucht. Dies erfolgt auf verschiedene Weise:

Repression der Luciferase-Aktivität aus pGL3-tLet7-F oder pGL3-tLet7-R-Reporter

**[0206]** Die Fragmente Let7gene22a, Let7gene22b und Let7gene22c veranschaulichen verschiedene Längen der genomischen Sequenzen des Let7-Gens auf Chromosomen 22. Diese Fragmente werden in die Plasmide pIPspAdapt6deltaPolyA kloniert. Reporterkonstrukte werden zur Untersuchung der Let-7-Expressionsplasmide Let7gene22A, Let7gene22B, Let7gene22C in einem Experiment ähnlich wie Beispiel 1 verwendet, jedoch mit der folgenden Abwandlung:

Die Expressionsplasmide auf Let-7-Basis ersetzen die RNAs, wie schematisch in der **Fig. 13A–B** veranschaulicht.

**[0207]** Das DNA-Gemisch, bestehend aus den folgenden drei Komponenten, wird in die Wirtszellen transfiziert, (beispielsweise HeLa oder PER.C6/E2A-Zellen):

4. Reporter-Konstrukt aus Luciferase-Basis
- a. pGL3-control (Promega), oder
- b. pGL3-tLet-7F, oder
- c. pGL3-tLet-7R

5. Interne Kontrolle zur Normalisierung
  - a. pRL-TK(Promega; Zug.-Nummer AF025846)
6. Expressionskonstrukte auf der Basis von Let-7
  - a. pIPspAdapt-Let-7gene A (mit dem Fragment Let7gene22A), oder
  - b. pIPspAdapt-Let-7gene B (mit dem Fragment Let7gene22B), oder
  - c. pIPspAdapt-Let-7gene C (mit dem Fragment Let7gene22C)

Tag 1:

**[0208]** HeLa- oder PER.C6/E2A-Zellen werden 20 Std. vor der Transfektion in einem Format mit 96 Vertiefungen bei  $4,5 \times 10^4$  Zellen pro 100  $\mu\text{l}$  Medium (DMEM + 10% hitzeinaktiviertem fötalen Rinderserumalbumin für HeLa-Zellen; DMEM + 10% nicht-hitzeinaktiviertem fötalen Rinderserumalbumin für PER.C6/E2A Zellen)/Vertiefung angeimpft.

Tag 2:

**[0209]** Die Behandlung pro Vertiefung ist: DNA-Gemische werden hergestellt in 25  $\mu\text{l}$  (Gesamtvolumen) OptiMEM mit:

1. 200 ng pGL3-control oder
- 200 ng pGL3-tLet-7F, oder
- 200 ng pGL3-tLet-7R
2. 20 ng pRL-TK
3. 100 ng Expressionskonstrukt auf Let-7-Basis, pIPspAdapt-Let-7geneA, oder pIPspAdapt-Let-7geneB, oder pIPspAdapt-Let-7geneC.

**[0210]** LipofectAMINE2000 (0,8  $\mu\text{l}$ ) und OptiMEM (24,2  $\mu\text{l}$ ) werden für 7 bis 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und zu jedem DNA-Gemisch gegeben. Dieses Gemisch (Endvolumen 50  $\mu\text{l}$ ) wird für 15 bis 25 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zu den Zellen gegeben, aus denen das Medium entfernt wurde. Die Zellen werden 48 Std. in einem 37°C-(HeLa) oder 39°C (Per.C6/E2A)-Inkubator unter 10% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Tag 4:

**[0211]** Die Zellen werden geerntet, lysiert und Glühwürmchen-Luciferase und Renilla-Luciferase-Aktivitäten werden mit dem Dual-Luciferase-Kit (Promega) gemäß den Anweisungen des Herstellers gemessen. Der absolute Glühwürmchen-Luciferase-Wert für jede Probe wird durch seinen internen absoluten Renilla-Luciferase-Wert dividiert, so dass man den relativen luc/ren-Wert erhält. Diese relativen luc/ren-Werte werden mit der Kontrollprobe verglichen, wobei kein oder nicht-verwandtes Plasmid verwendet wird.

**[0212]** Die Ergebnisse der transienten Transfektion an PER.C6/E2A-Zellen sind in der **Fig. 14** gezeigt.

**[0213]** Die Cotransfektion der Reporterkonstrukte und Let-7-Expressionskonstrukte (pIPspAdapt-Let-7gene A-C) zeigen die Aktivität der Let-7-Expressionskonstrukte auf dem Reporterkonstrukt, das die Let-7-Zielsequenz in der F-Orientierung enthält; pGL3-tLet-7-F. Das pGL3-tLet-7-R zeigt keinen Knock-Down, möglicherweise aufgrund einer asymmetrischen Prozessierung der Let-7-RNA. Der pGL3-Reporter, dem die Let-7-Zielsequenz fehlt, ist nicht betroffen. Der kleinste Bereich (338 bps), Let-7 gene-C, reicht aus, damit eine Knock-Down-Aktivität wie in diesem Experiment gezeigt, vorliegt.

#### Reduktion der Luciferase-Mengen

**[0214]** Das Verfahren ist das Gleiche wie in Beispiel 1 gezeigt, mit dem Hauptunterschied, dass siRNA-Let7.1 durch die Plasmidkonstrukte ersetzt wird, die Let7gene22A-F enthalten. Die mRNA-Mengen der GL3-Luciferase werden auf sequenzspezifischen Abbau mittels Taqman-PCR (PE Applied Biosystems) gemäß den Anweisungen des Herstellers gemessen. RNA wird mittels TRIzol-Reagenz (Life Technologies) gemäß dem Protokoll des Herstellers isoliert, gefolgt von DNase-Behandlung mittels 0,1 U/ $\mu\text{l}$  RQ1 RNase (DNase-frei; Promega) für 20 min bei 37°C. Eine Einzelröhrenreaktion erfolgt für die cDNA-Synthese und die anschließende Taqman-PCR-Reaktion mit 100 ng Gesamt-RNA an einem Gesamtvolumen von 25  $\mu\text{l}$ , bestehend aus 1x TaqMan-Puffer A (PE Applied Biosystems), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 300  $\mu\text{M}$  Gesamt-dNTPs, 300 nM luc-1-For, 300 nM luc-1-Rev, 150 nm luc-1-probe, 0,025 U/ $\mu\text{l}$  AmpliTaq Gold, 0,1 U/ $\mu\text{l}$  RNase-Inhibitor und 0,25 U/ $\mu\text{l}$  Multiscribe Reverse Transkriptase. Die Taqman-Analyse erfolgt auf einem ABI-Prism 7700 Sequenzdetektor-Gerät.

**[0215]** Die bei dieser Analyse verwendete Primer und die Sondenkombination sind wie folgt:

Primers:

luc-1-For 5' AAGCGACCAACGCCTTGAT 3' (SEQ ID NR: 47)  
 luc-1-Rev 5' TTTCGTCTTCGTCCCAGTAAGC 3' (SEQ ID NR: 48)

TaqMan-Sonde (5' FAM Reporter-Farbstoff; 3' TAMRA):

luc-1-Sonde 5' ATGTCTCCAGAATGTAGCCATCCATCCTTG 3' (SEQ ID NR: 49)

**[0216]** Die Reaktion erfolgt mit dem folgenden Programm: 30 min bei 48°C, 10 min bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen [15 sec 95°C, 1 min 60°C].

1) Expression von let-7-RNA

**[0217]** Die Plasmid-Konstrukte, die Let7gene22A-F enthalten, werden in Säugetierzellen transfiziert und zur RNA-Isolation geerntet. Die RNA wird durch Northern-Blotting auf let-7-RNA-Expression analysiert, wie in Pasquinelli et al. (2000) Nature 408: 86–89.

B. Reprogrammieren der Let-7-DNA auf eine andere Zielsequenz.

**[0218]** Der Begriff "Reprogrammieren" betrifft den Austausch der let-7-Führungssequenzen gegen Führungssequenzen auf der Basis von einigen anderen RNA-Sequenzen. In diesem Beispiel wird die GL3-Sequenz verwendet. Die reprogrammierten Konstrukte werden durch Entfernen der let-7-Führungssequenz und ihres Komplements und Ersetzen durch die GL3-Führungssequenz und ihres Komplements hergestellt. Eine solche reprogrammierte chimäre RNA zielt auf RNA, welche die GL3-Zielsequenz enthält, im Gegensatz zu RNAs, die die let-7-Zielsequenz enthalten. Diese Konstrukte beruhen auf den Plasmiden, die die let7gene22A-F-Fragmente enthalten.

**[0219]** Die neue Führungssequenz und eine Sequenz, die mit der Führungssequenz basenpaaren kann, werden mittels PCR in die Konstrukte eingebracht. Für die genomische let-7-Stelle auf dem Chromosom 22 wird beispielsweise eine GL3-Sequenz eingebracht; zwei Primer, bestehend aus einem Vorwärts-(Let-7.N19-F4) und Rückwärtsprimer (Let-7.N19-R4), werden antiparallel ausgearbeitet und zeigen voneinander weg, wobei jeder Primer let-7-Sequenzen an seinem 3'-Ende, die neue Zielsequenz im Inneren (N19) und let-7-Schleifen-Sequenzen an seinem 5'-Ende aufweist. Die 5'-Sequenzen der Primer sind über 14 Basen komplementär.

Let-7.N19-F4:

5' -TCTGCCCTGC      TATGGGATAAA      C      nnnnnnnnnnnnnnnnn  
 TCCTGAAGTG GCTGTA-3' (SEQ ID NR: 50)

Let-7.N19-R4:

5' -CATAGCAGGG      CAGAGCCCCA      AAC      nnnnnnnnnnnnnnnnn  
 CCCCAAAGGG CAGT-3' (SEQ ID NR: 51)

N19 ist die interessierende Zielsequenz; für GL3 ist N19:

5' -CTTACGCTGAGTACTTCGA-3'. (SEQ ID NR: 9)

**[0220]** Das Verfahren zum Ersetzen der Führungssequenz der genetischen let-7-Klonen ist in der **Fig. 4** gezeigt. Diese Primer werden in gesonderten PCR-Reaktionen an den Plasmid-Konstrukten verwendet, die die Let7gene22A-F-DNA enthalten. Der Primer Let-7.N19-R4 wird in Kombination mit einem Vorwärtsprimer verwendet, beispielsweise Let7gene22 F1-3. Der Primer Let7.N19-F4 wird in Kombination mit einem Rückwärtsprimer verwendet, beispielsweise Let7-gene22 R1-2. Das Gemisch der beiden so erhaltenen PCR-Produkte wird als Matrize in einer nachfolgenden PCR-Reaktion mit den Außenprimern Let7gene22 F1-3 und Let7gene

22 R1-2 verwendet. Die aus diesem Schritt erhaltenen PCR-Produkte werden in pIPspAdapto-deltaPolyA mit der gleichen Strategie wie für die Let7gene22A-F-Fragmente beschrieben kloniert.

**[0221]** Die Expression dieser chimären let-7 RNA mit neuer Führungssequenz wird durch die drei Verfahren analysiert, die vorstehend für die let-7-DNA selbst beschrieben werden.

1. Repression der Luciferase-Aktivität der pGL3-control-, oder pGL3-tlet7-R-Reporter-Konstrukte
2. Reduktion der Luciferase-mRNA-Mengen.
3. Expression der chimären let-7-RNA mit neuer Zielsequenz.
4. In diesem Beispiel werden neue Führungssequenzen und Sequenzen, die mit den Führungssequenzen Basenpaare bilden können, in das Konstrukt pIPspAdapt-Let-7gene C mittels PCR mit einer ähnlichen Strategie eingeführt, wie in Beispiel 3A beschrieben.

**[0222]** Die neuen N19-Führungssequenzen sind:

Let-7-100%, 5' - TATACAACCTACTACCTCA-3' (SEQ ID NR: 52)

GL3, 5' - CTTACGCTGAGTACTTCGA-3'; (SEQ ID NR: 9)

GL2, 5' - CGTACGCGGAATACTTCGA-3'; (SEQ ID NR: 6) und

EGFP, 5' - GCTGACCCTGAAGTTCATC-3'; (SEQ ID NR: 53)

**[0223]** Die erzeugten Klone haben die gleichen Namen: Plasmid\_Name – Promotor\_Name-Führungssequenz, beispielsweise, pIPspAdapt-Let-7-gLet7-100%, pIPspAdapt-Let-7-gGL3, pIPspAdapt-Let-7-gGL2, bzw. pIPspAdapt-Let-7-gEGFP. Das 'g' vor der Führungssequenz wird zur Unterscheidung der Promotorsequenzen (beispielsweise let-7) von den Führungssequenzen (beispielsweise gLet-7) eingebracht.

**[0224]** Die Let-7-Ziel- und Führungssequenzen werden in dem Klon pIPspAdapt-Let-7-gLet7-100% zu 100% komplementär gemacht, damit eine vollständige Basenpaarung in diesem Bereich in der RNA ermöglicht wird. Die natürliche let-7-RNA ist nicht 100% komplementär in diesem Bereich; sie enthält 2 nicht-kanonische Basenpaare (G-U-Basenpaare) und ein vorgewölbtes U.

**[0225]** Die Aktivität der Klone wird wie oben beschrieben in dem Luciferase-Reporter-Test untersucht, wobei Reporterkonstrukte auf Luciferase-Basis (pGL3-control oder pGL3-t-Let-7F oder pGL3-tLetF oder pGL3-tLet-7R oder pGL2) verwendet werden. Eine schematische Darstellung der in diesem Experiment verwendeten Komponenten ist in der **Fig. 15** angegeben. Die Ergebnisse sind in der **Fig. 16** gezeigt. Die Reduktion der Luciferase-Reporter-Mengen werden nur in den Reportern beobachtet, die die mutmaßlichen Zielsequenzen enthalten, d. h. Plasmid pIPspAdapt-Let-7-gLet-7-100% zeigt eine Reduktion von pGL3-tLet-7-F, Plasmid pIPspAdapt-Let-7-gGL3 zeigt eine Reduktion von allen drei Reportern mit der GL3 Zielsequenz (pGL3-control, pGL3-tLet-7F, pGL3-tLet-7R), Plasmid pIPspAdapt-Let-7-gGL2 zeigt eine Reduktion nur von dem pGL2 Reporter. Es wurden keine nichtspezifischen Effekte beobachtet, was ebenfalls durch das Plasmid pIPspAdapt-Let-7-gEGFP bestätigt wurde, das die Expression von keinem der Reporter reprimierte.

#### C. RNA-Expression der Expressionskonstrukte durch Northern-Analyse

**[0226]** Zum Nachweis, dass die RNA aus den DNA-Expressionskonstrukten transkribiert wird, erfolgt die Expressionsanalyse mittels Northern-Blotting.

**[0227]** Die Zellen werden mit den chimären Expressions-DNA-Konstrukten transfiziert und durch Northern-Blotting, wie beispielsweise folgendermaßen, analysiert:

Tag 1:

**[0228]** HeLa, U20S, Per.C6/E2A-Zellen werden 24 Std. vor der Transfektion in einem Format mit 6 Vertiefungen bei  $30 \times 10^4$  Zellen in 2 ml Medium pro Vertiefung überimpft. Für Infektionsexperimente wurden  $15 \times 10^4$  Zellen in 2 ml Medium pro Vertiefung verwendet. (DMEM + 10% hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum für HeLa-Zellen und U20S-Zellen; DMEM + 10% nicht-hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum + 10 mM MgCl<sub>2</sub> für PER.C6/E2A Zellen)/Vertiefung.

Tag 2:

**[0229]** Pro Vertiefung werden DNA-Gemische in 250 µl (Gesamtvolumen) OptiMEM hergestellt mit: 3 µg pro Vertiefung in einer Platte mit 6 Vertiefungen des Expressionskonstruktes auf Let-7-Basis.

**[0230]** LipofectAMIN2000 (4 µl) und OptimEM (246 µl) werden für 7 bis 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und zu jedem DNA-Gemisch gegeben. Dieses Gemisch (Endvolumen 500 µl/Vertiefung) wird für 15 bis 25 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zu den Zellen gegeben. Die Zellen werden für 24, 48 oder 72 Std. in einem 37°C-Inkubator unter 10% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Tag 3 und/oder 4 und/oder 5:

**[0231]** Die Zellen werden mittels TriZol (Invitrogen) gemäß den Herstellerangaben geerntet. Kurz gesagt werden die Zellen mit 1 bis 2 ml PBS gewaschen und in 1 ml TriZol lysiert. Proben der 6 Vertiefungen werden vereinigt, und Glycogen wird zu 50 µg/ml zugegeben. Chloroform wird zugegeben (0,2 ml pro ml verwendetem TriZol). Die Proben werden im Vortexer aufgewirbelt, für 5 min inkubiert, bei 9300 g für 15 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wird in ein frisches Röhrchen überführt. Isopropanol (0,5 ml pro ml TriZol) wird zugegeben und bei 7500 g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wird mit 80% Ethanol gewaschen, und in RNase-freiem Wasser gelöst. Die Konzentration der RNA-Proben wird durch UV-Absorption (A260) oder durch RiboGreen(Molecular Probes)-Messung gemäß den Herstellerangaben bestimmt.

**[0232]** Von jeder Probe wurde 0,5–15 µg RNA zur Gelanalyse hergestellt. Die RNAs werden mit dem denaturierenden Ladungsfarbstoff (TEE Harnstoff-Probenpuffer; Biorad) gemischt und durch Erhitzen für 3 min bei 90°C direkt vor der Beladung auf das 15% Polyacrylamid 1x TBE-Gel (Biorad) denaturiert. Die Gelektrophorese erfolgt für 50 min bei 200 V. Das Gel wird auf Hybond N+-Filter (Amersham) mit dem Transblot semi-dry Electroblotter (Biorad) für 30 min bei 0,2 A/blot mit einem Maximum von 25 V geblottet. Der geblottete Filter wird mit einer Sonde mittels Rapid Hyb-Lösung (Amersham) gemäß den Herstellerangaben hybridisiert. Die Sonden werden durch 5'-Endmarkierung mittels Standard-Verfahren mit [<sup>32</sup>P]γ-ATP der Oligonukleotide, die komplementär zu den Führungssequenz sind, hergestellt.

**[0233]** In der **Fig. 17** ist die Expression der RNA-Spezies, hergeleitet vom Konstrukt pIPspAdapt-Let-7-gGL3 gezeigt. Northern-Blots der RNA-Präparate von PER.C6.E2A-Zellen, die mit Expressionskonstrukten auf Let-7-Basis transfiziert sind, werden mit einer 32P-endmarkierten Sonde hybridisiert, die die GL3-Führungssequenzen (GL3-Sondensequenz: 5'-CTTACGCTGAGTACTCGA-3' SEQ ID NR: 9) erkennt. Die prozessierte RNA-Spezies wandert mit dem synthetischen GL3-siRNA-Duplex (21 nts), der als Größenmarker aufgetragen wurde. Es wurde kein Signal in den Kontrollproben mit unverwandten Sequenzen erfasst.

**[0234]** Ähnliche Expressionsuntersuchungen wurden für eine Anzahl anderer Konstrukte auf Let-7-Basis mit verschiedenen Führungssequenzen und ihren Basenpaarungs-Sequenzen durchgeführt. Die Zielsequenzen dieser Konstrukte werden gegen verschiedene Ziele entwickelt und sind identisch zu den Sequenzen der Oligonukleotide, die bei den Hybridisierungen verwendet werden. Die Zielsequenzen sind aufgeführt:

PPAR gamma (Zug.-Nummer NM\_005037; nts 173-191;  
5' -CAGATCCAGTGTTGCAGA-3', SEQ ID NR: 54)  
IGF2R (Zug.-Nummer NM\_000876, nts 510-528;  
5'-GGAGGTGCCATGCTATGTG-SEQ ID NR: 55)

**[0235]** Die **Fig. 18** zeigt, dass die Expressionsplasmide, die andere Sequenzen als let-7 oder GL-3 enthalten, auch chimäre RNA-Moleküle mit der korrekten Länge und der erwarteten Sequenz exprimieren.

#### Beispiel 4: RNA-Polymerase III Expression auf Promotorbasis

**[0236]** In den bisher erörterten Beispielen hängt die Expression der chimären RNAs von der Aktivität des let-7-Promotors ab. In diesem Beispiel wird der let-7-Promotor durch einen heterologen Promotor ersetzt, der für die Expression der chimären RNA verwendet werden soll. Der bevorzugte Promotor ist überall aktiv. Dieses Beispiel beschreibt die Klonierung der Konstrukte von Beispiel 3 in einen Vektor, der einen überall aktiven Promotor enthält, insbesondere einen Promotor, der durch RNA-Polymerase III erkannt wird (Pol-III-Promotor).

**[0237]** In Eukaryoten produzieren Pol-III-Promotoren endogen verschiedene kleine strukturierte RNAs, beispielsweise 5S-rRNA, tRNAs, VA RNAs, Alu RNAs, H1, und kleine nukleäre U6-RNA. Andere geeignete Promotoren, die ebenfalls verwendet werden können, umfassen CMV, RSV, MMLV, tet-induzierbare und IPTG-induzierbare Promotoren. Die Pol-III-Promotoren werden häufig zur Expression der therapeutischen Antisense-RNAs oder Ribozym-RNAs ausgewählt (Medina und Joshi (1999)). Die polIII-Promotoren von Medina und Joshi werden zur Bestimmung des geeigneten Promoters zur Transkription der siRNAs, stRNAs und chimären RNAs verwendet.

**[0238]** Dieser Ansatz wird zur Expression von siRNA, stRNAs und chimären RNAs mittels Expressionskonstrukten auf der Basis von Pol III-Promotoren verwendet. Ein Beispiel für diesen Ansatz ist eine Fusion einer siRNA an das 3'-Ende einer tRNA, die von einem PolIII-Promotor transkribiert wird. Die siRNA besteht entweder aus einer stRNA-Sequenz oder einer chimären RNA, die aus einer Führungssequenz besteht, die über eine Schleifen-Struktur mit der komplementären Führungssequenz verbunden ist. Die relative Reihenfolge von Führungssequenz und komplementärer Führungssequenz kann umgekehrt werden. Die Schleifen-Struktur kann auch von der let-7-Schleife hergeleitet werden, die von *C. elegans*, *Drosophila* oder von menschlichem Ursprung hergeleitet ist, wie man es auf den Chromosomen 9, 11 und 22 vorfindet.

**[0239]** Das chimäre RNA-Molekül wird von der endogenen Zellprozessierungsmaschinerie prozessiert; beispielsweise wird eine siRNA-Einheit, die an dem 3'-Ende einer tRNA fusioniert ist, von endogenen Molekülen prozessiert, einschließlich der tRNA-3'-Prozessierungs-Endoribonuklease, wodurch die siRNA-Einheit freigesetzt wird. Die Spaltstelle kann ebenfalls künstlich eingebracht werden, beispielsweise eine Ribozym-Zielsequenz in Kombination mit der Einbringung des mutmaßlichen Ribozyms.

**[0240]** Die Aktivität des Promoters wird künstlich angepasst, so dass ein induzierbares PolIII-Expressionssystem erhalten wird. Beispielsweise wie in Meissner et al., (2001) Nuc. Acids Res 29: 1672–1682 beschrieben.

**[0241]** Der Let-7-Promotor wird durch einen RNA-Polymerase III-Promotor ersetzt. Beispielsweise wird der Let-7-Promotor durch Elemente des Human-U6-snRNA-Promotors ersetzt (**Fig. 19**). Für eine effiziente Promotor-Aktivität ist das erste Nukleotid des Transkripts ein G und das Transkriptionsterminationssignal ist eine Folge von 5 oder mehreren Ts. Die exprimierte RNA enthält eine Führungssequenz von 19–21 nts (gegen ein Ziel gerichtet), und eine Sequenz, die mit der Führungssequenz basenpaaren kann, die mit einer Schleifen-Sequenz verbunden ist.

**[0242]** Das genomische Human-U6-Gen (Zugriffs-Nummer M14486) wird über eine Strategie auf PCR-Basis mittels genomicscher Human-DNA kloniert. Die zu klonierende Region startet bei Nukleotid –265 stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle bis zu Nukleotid +198 stromabwärts der Transkriptionsstartstelle. Die verwendeten Primer sind:

hU6 (-265)-F1-XbaI

5' -GcacgTTCTAGAAGGTGGGCAGGAAGAGGGCCT-3' (SEQ ID NR: 56)

hU6 (+198)-R1-HindIII

5' -ccgtgcAAGCTTGGTAAACCGTGACCGCGTA-3' (SEQ ID NR: 57)

**[0243]** Das PCR-Produkt wird in die XbaI- und HindIII-Stellen des pIPspAdapto-deltaPolyA in einer ähnlichen Strategie wie für die Klonierung des Let-7-Gens beschrieben kloniert (siehe Beispiel 3).

**[0244]** Ausgehend von diesem Klon wird die transkribierte U6-snRNA-Sequenz von nt +2 bis zu nt +102 durch eine RNA-Sequenz ersetzt, die die Zielsequenzen herunterregulieren kann. Diese RNA-Sequenzen enthalten vorzugsweise eine Führungssequenz, Verbindungs-Schleife und eine Sequenz, die mit der Führungssequenz basenpaaren kann, wobei eine ähnliche Zusammenbau-PCR-Strategie eingesetzt wird wie zum Ersetzen der Führungs/Zielsequenzen der Let-7-Gene (siehe Beispiel 3 oben). Das erste 5'-G-Nukleotid und das 3'-Terminationssignal UUUUU werden intakt gehalten.

**[0245]** Als Beispiel wird die gegen die pGL3-tLet-7-Reporter gerichtete Zielsequenz verwendet. Die für den Promotor auf Let-7-Basis (TGAGGTAGTAGGTTGTATA, SEQ ID NO: 58) beschriebene Führungssequenz ist um 1 Nukleotid zur Führungssequenz für den Promotor auf U6-Basis (GAGGTAGTAGGTTGTATAG; SEQ ID NR: 59) verschoben, damit ein G-Nukleotid an der Position 1 im U6-Zusammenhang erhalten wird. Die

Transkription ist viel effizienter, wenn das Ausgangsnukleotid ein G ist. Die verwendete Führungssequenz ist zur Zielsequenz vollständig komplementär.

Expressionsplasmid:

**[0246]** pIPspAdapt-U6(+1)-L12-glet7 ist ein pIPspAdapt Plasmid mit einem U6(+1) Promotor, gefolgt von einer let7 Führungssequenz und mit der L12 Schleifen-Sequenz (SEQ ID NR: 30).

**[0247]** Die zur Klonierung verwendeten Primer:

GJA 141 (SEQ ID NR: 60)

5' -GTTTGCTATAACTATACAAACCTACTACTTTTACATCAGGTTG-3'

GJA 142 (SEQ ID NR: 61)

5' -GTTATAGCAAACATACAAACCTACTACCTCGGTGTTCGTCCTTC-3'

**[0248]** Die resultierende RNA-Sequenz (Führung unterstrichen):

5' -GAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUGCUAUAACUAACCUACUACUUUUU-3'

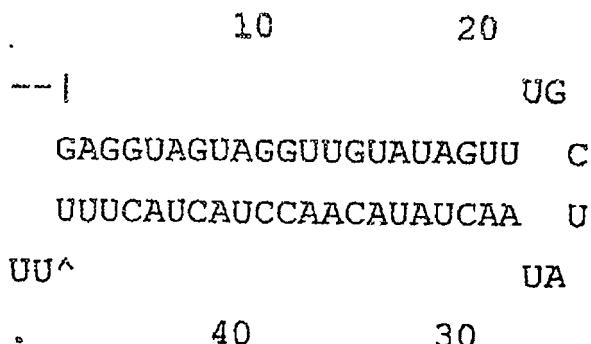
(SEQ ID NR: 62)

**[0249]** Die vorhergesagte RNA-Faltung:

Struktur 1

**[0250]** Anfangs-dG = -29,8

SEQ ID NR: 62



**[0251]** pIPspAdapt-U6(+1)-L13-glet7 ist ein pIPspAdapt-Plasmid mit einem U6(+1) Promotor, gefolgt von einer let7 Führungssequenz und mit der L13 Schleifen-Sequenz (SEQ ID NR: 66).

**[0252]** Die zur Klonierung verwendeten Primer:

GJA143 (SEQ ID NR: 63)

5' -GTTGTGCTATCAACTATACAAACCTACTACTTTTACATCAGGTTG-3'

GJA144 (SEQ ID NR: 64)

5' -GTTGATAGCACAACTATACAAACCTACTACCTCGGTGTTCGTCCTTC-3'

RNA-Sequenz (Führung unterstrichen) :

5' -GAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUGUGCUAUAACUAACCUACUACUUUUU-3'

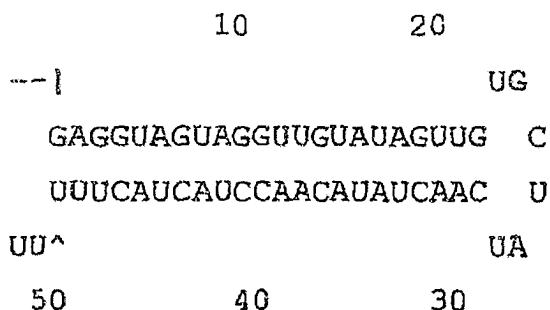
(SEQ ID NO : 65)

**[0253]** Die vorhergesagte RNA-Faltung:

## Struktur 1

**[0254]** Anfangs dG = -32,6

SEQ ID NR: 65



**[0255]** In den beiden oben angegebenen Beispielen beginnt die RNA-Sequenz mit 5'-G(G/A) (G/A) zur Ermöglichung der Basenpaarung mit dem 3'-Ende der RNA (... UUUUU-3'). Die Unterstrichenen Us bilden Basenpaare mit dem äußersten 5' Ende der RNA. Dies führt zu einem 2 nts Überhang am 3'-Ende. Konstrukte, die kein G(G/A)(G/A) als Ausgangssequenz aufweisen, sind ebenfalls möglich; sie haben 5 nts Überhänge am 3'-Ende (siehe unten).

**[0256]** Kurz gesagt werden zwei PCR-Reaktionen am Human-U6-Klon durchgeführt, um ein 'linkes Fragment' und ein 'rechtes Fragment' zu erzeugen. Als Beispiel wird die Klonierung von pIPspAdapt-U6(+1)-L12-glet7 angegeben. Im Prinzip kann jedoch jede Führungssequenz gemäß den nachfolgenden Anweisungen konstruiert werden: Die verwendeten Primer sind:

**[0257]** Für das 'linke Fragment':

hU6 (-265)-F1-XbaI (SEQ ID NR: 56)  
 5' -GcacgTTCTAGAAGGTCGGCAGGAAGAGGGCCT-3'  
 U6-R2: GJA 142 (SEQ ID NR: 61)  
 5' -GTTATAGCAAACATACAAACCTACTACCTCGGTGTTCGTCCTTC-3'

**[0258]** Für das 'rechte Fragment':

U6-F2: GJA 141: (SEQ ID NR: 60)  
 5' -GTTTGCTATAACTATACAAACCTACTACTTTTACATCAGGTTG-3'  
 hU6 (+198)-R1-HindIII (SEQ ID NR: 57)  
 5' -ccgtgcAAGCTTGGTAACCGTGCACCGGGCGTA-3

**[0259]** Zwei Primer, die aus einem Vorwärts-Primer (U6-F2/GJA141, SEQ ID NR: 60) und einem Rückwärts-Primer (U6-R2/GJA142, SEQ ID NR: 61) bestehen, werden antiparallel ausgearbeitet und zeigen voneinander weg und enthalten jeweils U6-Sequenzen an ihrem 3'-Ende, die neue Zielsequenz (N19) im Inneren und Verbindungs-Schleifen-Sequenzen an ihrem 5'-Ende. Die 5'-Sequenzen der Primer sind über 12 Basen komplementär.

**[0260]** Das erhaltene 'linke Fragment' und 'rechte Fragment' werden über Gel isoliert und in einem 1:1-Verhältnis vereinigt, so dass es die Matrize in der nachfolgenden Zusammenbau-PCR-Reaktion mit den Außen-Primern ist.

## Zusammenbau-PCR:

hU6 (-265) -F1-XbaI (SEQ ID NR: 56)  
 5' -GcacgTTCTAGAAGGTGGGCAGGAAGAGGGCCT-3'  
 hU6 (+198) -R1-HindIII (SEQ ID NR: 57)  
 5' -ccgtgcAAGCTTGGTAAACCGTGCACCGCGTA-3'

**[0261]** Die aus diesem Schritt erhaltenen PCR-Produkte werden in pIPspAdapto-deltaPolyA mit der gleichen Strategie wie für die Let7gene22A-F-Fragmente beschrieben (Beispiel 3) kloniert.

**[0262]** Die erhaltenen Plasmide werden in dem in den Beispielen 1 bis 3 beschriebenen Reportersystem untersucht. Das Experiment wird ähnlich durchgeführt wie in dem Beispiel 3 für die Plasmide auf Let-7-Basis, aber in diesem Beispiel werden diese Plasmide durch die Plasmide (pIPspAdapt-U6(+1)-glet7-L12 und pIPspAdapt-U6(+1)-glet7-L13) auf U6-Promotor-Basis ersetzt.

**[0263]** Northern-Blots von Proben von Zellen, die mit den Expressionsplasmiden auf U6 Promotor-Basis transfiziert wurden, zeigen Expression der RNA-Spezies und Prozessierung zu einer Spezies einer Größe, die mit der von synthetischen siRNAs vergleichbar ist.

**[0264]** Die in der **Fig. 21** gezeigten Ergebnisse zeigen eindeutig eine Repression der Reporterplasmide mit den Ziel-Let-7-Sequenzen (pGL3-tLet-7F und in gewissem Ausmaß pGL3-tLet-7R). In diesem Experiment zeigen die Expressionsplasmide auf U6-Promotor-Basis stärkere Knockdown-Effekte als die Expressionsplasmide auf Let-7-Promotorbasis. Beide untersuchten Schleifen-Sequenzen zeigen ähnliche Aktivität.

## Beispiel 5: Co-Infektion mit Virus

**[0265]** Die oben beschriebenen Experimente sind jeweils transiente Transfektionsexperimente, d. h. die Plasmid-DNA wird in PER.C6/E2A-Zellen transfiziert. Zur Untersuchung der Aktivität des Knock-Downs in der Anwesenheit von Adenovirus in der Zelle wird das folgende Experiment durchgeführt. PER.C6-Zellen, die die E2A-deletierten Adenovektoren nicht komplementieren, werden entweder mit siRNA oder Expressionsplasmiden wie vorher in den Beispielen 2 und 3 beschrieben transfiziert, aber mit einer Abwandlung: 20 bis 24 Std. vor der Transfektion werden die Zellen mit Adenovirus infiziert. Die Viren, die sich in diesen Zellen nicht replizieren können, exprimieren EGFP, so dass es bestimmt werden kann, dass die Transduktionseffizienz über 90% ist mit einer MOI von 3. Es wurden verschiedene Virusgerüste untersucht (Siehe EP 1191105).

**[0266]** Die Infektion von Adenovirus an sich hat keine Auswirkung auf die Knock-Down-Aktivität, die durch die transient transfizierten Plasmide unter den in diesem Beispiel verwendeten Bedingungen erhalten werden. Wie die **Fig. 22** zeigt, gibt es keinen Unterschied in den Knockdown-Effekten zwischen den Zellen, die mit Virus infiziert sind und Zellen, die nicht mit dem Virus infiziert sind.

## Beispiel 6: Virus Knock-Down

**[0267]** Die Reportergene mit den Promotoren der Plasmide pGL3-control, pGL3-tLet-7F, pGL3-tLet-7R und pRL-TK wurden in das pIPspAdapto-deltaPolyA-Kontrukt umkloniert, damit man Adenovirus-Varianten der Reporter erzeugen kann.

**[0268]** Standard-Umklonierungs-Verfahren werden mit den folgenden Restriktionsstellen durchgeführt: HindIII und BamHI für die Fragmente von pGL3-control, pGL3-tLet-7F und pGL3-tLet-7R; BglII (stumpfendig) und BamHI für das Fragment von pRL-TK, das in AvrII(stumpfendig)/BamHI des Vektors pIPspAdapt6 kloniert wird.

**[0269]** Die pIPspAdapt-Versionen der Konstrukte werden auf Funktionalität in einem transienten Transfektionsexperiment untersucht und scheinen als Plasmid aktiv zu sein.

**[0270]** Alle beschriebenen Reporter-Konstrukte auf pIPspAdapt-Basis werden transient mit Helfer-DNA in PER.C6/E2A transfiziert. Adenoviren werden mit dem beschriebenen Verfahren (US 6 340 595) gebildet. Viruskonstrukte werden mit 'Ad' bezeichnet, beispielsweise ist AdGL3-tLet-7F ein Adenovirus mit dem GL-3-Reportergen und der Let-7-Zielsequenz in Vorwärts-Orientierung.

**[0271]** Ein Coinfektions-Experiment wird mit einer Kombination von Adenoviren durchgeführt, enthaltend:

- 1) eines der Luciferase-Reporterkonstrukte (AdGL3-control, AdGL3-tLet-7F, AdGL3-tLet-7R) und
- 2) interne Kontrolle (AdRL-TK) und
- 3) Expressionskonstrukt auf U6-Promotor-Basis (beispielsweise Ad-U6(+1)-L12-g-Let-7)

**[0272]** In diesem Experiment sind die infizierten Zellen HeLa oder U20S.

**[0273]** Die Hela-Zellen oder U20S-Zellen werden bei einer MOI **1500** für die Luciferase-Reporterkonstrukte zusammen mit der internen Kontrolle (AdRL-TK) bei einer MOI 500 vorinfiziert. Nach 4 Std. werden die Expressionskonstrukte auf U6-Promotor-Basis bei einer MOI 3000 oder 8000 zugegeben. Diese Viren sind Rohlysate (US 6 340 595). Die Zellen werden bei 24, 48 und 72 Std. nach der Infektion geerntet. Es erfolgen Northern-Blots zur Messung des Expressions-Wertes der Knock-Down-RNA-Moleküle.

**[0274]** Northern-Blots von Proben von Zellen, die mit den adenoviralen Expressionskonstrukten auf U6-Basis infiziert wurden, zeigen Expression der RNA-Spezies und Prozession zu einer Spezies einer Größe, die mit der von endogener Let-7-RNA vergleichbar ist (**Fig. 20**).

**[0275]** Die Luciferase-Aktivität wird mit dem Dual-Luciferase-Kit gemessen. Die Ergebnisse sind in der **Fig. 24** gezeigt. Zwei Expressionskonstrukte auf U6-Promotorbasis mit verschiedenen Schleifen-Sequenzen wurden untersucht. Beide Expressionskonstrukte auf U6-Promotor-Basis zeigen einen klaren sequenzspezifischen Knock-Down des Reportervirus AdGL3-tLet-7F, der die Let7-Zielsequenz enthält. Keine signifikante Repression ist für das AdGL3-Virus ersichtlich, bei dem die let-7-Zielsequenz fehlt. Dies zeigt eindeutig, dass die Virusexpressionskonstrukte auf U6-Basis Knock-Down-Aktivität haben.

**[0276]** Das Expressionskonstrukt enthält einen PolIII-Promotor (stärker bevorzugt einen Promotor auf U6-Basis), vorzugsweise gefolgt von der 19 bis 21 Nukleotide langen Führungssequenz (beispielsweise GL3 oder gLet7), vorzugsweise gefolgt von einer Verbindungs-Schleifensequenz (beispielsweise L12 oder L13), vorzugsweise gefolgt von einer 19 bis 21 Nukleotide langen Sequenz, die sich mit der Führungssequenz auf der RNA-Ebene basenpaaren kann, gefolgt von einem PolIII-Transkriptions-Terminationssignal, das vorzugsweise aus 5 oder mehr T-Resten besteht.

**[0277]** Zur Gewinnung von Transkriptionsaktivität des U6-Promotors ist das erste Nukleotid des Transkripts vorzugsweise ein G-Nukleotid. Dieses G-Nukleotid kann das erste Nukleotid der Führungssequenz sein. Es sollte vorzugsweise eine interne Sequenz von mehr als 5 T- oder A-Resten vermieden werden, da dies eine vorzeitige Transkriptionstermination durch PolIII verursacht. Diese Schleifen-Sequenz kann L12 sein: 5'-GUUUGCUAUAAAC-3' (SEQ ID NR: 30); oder L13: 5'-GUUGUGCUAUCAAC-3 (SEQ ID NR: 66); oder eine andere Verbindungssequenz (siehe beispielsweise die Daten, die in Beispiel 2 beschrieben sind).

**[0278]** Die Sequenz stromabwärts der Verbindungsschleife kann mit der Führungssequenz Basenpaare bilden. Das Terminationssignal, bestehend aus 5 U-Resten am 3'-Ende in dem Transkript, kann partiell komplementär zum 5'-Ende der Führungssequenz gemacht werden, und zwar so, dass sich das Transkript wahrscheinlich zu einer doppelsträngigen Struktur mit einem Überhang von 2 bis 4 Nukleotiden am 31 Ende faltet. Zur Erzeugung eines 3'-Überhangs von 2 Nukleotiden müssen die Ausgangsnukleotide der Führungssequenz beispielsweise an Position 1 (G), an Position 2 (G oder A), an Position 3 (G oder A) sein (siehe ebenfalls oben).

**[0279]** Alternativ wird die Sequenz stromabwärts der Verbindungsschleife komplementär zur Führungssequenz gemacht. In diesem Fall bildet die Folge der 3'-terminalen Us den Überhang.

**[0280]** Die 19–21 nt Führungssequenz kann mit der Zielsequenz im Zielgen Basenpaare bilden. In dem vorstehend beschriebenen RNA-Molekül verläuft die Reihenfolge der RNA-Abschnitte von 5' nach 3': Führungssequenz, Verbindungsschleife, Sequenz, die mit der Führungssequenz Basenpaare bilden kann. Diese Reihenfolge kann jedoch umgekehrt werden, so dass (5' nach 3') erhalten wird: Sequenz, die mit der Führungssequenz Basenpaare bilden kann, Verbindungsschleife, Führungssequenz. Konstrukte auf der Basis von GL2.2-Führungen in umgekehrter Reihenfolge wie oben beschrieben, zeigen eine effiziente Expression und Prozessierung von mRNAs von etwa 21 nt auf Northern-Blots.

**[0281]** Für den Knock-Down von endogenen RNAs wird eine Sequenz von etwa 17 bis etwa 22 Nukleotiden entsprechend der Ziel-RNA ausgewählt. Mehrfache Sequenzen aus einer Ziel-mRNA können ausgewählt werden, um eine Zielsequenz zu identifizieren, die für eine bestimmte mRNA spezifisch ist. Sequenz-Alignments mit anderen mRNA-Sequenzen, die eine hohe Homologie zu der Ziel-mRNA haben, werden verwendet, um

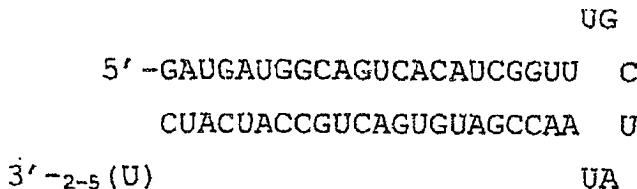
solche Bereiche der Ziel-NRNA zu identifizieren, die einzigartig sind. Wenn das Ziel der Knock-Down der Expression von mehr als einer mRNA ist, kann alternativ ein Sequenz-Alignment zur Identifikation solcher Regionen mit hoher Homologie zu anderen Genen verwendet werden. Eine Zielsequenz, ausgewählt aus einer Region mit hoher Homologie, würde zum einem Knock-Down sämtlicher mRNAs führen, die diese Sequenz umfassen.

**[0282]** Hier wird das GNAS-Gen (NM\_000516) als Beispiel verwendet, ist aber nicht auf die Erfindung eingeschränkt, da andere RNAs mit diesem Verfahren einem Knock-Down unterworfen werden können.

**[0283]** Ein Konstrukt auf U6-Promotor-Basis wird erzeugt, das eine GNAS-Zielsequenz (beispielsweise 5'-CGATGTGACTGCCATCATC-3' (SEQ ID NR: 80) enthält. Die Erzeugung des Konstruktes kann beispielsweise durch Verwendung von Verfahren auf PCR-Basis wie in Beispiel 4 beschrieben oder durch direktes Klonieren von Oligonukleotiden wie in Beispiel 11 beschrieben, oder eine beliebige andere Technik, die dem Fachmann bekannt ist, durchgeführt werden. Aus dem erhaltenen Vektor werden Adenoviren, Ad-U6(+1)-gGNAS, durch zuvor beschriebene Verfahren erhalten (US 6 340 595, US 6 413 776). Nach dem Einbringen in Vertebratenzellen, wird die RNA von dem Vektor mit der folgenden vorhergesagten Sequenz transkribiert:

5' -GAUGAUGGCAGUCACAU CGGUU UGCUAUAACCGAUGUGACUGCCAUCAUC  
(U) 2-5-3' (SEQ ID NR: 81)

**[0284]** Und die folgende vorhergesagte RNA-Faltung:



**[0285]** Zur Veranschaulichung der Reduktion der Expressionsausmaße der Ziel-RNA wird ein ähnliches Experiment durchgeführt, wie oben beschrieben, jedoch verwenden wir kein Reporter-Virus. Kurz gesagt werden beispielsweise HeLa-Zellen oder U20S-Zellen mit dem Ad-U6(+1)-gGNAs-Virus infiziert oder dem Kontrollvirus Ad-U6(+1)-gGL2.2 mit verschiedenen MOIs (MOI 300, 1000, 3000, 10000) infiziert. 72 Std. nach der Infektion wurde die RNA aus den infizierten Zellen isoliert. Die Expressionsausmaße der GNAS-mRNA werden durch Echtzeit-PCR-Analyse sowie durch Northern-Blotting analysiert (siehe **Fig. 27** und **Fig. 28**).

**[0286]** Für die Echtzeit-PCR-Analyse kann die Erfassung beispielsweise mit SYBR-Green oder mit den Taqman-Sonden durchgeführt werden. Hier erfolgt die SYBR Green-Erfassung mit Standard-Techniken mit den folgenden Primern:

HPA-03 For TCCCTCCGAATTCTATGAGC (SEQ ID NR: 82)

HPA-03 Rev GGCACAGTCAATCAGCTGGTAC (SEQ ID NR: 83)

**[0287]** Die Ergebnisse der Echtzeit-Analyse sind in der **Fig. 27** gezeigt. Die Werte werden auf interne GAPDH-Werte der Proben normalisiert, so dass auf Abweichungen der Konzentrationen der Proben korrigiert wurde. Die Werte werden relativ zu den Kontrollproben mit Ad-U6(+1)-gGL2.2 geplottet.

**[0288]** Die Analyse durch Northern-Blotting erfolgt durch Standard-Techniken mit einer GNAS-cDNA-Sonde, die durch RT-PCR erhalten wurde. Die Ergebnisse sind in der **Fig. 28** gezeigt. Eine gleiche Ladung wird durch eine Methylenblau-Färbung des Blots vor der Hybridisierung überprüft, wie unten in der Figur gezeigt.

**[0289]** Die vorstehenden Experimente veranschaulichen, dass endogene Gene durch erfindungsgemäße Adenovirus-Knock-Down-Konstrukte wie hier beschrieben effizient einem Knock-Down unterzogen werden können.

**[0290]** Bei einer ausführlicheren Analyse werden zusätzliche endogene Gene so ausgewählt, dass eine sequenzspezifische Reduktion der mRNA nach der Virusinfektion mit erfindungsgemäßen Knock-Down-Viruskonstrukten gezeigt wird. Die ausgewählten Gene und die ausgewählten Sequenzen, welche angezielt werden, sind nachstehend aufgeführt.

**[0291]** Für zwei dieser Gene werden mehr als eine Zielsequenz ausgewählt.

Ausgewählte Gene: IKK-Beta (AF080158), PPAR Gamma  
(NM\_005037), M6PR (NM\_002355)

Ausgewählte Zielsequenzen:

IKK beta-1	CUUAAAGCUGGUUCAUAUC (SEQ ID NR: 84)
IKK beta-2	AGAAUCAUCCAUCGGGAUC (SEQ ID NR: 85)
IKK beta-3	CGUCGACUACUGGAGCUUC (SEQ ID NR: 86)
PPAR gamma-2	UACUGUUGACUUUCUCCAGC (SEQ ID NR: 87)
PPAR gamma-3	UUGAACGACCAAGUAACUC (SEQ ID NR: 88)
PPAR gamma-4	AUUCAAGACAACCUGCUAC (SEQ ID NR: 89)
M6PR-2	GGAAGUAAUUGGAUCAUGC (SEQ ID NR: 90)

**[0292]** Adenoviren werden wie vorstehend beschrieben hergestellt. U20S Zellen werden mit einer MOI 300, 1000 und 3000 infiziert, und 24, 48 und 144 Std. nach der Infektion geerntet. Die Expressionsausmaße der entsprechenden mRNAs werden mit Echtzeit-PCR-Analyse wie oben beschrieben mit den folgenden Primer-Kombinationen bestimmt:

PPAR gamma (NM\_005037) :

HPA-01 Rev GGAGCGGGTGAAGACTCATG (SEQ ID NR: 91)  
HPA-01 For ATTGTCACGGAACACGTGCA (SEQ ID NR: 92)

M6PR (NM\_002355) :

HPA-04 For CAGTGGTATGATCTCCTGCAA (SEQ ID NR: 93)  
HPA-04 Rev TGCCACGCTCCTCAGACAC (SEQ ID NR: 94)

IKK beta (AF080158) :

HPA-07 For GCAGACCGACATTGTGGACTTAC (SEQ ID NR: 95)  
HPA-07 Rev CCGTACCATTCCTGACTGTCA (SEQ ID NR: 96)

**[0293]** Die Fig. 29 A-C zeigen eine spezifische Reduktion der mRNA-Spiegel für die untersuchten Ziele in einer MOI- und zeitabhängigen Weise.

GNAS:

**[0294]** GNAS codiert die  $\alpha$ -Untereinheit von Gs, einem heterotrimeren G-Protein ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). G-Proteine Wechselwirken mit 7 Transmembran-Rezeptoren, dem so genannten G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR). Die Bindung eines Liganden an den GPCR induziert eine Konformationsänderung des Rezeptors, die zu einer Aktivierung des G-Proteins führt. Das aktivierte G-Protein dissoziiert in seine  $\alpha$ -Untereinheit und  $\beta\gamma$ -Untereinheit. Im Falle von Gas wechselwirkt die  $\alpha$ -Untereinheit mit der Adenylatcyclase und aktiviert wiederum dieses Enzym. Adenylatcyclase wandelt ATP zu cAMP um. Die Aktivierung von GPCRs, die an Gs gekoppelt sind, erhöhen daher bei Aktivierung die zellulären cAMP-Mengen. Die Variation der cAMP-Mengen in der Zelle können durch cAMP-responsive Elemente (CRE) gemessen werden. Das cAMP-responsive Element aktiviert die Transkription bei Bindung durch aktiviertes cAMP-responsives Element-Bindungsprotein (CREBP). CREBP wird durch Proteinkinase A (PKA) aktiviert, die wiederum durch cAMP aktiviert wird. Ist CRE an ein Luciferase-Gen gekoppelt, können Variationen der cAMP-Mengen in einer Zelle sichtbar gemacht werden. Ein Anstieg des zellulären cAMP führt zu einem Anstieg der Menge an Luciferase, und eine Abnahme von cAMP führt zu einer Abnahme des Luciferase-Gehaltes.

**[0295]** Der folgende Test wird entwickelt, um den Knock-Down von GNAS auf dem funktionellen Niveau zu messen.

**[0296]** U20S-Zellen werden mit einem Adenovirus-Konstrukt infiziert, das einen GPCR ( $\beta$ -adrenergen Rezeptor) codiert, der an Gs (MOI 500) koppelt, und zwar zusammen mit einem adenoviralen Rezeptor-Konstrukt, das CRE-Elemente stromaufwärts eines Luciferasegens (MOI 750) trägt. Die infizierten Zellen werden entweder mit einem Adenovirus-Konstrukt, das gegen GNAS gezielte sRNA (SEQ ID NR: 81) codiert, oder einem leeren Virus (MOI 1500) cotransfiziert.

**[0297]** Zwei Tage nach der Infektion wird der  $\beta$ 2-adrenerge Rezeptor mit Isoproterenol, einem Agonist für den  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptor, aktiviert. Sechs Std. später wird die Luciferase-Aktivität gemessen.

**[0298]** Nach der Aktivierung des Rezeptors führt ein erfolgreicher Knock-Down von GNAS zu viel niedrigeren cAMP-Spiegeln im Vergleich zu cAMP-Spiegeln, die man bei Kontrollzellen beobachtet, welche mit leerem Virus transfiziert wird.

**[0299]** Zur Gewährleistung, dass die gesenkten cAMP-Spiegel auf dem Knock-Down von GNAS beruhen und nicht auf einer nicht-spezifischen Wirkung auf die cAMP-Spiegel, wird Forskolin zu den dreifach infizierten Zellen gegeben. Forskolin steigert die intrazellulären cAMP-Spiegel durch direkte Aktivierung der Adenylatcyclase und ist daher unabhängig von G-Protein (GNAS).

**[0300]** Die **Fig. 30** zeigt die Ergebnisse der funktionellen Knock-Down-Messungen von GNAS. Die Luciferase-Aktivität in Zellen, die mit dem Adenovirus-GNAS-Knockdown-Konstrukt infiziert sind, ist viel niedriger als die Luciferase-Spiegel von Zellen, die nicht mit dem GNAS-Knock-Down-Konstrukt infiziert sind. Die Forskolin-Ergebnisse zeigen, dass die cAMP-Reduktion auf dem Knock-Down von GNAS beruht und nicht auf einem allgemeinen Stromabwärtsseffekt auf den Signaltransduktionsweg, der zur Aktivierung von CREBP führt.

#### Beispiel 7: Coexpression von Human-Dicer

**[0301]** Dieses Beispiel beschreibt die Klonierung und Expression von humaner Dicer cDNA. Die Klonierung von Dicer-cDNA erfolgt mittels RT-PCR mit mRNA als Matrize. Dicer wird mit den Konstrukten der vorherigen Beispiele coexprimiert, wodurch die Prozessierung der RNA verbessert wird, die von den Konstrukten transkribiert wird. Die Coexpression von Human-Dicer ist für das System vorteilhaft, da es ermöglicht, dass das System von der endogenen Dicer-Aktivität unabhängig ist, die in bestimmten Situationen, Geweben oder Entwicklungsstufen niedrig ist oder sogar fehlt.

**[0302]** Biochemische und genetische Daten zeigen die Beteiligung eines Mitglieds der RNase III-Familie der Nuklease, Dicer, an der genauen Prozessierung doppelsträngiger RNA in die aktive siRNA-Spezies (Bernstein et al. (2001) Nature 409: 363–366; Knight et al. (2001) Science 293: 2269–71). Das Human-Homologon von Dicer bildet etwa 22 nt lange RNAs aus dsRNA-Substraten. Dicer ist ebenfalls für die Reifung der let-7-sRNA bei Menschen erforderlich (Hutvagner et al. (2001) Science 293: 834–838).

**[0303]** Das Human-Dicer-Homologon wird mittels reverser Transkriptase-PCR und Primern auf der Basis der Sequenz-Zugr.-Nummer NM\_030621 kloniert. Die Position relativ zum Start der NM\_030621-Sequenz.

<u>Primer</u>	<u>Sequenz 5' nach 3'</u>	<u>Position</u>	<u>SEQ ID NR</u>
hDicer F1	ccgAAGCTTGGGCATGCTGTGAT	42-61	SEQ ID NR: 67
hDicer F2	ccgaagcttATGAAAAGCCCTGCTTGCAA	183-203	SEQ ID NR: 68
hDicer F3	ccgaagctTCCAGAGCTGGCTTATATCAG	1592-1612	SEQ ID NR: 69
hDicer F4	ccgaagcttACTGATTCTGCATATGAATGG	4611-4631	SEQ ID NR: 70
hDicer R1	ctgagctagcTTGTTAGAGCAACAGCCTAGA	6960-6940	SEQ ID NR: 71
hDicer R2	ctgagctagcTCAGCTATTGGAACCTGAGGT	5957-5936	SEQ ID NR: 72
hDicer R3	ctgagctagcAATAACACTGCTCAGTGTGCAA	4850-4830	SEQ ID NR: 73
hDicer R4	ctgagctagcGATTGAACATAGGATCGATAT	1834-1814	SEQ ID NR: 74

**[0304]** Aufgrund der großen Größe der Human-Dicer-cDNA kann die Klonierung erfolgen, indem zuerst kleinere Regionen der cDNA isoliert werden. PCR-Fragmente werden subkloniert und dann zusammen ligiert, um die Human-Dicer-Vollängen-cDNA zu erhalten. Verschiedene Primer-Kombinationen werden verwendet, um verschiedene große DNA-Fragmente zu erzeugen, damit die Klonierung der Vollängen-cDNA erleichtert wird. Dies umgeht das Problem der Gewinnung der langen cDNA von Dicer. Die Klonierung in einer einzelnen Runde mittels Primer außerhalb der codierenden Region bleibt jedoch möglich. Für Klonierungszwecke enthalten die Vorwärts-Primer eine HindIII-Stelle, und die Rückwärtsprimer enthalten eine NheI-Stelle. Die Vollängen-cDNA wird in die HindIII- und die NheI-Stellen des pIPspAdapt6-Vektors kloniert. Dieser Vektor wird zur Expression in Säugetierzellen durch direkte Transfektion oder durch Herstellung eines Adenovirusvektors, der die Dicer-cDNA trägt und zur Expression bei (Co)infektion verwendet.

**[0305]** Das klonierte Dicer-cDNA-Expressionsplasmid wird mit Konstrukten kombiniert, die in anderen Beispielen beschrieben sind, und in Säugetierzellen eingebracht. Die Coexpression der Konstrukte mit Dicer oder seiner Homologa erleichtert die Verarbeitung der transkribierten sRNA.

**[0306]** Beispiel 8: Identifikation von 21–23 nts RNA-Sequenzen, die endogen exprimiert werden und Konstruktion einer definierten Expressionsbibliothek kleiner RNAs Dieses Beispiel beschreibt die Identifikation und Isolation von sRNAs.

**[0307]** Let-7-RNAs mit 21 bis 23 nts werden in einer Reihe von Tierarten konserviert, einschließlich Drosophila und Menschen (Pasquinelli et al. (2000) Nature 408: 86–89). Die Let-7-RNA wird aus einer längeren Vorstufen-RNA hergeleitet (Hutvagner et al. (2001) Science 293: 834–838). Es wurde berichtet, dass bei Inkubation einer langen dsRNA in Drosophila-Extrakten, 21–23 nts siRNAs aus der dsRNA produziert werden. Diese 21–23 nts siRNAs wurden isoliert, kloniert, und sequenziert (Elbashir et al. (2001) Genes Dev. 15: 188–200). Neue

endogene 21–23 nts siRNAs wurden ebenfalls in Drosophila mit diesem Ansatz identifiziert (Elbashir et al., (2001) Genes Dev. 15: 188–200).

**[0308]** Die sRNAs, die zur let-7-RNA-Familie gehören werden folgendermaßen identifiziert. Die Sequenzen von endogenen 21–23 nts Human-RNAs (aus verschiedenen RNA-Quellen; Geweben; Zelltypen, usw.) werden erhalten durch Klonierung durch das für Drosophila beschriebene Verfahren (Elbashir et al., (2001) Genes Dev. 15: 188–200).

**[0309]** Die erhaltene Sequenzinformation wird für die folgenden Aspekte verwendet:

1. Sie werden zur Konstruktion einer Expressionsbibliothek verwendet, die diese Sequenzen enthält. Die Bibliothek beruht, wie in den vorherigen Beispielen beschrieben, auf der Expression chimärer RNAs, die let-7-Vorstufensegmente (let-7 5'-Extensions-, let-7-Schleifen-, und let-7-3'-Extensionssequenzen) in Kombination mit den 21–3 nt-RNA-Sequenzen aufweisen. Die Funktionen dieser 21–23 nt RNAs und ihrer Ziel-mRNAs werden durch Durchführung von Zellassays untersucht.
2. Die Sequenzidentifikation natürlich vorkommender 21–23 nts RNAs erleichtert die Suche nach ihren genomischen Stellen. Die Identifikation und Charakterisierung der genomischen Sequenzen liefert die Information hinsichtlich der Produktion und Prozessierung der Mitglieder der Familie dieser sRNAs. Analog zu der let-7-RNA, dem Gründungsmitglied dieser Familie, wird Information bezgl. neuer Familienmitglieder zur Erzeugung eines chimären RNA-Expressionssystems verwendet, wie für let-7 in vorherigen Beispielen erläutert. Zudem eignet sich die genomische Sequenzinformation zur Optimierung des let-7-Systems.

**[0310]** Beispiel 9: Konstruktion einer undefinierten Expressionsbibliothek von sRNA-Spezies.

**[0311]** Dieses Beispiel beschreibt die Klonierung der sRNAs, die in Beispiel 8 identifiziert werden. Man muss nicht die Sequenz der 21–23 Nukleotid RNAs kennen. Das Verfahren erzeugt ein DNA-Fragment, das (in dieser Reihenfolge) besteht aus:

1. einer 5'-Linker-Sequenz zur Unterstützung der Klonierung;
2. der 21–23 Nukleotid-Sequenz, die vorzugsweise antisense zur Zielsequenz ist;
3. einer zentralen Linker-(Schleifen)-Sequenz;
4. einer Sequenz, die mit der 21–23 Nukleotide langen Sequenz von 2 oben Basenpaare bilden kann; und
5. einer 3'-Linker-Sequenz zur Unterstützung der Klonierung.

**[0312]** Diese DNA-Fragmente werden mit Restriktionsendonukleasen gespalten und in Vektoren kloniert. Die bevorzugten Vektoren sind Expressionsplasmide, die let-7- oder polIII-Promotoren enthalten.

**[0313]** Wie im Beispiel 8 beschrieben, werden endogene sRNAs, die zur Familie der let-7-RNA gehören, durch Klonierung und Sequenzierung identifiziert. In diesem Beispiel werden die isolierten sRNAs direkt in ein Expressionskonstrukt kloniert ohne zuerst ihre Sequenz zu identifizieren (siehe **Fig. 5**):

1. Die sRNA wird mit alkalischer Phosphatase aus Kälber-Darm behandelt, so dass die 5'-Phosphatgruppe entfernt wird.
2. Das Produkt von Schritt 1 wird an seinem 3'-Ende an die Phosphatgruppe des Linkers 1 ligiert, so dass ein Zwischen-Polynukleotid erhalten wird.

**[0314]** Der Linker 1 ist ein Oligonukleotid, das sich zu einer Stammschleifenstruktur falten kann und eine endständige 3'-OH-Gruppe aufweist, die als Primer verwendet werden kann. Ein bevorzugtes Oligonukleotid enthält eine Restriktionsstelle im doppelsträngigen Bereich der Stammschleife. Die Anwesenheit dieser Restriktionsstelle erleichtert nötigenfalls die spätere Spaltung und den Ersatz der Linker-Sequenz. Die Ligation erfolgt mit T4-RNA-Ligase.

3. Das Produkt von Schritt 2 wird an seinem 5'-Ende durch T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert.
4. Das Produkt von Schritt 3 wird an seinem 5'-Phosphat-Ende an das 3'-OH-Ende von Linker 2 ligiert. Der Linker 2 ist ein Oligonukleotid mit einer 5'-terminalen OH-Gruppe.
5. Das Produkt von Schritt 4 wird behandelt, so dass der 3'-Terminus von Linker 1 hybridisiert kann. Dieser wird für eine Extensionsreaktion mit dem 3'-Terminus von Linker 1 als Primer mit Reverser Transkriptase ohne RNase H-Aktivität verwendet.
6. Das Produkt von Schritt 5 wird denaturiert und Primer 4 wird hybridisiert. Der Primer 4 ist komplementär zu dem äußeren 3'-Ende des Produkts von Schritt 5. Man beachte: Der Linker 2 und der Primer 5 enthalten identische Sequenzen.
7. Der hybridisierte Primer 4 wird durch DNA-Polymerase oder reverse Transkriptase oder ein Gemisch von beidem verlängert.

8. Eine zusätzliche wahlfreie Amplifikationsrunde wird mittels Primer 4 durchgeführt. Die Amplifikation erfolgt mit Klenow-Fragment-DNA-Polymerase oder T4-DNA-Polymerase oder einer thermisch stabilen DNA-Polymerase.
9. Das Produkt von Schritt 7 (gegebenenfalls Schritt 8) wird durch das Restriktionsenzym 1 gespalten und in einen Expressionsvektor mit der geeigneten Stelle kloniert. Der Expressionsvektor beruht auf dem let-7-Gen oder Poly-III-Promotor auf der Basis wie in den vorherigen Beispielen beschrieben und kann viral sein, wie ein Adenovirus, oder nicht-viral.
10. Wenn die existierende Schleifensequenz (eingebettet in Linker 1) nicht funktional ist, um die aktive sRNA-Spezies zu erhalten, kann diese Schleife durch eine andere Schleifensequenz ersetzt werden, die aktive sRNAs ergibt; beispielsweise die let-7-Schleifensequenz. Die Spaltstellen sind in dem Linker 1 enthalten, damit diese Option möglich wird.

Beispiel 10: Konstruktion einer sRNA-Expressionsbibliothek, die gegen endogene RNA-Ziele gerichtet ist

**[0315]** Da es vorteilhaft ist, die Expression eines beliebigen Gens einem Knock-Down unterziehen zu können, einschließlich derzeit unbekannter oder uncharakterisierter Gene, beschreibt dieses Beispiel Verfahren, wodurch verschiedene 19 Nukleotid Führungssequenzen synthetisiert und kloniert werden, so dass man eine Bibliothek erhält.

**[0316]** In Analogie zu den Beispielen 8 und 9 wird eine sRNA-Expressionsbibliothek konstruiert. Die Sequenzen für die sRNA, die ihre Ziele (mRNAs, strukturelle RNAs usw.) spezifizieren, werden beispielsweise aus Datenbanken, Zellextrakten erhalten oder chemisch synthetisiert. Die Sequenzen werden beispielsweise erhalten von Datenbanken, die exprimierte RNA-Sequenzen enthalten, einschließlich, aber nicht eingeschränkt auf mRNA, ESTs, SAGE, und können Proteine codieren oder nicht, einschließlich, aber nicht eingeschränkt auf Kinasen, Proteasen, Phosphodiesterasen, Phosphatasen, G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Wachstumsfaktoren, Lipasen, ABC-Transportern, DNAsen, RNAsen usw. Es können auch Sequenzen von strukturellen RNA-Sequenzen (beispielsweise snRNAs, rRNAs, tRNAs, snoRNAs, usw.) verwendet werden. Hieraus werden Sammlungen von Oligonukleotiden produziert, die diese Sequenzen enthalten. Das Gemisch der Oligonukleotide wird zur Klonierung in das Expressionskonstrukt verwendet, wobei die in der **Fig. 6** veranschaulichte Strategie verwendet wird. Ein weiteres Beispiel ist die statistische Erzeugung von 19 nt Sequenzen, die eine Bibliothek von 419 Kombinationen ( $2,7 \times 10^{11}$ ) erzeugen, die ähnlich in ein Expressionskonstrukt gemäß dem in **Fig. 6** gezeigten Verfahren kloniert werden. In Schritt (1) dieses Verfahrens wird ein Oligonukleotid synthetisiert, das die spezifizierende Sequenz (oder statistische Sequenz), N19, enthält, die am 5'-Ende von einer Linker-Sequenz flankiert ist, und am 3'-Ende von einer Sequenz, die sich zu einer Stammschleifen-Struktur falten kann und eine endständige 3'-OH-Gruppe hat, die als Primer verwendet werden kann. Das 3'-Ende wird als Primer in einer Extensionsreaktion mit DNA-Polymerase oder reverser Transkriptase verwendet. Der doppelsträngige Abschnitt der Stamm-Schleife umfasst eine Restriktionsstelle. Die 5'-Linkersequenz kann ebenfalls eine Restriktionsstelle zur Erleichterung der Klonierung aufweisen.

**[0317]** In Schritt (2) wird das Produkt von Schritt (1) denaturiert, und der Primer 4 wird hybridisiert. Der Primer 4 ist komplementär zu dem äußeren 3'-Ende des Produktes von Schritt (1). Das äußere 5'-Ende des anfänglichen Oligonukleotids von Schritt (1) und der Primer 4 enthalten identische Sequenzen. Wenn die 5'-Linkersequenz keine Restriktionsstelle aufweist, kann der Primer 4 so ausgelegt sein, dass er eine Restriktionsstelle zur Erleichterung der Klonierung aufweist.

**[0318]** In Schritt (3) wird der hybridisierte Primer 4 durch DNA-Polymerase oder eine thermisch stabile DNA-Polymerase (beispielsweise Taq) verlängert.

**[0319]** Ein wahlfreier Schritt (4) sorgt für eine weitere Amplifikation des Konstrukts durch die DNA-Polymerase.

**[0320]** In Schritt (5) wird das Produkt von Schritt (3) oder gegebenenfalls Schritt (4) durch das Restriktionsenzym 1 (E1) gespalten und in einen Expressionsvektor mit der geeigneten Restriktionsstelle kloniert. Der bevorzugte Expressionsvektor umfasst den let-7- oder Pol-III-Promotor. Das beschriebene Verfahren ist besonders zur Konstruktion von gepoolten retroviralen oder lentiviralen oder AAV- oder integrierenden Adenovirus-sRNA-Expressionsbibliotheken geeignet.

**[0321]** Wenn die Schleifensequenz zur Gewinnung der aktiven sRNA-Spezies nicht funktionell ist, kann sie bei dem wahlfreien Schritt (6) durch eine weitere Schleifensequenz ersetzt werden, was aktive sRNAs erzeugt; beispielsweise die let-7-Schleifensequenz. Restriktionsstellen, die von den Restriktionsenzymen 3 und 4 (E3

bzw. E4) erkannt werden, sind in der Stamm-schleifen-Sequenz enthalten, damit ein Austausch ermöglicht wird.

#### Beispiel 11: Produktion einer sRNA Expressionsbibliothek

**[0322]** Ein bevorzugtes Expressionskonstrukt produziert die siRNAs auf Niveaus mit dem stärksten Knock-Down der Ziel-RNA. Beispielsweise ein Expressionskonstrukt auf der Basis des U6-Promotors, wie in den vorhergehenden Beispielen beschrieben.

**[0323]** Oligonukleotide können direkt gegen diese Ziele gerichtet entwickelt und zur Konstruktion von Knock-Down-Expressions-Klonen verwendet werden. Die Vorwärts-(F)Oligonukleotide enthalten vorzugsweise die Führungssequenzen gegen die Ziele, gefolgt von der Verbindungsschleifensequenz, gefolgt von den Sequenzen, die mit den Führungssequenzen basenpaaren können, jedoch kann die Reihenfolge der Führungssequenz und des Komplements geändert werden. Die Rückwärts-(R)Oligonukleotide sind komplementär zu dem verwandten Vorwärts-Oligonukleotid. Ein spezifisches Paar von Vorwärts- und Rückwärts-Oligonukleotiden wird zusammen hybridisiert, so dass eine doppelsträngige Struktur gebildet wird, die zum Klonieren in den Expressionsvektor verwendet wird.

**[0324]** Die hybridisierten F- und R-Oligonukleotide werden entweder direkt kloniert, wenn sie mit den geeigneten Überhängen ausgearbeitet werden, die denjenigen des Klonierungsvektors entsprechen, oder sie werden vor der Klonierung mit Restriktionsenzymen gespalten, so dass die geeigneten Überhänge erzeugt werden, die denjenigen des Klonierungsvektors entsprechen.

**[0325]** Die Konstruktion einer Bibliothek, die gegen endogene Ziele gerichtet ist, wird vorzugsweise durchgeführt, indem ein DNA-Vektorkonstrukt verwendet wird, in dem hybridisierte Oligonukleotide direkt kloniert werden.

**[0326]** Zur Erzeugung eines Expressionsprodukts auf der Basis des U6-Promotors wird ein Vektor erzeugt, der mit dem Enzym SAp I in eine lineare Sequenz umgewandelt wird. Sap I spaltet neben seinen Erkennungsstellen (GCTCTTC(N)1/4). Dies hat insofern den Vorteil, dass es jede Sequenz spaltet, und dass die Erkennungssequenz nicht im endgültigen Konstrukt zugegen ist, da sie auf dem ausgeschnittenen Fragment zugegen ist. Demnach kann jede Sequenz zur Linearisierung des Vektors verwendet werden. Daher wird er auf der Basis verschiedener Promotoren zur Konstruktion von Expressionsplasmiden verwendet, ohne dass die Sequenz gestört wird. Der U6-Promotor wird vorzugsweise zur Erzeugung der Klonierungsstellen mit verschiedenen Überhängen verwendet. Zudem ist zur Verbesserung der Klonierungseffizienz das E. coli Lethal-Gen ccdB in dem Fragment zur Spaltung enthalten. Wird das Restriktionsfragment nicht ausgeschnitten und verbleibt das ccdB-Gen im Plasmid werden nach der Transfektion keine E. coli-Kolonien gebildet (**Fig. 25A**). Nur E. coli mit den richtigen Expressionsplasmiden bilden Kolonien. Die Sequenzen der Verbindungen sind schematisch in der **Fig. 25B** angegeben.

**[0327]** Die hybridisierten Oligonukleotide haben die folgende Sequenz, die eine direkte Klonierung in den Vektor auf U6-Promotor-Basis nach Sap I-Spaltung ermöglicht, wie es oben erläutert wird:

Vorwärts-Oligonukleotid:

5' -ACC-G-N18- -Schleife -N18\*-C-TTT-3'

Rückwärts-Oligonukleotid:

3' -C-N18\*-Schleife\*-N18 -GAAAAAT-5'

**[0328]** Bei der Verwendung eines PolIII-Promotors ist das erste Nukleotid zur Erleichterung der Transkription vorzugsweise ein G-Nukleotid. Daher ist die 19 nt Führungssequenz in einer bevorzugten Ausführungsform G-N18. N18\*-C ist eine Sequenz, die mit der 19 nt Führungssequenz (G-N18) Basenpaare bilden kann, Schleife ist die verbindende Schleifensequenz, Schleife\* ist komplementär zu Schleife. Siehe ebenfalls **Fig. 25B**.

**[0329]** Die Oligonukleotide sind so ausgelegt, dass sie sogar kleiner sind, d. h. 51 nt anstatt 56 Nukleotide:

Vorwärts-Oligonukleotid:

5' -CC-G-N18- - Schleife -N18\*-3'

Rückwärts-Oligonukleotid:

3' -N18\*-Schleife\*-N18 -GAA-5'

**[0330]** Der Expressionsvektor muss daher entsprechend eingestellt werden. Siehe **Fig. 26**.

**[0331]** Die vorliegende Erfindung kann ebenfalls zur Erzeugung statistischer Zielsequenzen verwendet werden, um eine undefinierte Bibliothek zu erzeugen. Die Zielsequenzen sind nicht bekannt, sie starten jedoch vorzugsweise mit einem G, so dass die Translation durch Poly III erleichtert wird. Diese Oligonukleotide können eine Bibliothek mit 418 Kombinationen ( $6,87 \times 10^{10}$ ) erzeugen.

**[0332]** Die nichtviren DNA-Expressionsbibliotheken, die wie oben beschrieben erzeugt wurden, können in krankheitsrelevanten Zellassays verwendet werden, um auf Knock-Down-induzierte Phänotypen zu screenen, und zwar durch Transfektion der DNAs als angeordnete Sammlungen mittels DNA-Übertragungsmethoden des Standes der Technik, wie Lipofectamin oder PEI. Diese Bibliotheken können auch zur Erzeugung von Sammlungen von Zelllinien mit einzelnen oder mehrfachen Genen, die stabil einem Knock-Down unterworfen wurden, verwendet werden indem ein selektierbarer Marker in dem Expressionsplasmid vor der Herstellung der Bank in dem Vektor aufgenommen wird.

**[0333]** Die einzelnen Knockdown-Konstrukte können in verschiedenen Graden gepoolt werden, d. h. in einem großen Pool von Konstrukten, oder Subsets eines solchen Pools. Die Sätze und Subsets von Pools können in krankheitsrelevanten Tests verwendet werden, wo der Phänotyp ein selektierbarer Phänotyp ist, wie ein Durchflusszytometrie-Phänotyp (beispielsweise Induktion oder Repression von Marker) oder ein Wachstumsvorteilsphänotyp.

#### Beispiel 12. Geordnete Adenovirus-Bibliothek-Konstruktion

**[0334]** Dieses Beispiel beschreibt die Konstruktion einer geordneten sRNA-Expressionsbibliothek. "Geordnete Adenovirus-sRNA-Expressionsbibliothek" steht für eine Sammlung von Adenoviren (die in Platten mit vielen Vertiefungen enthalten sind, beispielsweise Platten mit 96 oder 384 Vertiefungen), welche die Expression verschiedener (Human-)sRNAs vermitteln, worin jede Vertiefung ein einzigartiges rekombinantes Virus enthält, das ein sRNA-Expressionskonstrukt trägt, das gegen ein Gen gerichtet ist, d. h. ein Zielgen pro Vertiefung. Weitere Einzelheiten über das Konzept geordneter Adenovirusbibliotheken finden sich in WO 99/64582, US 6 340 595 und 6 413 776 (Geordnete Adenovirusbibliotheken zur Durchführung funktioneller Genomik). Geordnete Adenovirusbibliotheken, die sRNAs exprimieren, die spezifische endogene mRNAs herunter regulieren, können zur Infektion von Zellen verwendet werden, die krankheitsrelevante Human-Primärzelltypen, wie HUVECs, enthalten. Diese Tests können zum Screening auf Gene verwendet werden, die einen Stoffwechselweg spezifisch hemmen, wie den NfkappaB-Weg, über eine exprimierte sRNA, und dadurch die Hochregulation eines Cytokins, wie IL8, hemmen.

#### A. Konstruktion einer geordneten Adenovirus-sRNA-Bibliothek

**[0335]** Oligonukleotide werde so entwickelt, dass sie gegen spezifische mRNAs gerichtet sind, die von spezifischen Genen transkribiert werden und die zur Konstruktion von Knock-Down-Adenovirus-Expressionsklonen verwendet werden. Die bevorzugten Oligonukleotide sind so ausgelegt, dass die erste Sequenz (Vorwärts (F)) die Führungssequenzen gegen die Ziele enthält, die kovalent an die auf die Stamm-Schleife zweite Sequenz gebunden ist, die kovalent an die dritte Sequenz gebunden ist, die mit der ersten Sequenz Basenpaare bilden kann. Eine weitere Ausführungsform kehrt die Führungsfunktion um, was zur dritten Sequenz führt. Die Rückwärts-(R)Oligonukleotide sind komplementär zu den verwandten Vorwärts-Oligonukleotiden. Spezifische Paare von Vorwärts- und Rückwärts-Oligonukleotiden werden miteinander hybridisiert, so dass sie eine doppelsträngige Struktur bilden, die zur Klonierung in einen Expressionsvektor auf der Basis von pLPspAdapt6 (beschrieben in WO 99/64582) verwendet wird, der einen Promotor enthält, beispielsweise den Pol-III-abhängigen Iet-7- oder U6-Promotor. Die Expressionskassette kann zudem (eine) einzigartige Restriktionsenzym-Erkennungssequenz(en) enthalten, die die hybridisierten F- und R-Oligonukleotide, welche die sRNA-Sequenzen codieren, an eine endogene mRNA direktonal ligieren. Die einzelsträngigen Oligonukleotid-Komponenten

können in Platten mit 96 oder 384 Vertiefungen synthetisiert und hybridisiert werden, so dass doppelsträngige Oligonukleotide erhalten werden.

**[0336]** Die Ordnung der sRNA-Adapterplasmide wird dann wiederum in einem geordneten Format in Wirtsmikroorganismen, wie Bakterien, vorzugsweise Escherichia coli (Stamm DH10B) oder Stämme transformiert, die besser zur Vermehrung von Konstrukten geeignet sind, die Adenovirus Isoleucyl-tRNA-Synthetase enthalten. Transformierte Bakterien können auf LB-Ampicillin-Platten platziert und gezüchtet werden, wonach ein Kolonien-Aufnehmer einzelne Bakterienkolonien aussicht, und weiter flüssiges LB-Wachstumsmedium (+ 100 µg/ml Ampicillin) in Platten mit 96 Vertiefungen überimpft.

**[0337]** Das erfindungsgemäße bevorzugte Verfahren ist der Start der Flüssigkulturen direkt aus den E. coli-Transformationsplatten ohne Plattieren und Ausstechen einzelner Kolonien. In beiden Fällen werden die resultierenden Platten mit 96 Vertiefungen in einem Rotationsschüttler (New Brunswick Scientific, Innova, Bodenmodell oder Äquivalent) bei 37°C, 300 U/Min inkubiert. Nach der Anzucht der Bakterien für etwa 12 bis etwa 24 Std. werden etwa 100 µl Bakterienkulturen mit 100 µl 50% Glycerin mit einem Multimek-Roboter (Beckman Coulter) oder einem Äquivalent gemischt und bei -80°C aufbewahrt. Diese Platten werden als 'Glycerin-Stammpfatten' bezeichnet.

#### B Herstellung von Plasmid-DNA

**[0338]** Ein zweiter Schritt bei der Konstruktion der Adenovirus-sRNA-Expressionsbank ist die geordnete Reinigung von DNA einzelner Plasmide aus der Primärbibliothek in Mengen, die zur Adenovirus-Erzeugung hinreichen. Für diesen Zweck wird eine Bakterienkultur folgendermaßen hergestellt. Die Glycerinstammpfatten werden aufgetaut, und 3 µl der Bakterienkultur werden auf eine Platte mit 96 Vertiefungen, die mit 280 µl flüssigem LB-Wachstumsmedium (+ 100 µg/ml Ampicillin) gefüllt ist mit einem CybiWell-Roboter (CyBio) überführt. Diese angeimpften Platten werden dann für 18 Std. in einem Rotationsschüttler (37°C 300 U/min) (New Brunswick Scientific, Innova, Bodenmodell) inkubiert. Die Zentrifugation der Platten mit 96 Vertiefungen (3 min, 2700 rcf) wird durchgeführt, um die Bakterien zu pelletieren. Sämtliche Zentrifugationen der Platten mit 96 Vertiefungen werden in einer Eppendorf-Mikrotiterplattenzentrifuge (Typ 5810) durchgeführt. Der Überstand wird dann durch Dekantieren in einen Abfallbehälter entfernt. Die Lyse der Bakterienzellen und Fällung der Proteine und genomischen DNA erfolgt durch Ausführen des klassischen Protokolls für alkalische Lyse. Die zur Durchführung der alkalischen Lyse verwendeten Puffer wurden von Qiagen (P1, P2, P3) erstanden. In einem ersten Schritt wird das Bakterienpellet in 60 µl Puffer P1 resuspendiert. In einem zweiten Schritt werden 60 µl Puffer P2 zu den resuspendierten Bakterienzellen gegeben. Die Lösung wird behutsam gemischt und es erfolgt eine 5 min Inkubationszeit, damit eine vollständige Zelllyse erzielt wird. Anschließend werden 60 µl Puffer P3 zugegeben, und ein Mischschritt zur Fällung der Proteine und genomischen DNA ausgeführt. Die Platten mit 96 Vertiefungen werden dann zentrifugiert (40 min, 3220 rcf). Der Überstand (100 µl) wird gesammelt und auf neue Platten mit 96 V-Boden-Vertiefungen überführt, die 80 µl Isopropanol enthielten (zur Fällung der Plasmid-DNA) mit einem CybiWell-Roboter (CyBio). Die Platten, die das Pellet enthalten, werden verworfen. Die Platten mit 96 Vertiefungen werden zentrifugiert (45 min, 2700 rcf), und der Überstand wird durch Dekantieren in einen Abfallbehälter verworfen. Zur Entfernung von Salzspuren wird das Pellet mit 100 µl 70% Ethanol gewaschen, und die Platten mit 96 Vertiefungen werden erneut zentrifugiert (10 min, 2700 rcf). Der Überstand wird erneut durch Dekantieren in einem Abfallbehälter entfernt, und die DNA-Pellets werden 1 Std. in einer sterilen Werkbank 1 Std. trocknen gelassen. Schließlich wird die DNA in 20 µl sterilem TE-Puffer gelöst (1 mM Tris-HCl (pH-Wert 7,6), 0,1 mM EDTA). Die Integrität der Konstrukte wird durch Restriktionsenzymkartierung und Sequenzierung des Gesamten Arrays oder von Teilen davon bestimmt. Platten, die die gelöste DNA enthielten (weiter definiert als DNA-Platten) werden bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

#### C. DNA-Quantifizierung

**[0339]** Vor der Verwendung zur Transfektion von PER.C6/E2A-Zellen, werden die Plasmid-DNA-Präparate, die in den Platten mit 96 Vertiefungen enthalten sind, quantifiziert. Zu diesem Zweck werden 5 µl Plasmid-DNA von den DNA-Platten pipettiert und in eine Platte mit 96 Vertiefungen überführt, die 100 µl TE-Puffer enthält. 100 µl der 'Quantifizierungslösung' werden zugegeben. Diese Lösung wird hergestellt durch Lösen von 2 µl SybrGreen (Molecular Probes) in 10 ml TE-Puffer. Nach einem Mischschritt erfolgt die Messung in einem Fluorimeter (Fluostar, BMG) mit den folgenden Einstellungen: Emission: 485 nm; Anregung: 520 nm; Verstärkung 35. Eine Standard-Kurve wird erzeugt durch Ausführen einer Messung mit verschiedenen Verdünnungen (in TE-Puffer) einer Standard-DNA-Probe (Lambda-DNA). Durch Anpassen der Ergebnisse für die einzelnen DNA-Proben auf dieser Kurve wird die DNA-Konzentration pro Vertiefung berechnet. Die mittlere DNA-Kon-

zentration pro Vertiefung für jede DNA-Platte wird dann berechnet. Im Durchschnitt wird eine DNA-Konzentration von 20 bis 100 ng/ $\mu$ l DNA erhalten.

#### D. Transfektion der Per.C6/E2A-Zellen

**[0340]** Die pIPspAdapt6-Plasmid-Versionen enthalten den 5'-Teil (bp 1-454 und bp 3511-6093) des Adenovirus-Serotyp 5-Genoms, wobei das E1-Gen deletiert ist, und ein Promotor (von Let-7 oder Pol III-hergeleitet) wird eingebracht. Im Gegensatz zu dem Plasmid pIPspAdApt6 haben die sRNA-Expressionsderivate von pIPspAdapt keinen CMV-Promotor und keine SV40-Polyadenylierungsstelle. Zwei andere Materialien, die zur Erzeugung von rekombinanten Adenovirus-Teilchen benötigt werden, sind ein Cosmid und eine Verpackungszelllinie (WO99/64582. US 6 340 595). Das Cosmid (pWE/Ad.AfIII-rITR $\Delta$ E2A) enthält den Hauptteil des Adenovirus-Serotyp 5-Genoms (bp 3534-25953), aus dem das E2A-Gen deletiert ist. Die Per.C6/E2A-Verpackungszelllinie wird von Human-Embryo-Retinazellen (HER) hergeleitet, die mit Plasmiden transzisiert sind, welche die Expression der E1- und E2A-Gene vermitteln. Die Adenovirus-Gene, die in das Genom der PER.C6/E2A-Zelllinie integriert sind, weisen keine Homologie mit den Adenovirussequenzen auf dem Adapterplasmid und dem Cosmid auf. Folglich werden Vektor-Stammsubstanzen hergestellt, die frei von replikationskompetenten Adenoviren (RCAS) sind.

**[0341]** Zur Gewinnung der Viren wird dieses Adapterplasmid mit dem Cosmid in eine Verpackungszelllinie Per.C6/E2A cotranszisiert. Sobald die Adapter- und die Helperplasmide in die PER.C6/E2A-Zelllinie transzisiert sind, wird das vollständige Ad5-Genom durch homologe Rekombination wiederhergestellt. Die Helper- und Adapter-Plasmide enthalten homologe Sequenzen (bp 3535-6093), welches Substrate für dieses Rekombinationsereignis sind. Die DNA-Platten, die wie vorstehend beschrieben hergestellt und quantifiziert werden, werden zur Transfektion der PER.C6/E2A-Zelllinie verwendet. Vor dieser Transfektion werden die Plasmide, die in diesem Platten enthalten sind, durch Spaltung mit dem PI-PspI-Restriktionsenzym (New England Biolabs) linearisiert. Für diesen Zweck wird ein bestimmtes Volumen an Plasmid-DNA (welches im Mittel 66,7 ng DNA veranschaulicht, wie berechnet aus der mittleren DNA-Konzentration von jeder DNA-Platte) aus den DNA-Platten in eine Platte mit 96 Vertiefungen pipettiert, die einen Restriktionsmix enthält, welcher aus 1x Restriktionspuffer New England Biolabs 10 mM Tris-HCl (pH-Wert 8,6), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM KCl, 1 mM DTT), 100  $\mu$ g/ml BSA und 6 Einheiten PI-PspI-Restriktionsenzym (aus einer Stammlösung mit 20 U/ $\mu$ l) besteht. Für jede DNA-Platte wird ein identisches Volumen Plasmid für alle Vertiefungen verwendet. Die Überführung der DNA-Proben von der DNA-Platte auf die Platte, die den Restriktionsmix enthält, und das nachfolgende Mischen erfolgen mit einem JoBi-Well-Roboter (CyBio). Die Platten, die den Restriktionsmix enthalten, werden dann in Kunststoffkästen überführt, die angefeuchtete Papierhandtücher enthalten (damit ein Verdampfen vermieden wird), und 4 Std. bei 65°C inkubiert. Das Helperplasmid (pWE/Ad.AfIII-rITR $\Delta$ E2A) (welches hergestellt wird im Batch mit den Qiagen Maxi-Prep-Kits), wird ebenfalls mit dem PacI-Restriktionsenzym (New England Biolabs) linearisiert.

**[0342]** Die Transfektion der PER.C6/E2A-Zellen mit den linearisierten Adapter- und Helperplasmiden wird nachstehend beschrieben. 0,1867  $\mu$ l linearisiertes Helperplasmid (mit 93 ng DNA) wird mit 1,11  $\mu$ l serumfreiem 2x DMEM (Life Technologies) gemischt, so dass ein "Helper-Mix" erhalten wird. 0,597  $\mu$ l Lipofectamin (Life Technologies) werden zu 1,11  $\mu$ l 2x DMEM gemischt, so dass ein "Lipo-Mix" erhalten wird. In jede Vertiefung der Platten mit 96 Vertiefungen, die das linearisierte Adapter-Plasmid enthalten, werden 1,3  $\mu$ l "Helper-Mix" und 1,7  $\mu$ l "Lipo-Mix", mit einem CyBi-Well-Roboter (CyBio, ausgerüstet mit einem "Ausläufer") pipettiert. Die Platten werden dann vor der Zugabe von 28,5  $\mu$ l serumfreiem DMEM etwa 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Das Mischen erfolgt durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren des Gemischs (CyBi Well Roboter). Mit der gleichen Vorrichtung werden 30  $\mu$ l des Gemischs in Platten mit 96 Vertiefungen überführt, welche PER.C6/E2A-Zellen enthielten, die mit einer Dichte von 2,25  $\times$  10<sup>4</sup> Zellen/Vertiefung angeimpft wurden. Die Zellen werden in 100  $\mu$ l PER.C6/E2A Medium (bestehend aus DMEM (Life Technologies), mit 10% FBS (Life Technologies), 50  $\mu$ g/ml Gentamycin und 10 mM MgCl<sub>2</sub>) überimpft, aber vor der Zugabe von 30  $\mu$ l des DNA/Lipofectamins-Gemischs wird das Medium aus allen Vertiefungen der Platten entfernt. Eine Inkubationszeit von drei Std. bei 39°C, 10% CO<sub>2</sub>, wird dann angewendet. Die Platten werden dann mit 170  $\mu$ l PER.C6/E2A-Medium versetzt und über Nacht bei 39°C, 10% CO<sub>2</sub>, inkubiert. Die Platten mit 96 Vertiefungen, die die PER.C6/E2A-Zellen enthalten, werden bei 34°C, 10% CO<sub>2</sub> während drei Wochen inkubiert. Diese Temperatur ermöglicht die Expression des E2A-Faktors, der für die Adenovirus-Replikation erforderlich ist. während dieser Inkubationszeit werden Viren erzeugt und repliziert, wie es durch das Erscheinen von CPE (cytopathischer Effekt) angezeigt wird. Der Prozentsatz der Vertiefungen, die CPE zeigen, wird manuell ermittelt oder mit einem automatischen Bild-Scanner und geeignetem Algorithmus, der die Bewertung der Effizienz der Virus-Produktion ermöglicht. Die Platten mit 96 Vertiefungen werden bei -80°C aufbewahrt bis zur weiteren Vermehrung der Viren.

## E. Virus-Vermehrung

**[0343]** Der endgültige Virus-Vermehrungsschritt zielt auf den Erhalt eines höheren Prozentsatzes, der CPE und homogenere Virus-Titer. Die Viren werden nach dem folgenden Verfahren vermehrt. Die bei -80°C aufbewahrten Transfektionsplatten werden bei Raumtemperatur etwa 1 Std. aufgetaut. Mit Hilfe eines 96 Kanal Hydra-Dispensers (Robbins) werden 20 µl Überstand auf PER.C6/E2A-Zellen überführt, die in Platten mit 96 Vertiefungen bei einer Dichte von  $2,25 \times 10^4$  Zellen/Vertiefung in 180 µl DMEM + 10% FBS überimpft wurden. Nach der Behandlung einer Serie mit 96 Viren werden die Nadeln des Dispensers durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren von 60 µl 5% Bleiche desinfiziert und sterilisiert. Die in den Nadeln vorhandenen Spuren von Bleiche werden durch drei aufeinander folgende Waschschrifte mit 70 µl sterilem Wasser entfernt. Die Zellen werden bei 34°C, 10% CO<sub>2</sub> für etwa 10 Tage inkubiert, und die Anzahl der Vertiefungen, die CPE zeigen, werden ausgewertet. Im Allgemeinen wird die Anzahl der Vertiefungen, die CPE zeigen, nach der Vermehrung erhöht. Die Platten werden dann bei -80°C aufbewahrt.

**[0344]** Von den 200 µl des rohen Zelllysates, das nach dem Vermehrungs-Schritt die Bibliotheks-Viren enthält, werden sechs Aliquote von 25 µl in Platten mit 384 Vertiefungen mit einem 96 Kanal Hydra-Dispenser hergestellt. Von vier Platten mit 96 Vertiefungen werden sechs identische Aliquotplatten mit 384 Vertiefungen hergestellt. Eine Desinfektion der Nadeln zwischen den einzelnen Platten wird durch einen dreifachen Waschschrift mit 200 µl 5% Bleiche und einen dreifachen Waschschrift mit 250 µl sterilem Wasser zur Entfernung der Bleichspuren erzielt. Die Aliquotplatten mit 384 Vertiefungen werden dann bei -80°C bis zur weiteren Verwendung in einem Test aufbewahrt.

**[0345]** Eine schematische Darstellung der Bibliothekskonstruktion ist in der **Fig. 7** gezeigt.

**[0346]** Zudem können Modifikationen der Virushüllproteine eingebracht werden, so dass ein unterschiedlicher oder verbesserter Tropismus (EP 1191105) erhalten wird.

**[0347]** Die oben beschriebenen geordneten Adenovirus-Bibliotheken können bei krankheitsrelevanten Zelltests verwendet werden, damit auf Knock-Down-induzierte Zellphänotypen gescreent wird. Solche Bibliotheken sind besonders geeignet, wenn die Adenovirusvektor-Konstrukte Adenovirusvektoren integrieren, wie beschrieben in US 6 051 430 oder WO 99/32647/EP 1042494 und Virology 2001, 30. Sep.; 288(2): 236–46. Solche Adenovirus-sRNA-Expressionsbanken führen zu einer Bibliothek von Zelllinien, in denen einzelne oder mehrfache Gene stabil einem Knock-Down unterworfen wurden. Die einzelnen Knock-Down-Adenoviren können als Arrays verwendet werden, sie können aber auch in verschiedenen Graden, d. h. Sätzen von Pools oder einem großen Pool vereinigt werden. Die Pools können dann in krankheitsrelevanten Tests verwendet werden, einschließlich Tests mit einem selektierbaren Phänotyp, wie einem Durchflusszytometer-Phänotyp (Screening auf Hochregulation oder Herunterregulation eines geeigneten Markers durch Verwendung von beispielsweise fluoreszenzmarkierten Antikörpern oder Wachstumsvorteils-Phänotyp).

## Beispiel 13. Geordnete AAV-Bibliotheks-Konstruktion

**[0348]** Dieses Beispiel beschreibt die Konstruktion einer geordneten AAV-sRNA-Expressionsbank "umfassend eine Sammlung von adenovirus-assoziierten Virus(AMV)-Vektoren, die in Platten mit vielen Vertiefungen enthalten sind, beispielsweise Platten mit 96 oder 384 Vertiefungen, und die die Expression verschiedener einzigartiger (Human-)sRNAs vermitteln. Jede Vertiefung enthält einen einzigartigen rekombinanten AAV-Vektor, der ein sRNA-Expressionskonstrukt trägt, das gegen ein spezifisches Gen gerichtet ist. Geordnete AAV-Bibliotheken, die sRNAs exprimieren, die spezifische endogene mRNAs herunterregulieren, können zur Infektion von Zellen verwendet werden, einschließlich krankheitsrelevanter Humanprimärzelltypen, wie HUVECs, beispielsweise zur Untersuchung auf Gene, die einen Stoffwechselweg, wie NfkappaB-Weg, durch eine exprimierte sRNA spezifisch hemmen und dadurch die Produktion von einer oder mehreren Cytokinen, wie IL8, herunterregulieren.

## A. Konstruktion der sRNA-Bibliothek auf AAV-Basis.

**[0349]** Es werden Oligonukleotide entwickelt, die gegen spezifische mRNAs gerichtet sind, die aus spezifischen Genen transkribiert werden und zur Konstruktion von Knock-Down-AAV-Expressionsklonen verwendet werden. Die bevorzugten Oligonukleotide werden wie oben beschrieben (Beispiel 12) entwickelt. Spezifische Paare von Vorwärts- und Rückwärts-Oligonukleotiden werden aneinander hybridisiert und bilden eine Duplex-Struktur, die zur Klonierung in einen AAV-Expressionsvektor verwendet wird, bestehend aus AAV-ITR-Sequenzen, einem AAV-Verpackungs-Signal (siehe US 6 140 103) und einem Promotor, beispielsweise dem polIII-

abhängigen let-7- oder U6-Promotor. Die Expressions-Kassette kann zudem eine oder mehrere einzigartige Restriktionsenzym-Sequenzen enthalten, damit die hybridisierten F- und R-Oligonukleotide direktonal ligiert werden.

**[0350]** Das Array der sRNA-AAV-Ligationen wird dann wieder in einem geordneten Format in Wirtsorganismen transformiert, wie Bakterien, vorzugsweise Escherichia coli (Stamm DH10B) oder Stämmen, die besser zur Vermehrung der Konstrukte geeignet sind, die AAV-ITRs enthalten. Transformierte Bakterien können auf LB-Ampicillin-Platten mit 6 Vertiefungen plattiert und gezüchtet, wonach ein Kolonien-Aufnehmer einzelne Bakterienkolonien aussticht und weiter in flüssiges LB-Wachstumsmedium (+100 µg/ml Ampicillin) in Platten mit 96 Vertiefungen überimpft, gefolgt von Plasmid-DNA-Isolation.

**[0351]** Das bevorzugte erfindungsgemäße Verfahren ist der Start der Flüssigkulturen direkt aus den E. coli-Transformations-Platten ohne Plattieren und Ausstechen einzelner Kolonien. In beiden Fällen werden die resultierenden Platten mit 96 Vertiefungen in einem Rotationsschüttler (New Brunswick Scientific, Innova, Bodenmodell oder Äquivalent) bei 37°C, 300 U/min. inkubiert. Nach dem Züchten der Bakterien für etwa 12 bis etwa 24 Std. werden dann etwa 100 µl Bakterienkulturen mit 100 µl 50% Glycerin mit einem Multimek-Roboter (Beckman Coulter) oder einem Äquivalent gemischt und bei -80°C aufbewahrt. Diese Platten werden als 'Glycerin Stammplatten' definiert. Aus diesen 'Glycerin-Stammplatten' kann Plasmid-DNA wie in Beispiel 12 präpariert und quantifiziert werden.

#### B. Transfektion von Zellen zur Erzeugung von AAV Virions in geordnetem Format.

**[0352]** Für die Erzeugung von geordneten AAV-Sammlungen, werden AAV-Virions aus den geordneten sRNA-AAV-Plasmid-DNAs produziert, die unter A beschrieben sind, wobei eine AAV-Verpackungszelllinie oder ein transientes AAV-Verpackungssystem verwendet wird. Eine AAV-Verpackungszelllinie oder Derivat davon, wie beschrieben in US 6 140 103 kann verwendet werden. Alternativ können transiente Cotransfektion der geordneten sRNA-AAV-DNA mit rep-cap-Expressionskonstrukten ohne Verpackungssignal mit den sRNA-AAV-Konstrukten oder einer anderen Überlappung mit den sRNA-AAV-Konstrukten an Zellen durchgeführt werden, die mit psoralen-behandeltem Adenovirus infiziert sind, so dass in trans die nötigen Helfergene des Helfer-Adenovirus bereitgestellt werden. Für beide Ansätze werden die zu transfizierenden Zelllinien in Platten mit 96 Vertiefungen überimpft. Die Virusproduktion, die Vermehrung und das Titern kann mit Verfahren des Standes der Technik der AAV-Technologie erfolgen. Nach der Produktion von AAV-sRNA-Viren in Platten mit 96 Vertiefungen können sie erneut mit einem Flüssigkeits-Handler in Aliquot-Platten mit 384 Vertiefungen aliquo-tiert werden und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt werden.

**[0353]** Die oben beschriebenen geordneten AAV-Bibliotheken können in verschiedenem Maße gepoolt werden, welche sich in einem großen Pool von Retroviren oder Subsets eines solchen Retrovirus-Pools befinden. Die Sätze und Subsets der Pools können in krankheitsrelevanten Zellassays verwendet werden, damit auf Knock-Down-induzierte Phänotypen gescreent wird. Diese AAV-sRNA-Expressionsbibliotheken können auch zur Erzeugung von Sammlungen von Zelllinien mit einzelnen oder mehrfachen Genen verwendet werden, die stabil einem Knock-Down unterworfen wurden.

#### Beispiel 14

**[0354]** Retrovirus-Bibliotheken, die sRNA exprimieren In diesem Beispiel wird das Retrovirus-Plasmid LZRSpBMN-LacZ auf der Basis des Moloney-Maus-Leukämie-Virus verwendet (Kinsella TM und Nolan GP (1996). Episomenvektoren produzieren stabil und rasch rekombinannten Hochtiter-Retrovirus. Hum. Gene Ther. 7: 1405–13).

#### A. Konstruktion der sRNA-Bank auf Retrovirus-Basis.

**[0355]** In LZRSpBMN-Lacz ersetzt das LacZ-Gen die env-Pol-Sequenzen. Zudem sind das EBV-EBNA-1-Gen und der EBV-oriP-Replikationsursprung in dem Plasmid-Gerüst zugegen. Diese ermöglichen eine episomale Replikation des Plasmids in den Verpackungszellen. Auf diese Weise kann ein Hochtiter-Überstand nach einer transienten Transfektion der Verpackungszellen erzeugt werden. Transfizierte Zellen können ausgewählt werden, da ein Puromycin-Resistenz-Gen unter der Kontrolle des Phosphoglycerin-Kinase-1-Promotors ebenfalls im Plasmidgerüst zugegen ist. Die Anzucht der transfizierten Verpackungszellen in der Anwesenheit von Pur-tomycin erzeugt einen Überstand mit ungewöhnlich hohem Titer.

**[0356]** Zur Expression der chimären RNAs wie oben beschrieben wird der LZRSBMN-LacZ-Vektor weiter modifiziert durch Ersetzen des LacZ-Gens für eine Expressions-Kassette. Diese Expressions-Kassette enthält einen überall aktiven Promotor, insbesondere einen Promotor, der durch RNA-Polymerase III (pol III-Promotor) erkannt wird, einschließlich, aber nicht eingeschränkt auf U6- und Iet-7-Promotoren. Die Expressions-Kassette kann in einer beliebigen Reihenfolge an verschiedenen Positionen in dem Virusgerüst des Retrovirus-Vektors kloniert werden, wie es dem Fachmann bekannt ist (siehe beispielsweise Medina, MF, Joshi S. RNA-Polymerase III-getriebene Expressions-Kassetten in der Human-Gentherapie. Curr. Opin. Mol. Ther. 1999 Okt.; 1(5) : 580–94.

**[0357]** Die Expression-Kassette enthält zudem eine oder mehrere einzigartige Restriktionsenzym-Erkennungssequenzen (siehe Beispiel 10) zur direktonalen Ligierung und Klonierung der hybridisierten F- und R-Oligonukleotide, die die sRNA codieren, an eine endogene mRNA.

**[0358]** Oligonukleotide werden wie oben beschrieben entwickelt. Spezifische Paare von Vorwärts- und Rückwärts-Oligonukleotiden werden aneinander hybridisiert und bilden eine Duplex-Struktur, die zum Klonieren in einen modifizierten LZRSBMN-LacZ-Vektor oder ein Äquivalent verwendet werden. Die einzelsträngigen Oligonukleotid-Komponenten können in Platten mit 96 oder 384 Vertiefungen synthetisiert und hybridisiert werden, so dass die doppelsträngigen Oligonukleotide erhalten werden.

**[0359]** Die geordnete Bibliothek der Retrovirus-Plasmid-sRNA-Ligationen wird dann wiederum in einem geordneten Format, in Wirts-Mikroorganismen, wie Bakterien, vorzugsweise Escherichia coli (Stamm DH10B) oder Stämme transformiert, die besser zur Vermehrung dieser Konstrukte geeignet sind. Transformierte Bakterien können auf LB-Ampicillin-Platten mit 6 Vertiefungen plattiert und gezüchtet werden, wonach ein Kolonien-Aufnehmer einzelne Bakterienkolonien aussticht und weiter in 300 µl flüssiges LB-Wachstumsmedium (+100 µg/ml Ampicillin) in Platten mit 96 Vertiefungen überimpft, gefolgt von Plasmid-DNA-Isolation.

**[0360]** Das bevorzugte erfindungsgemäße Verfahren ist der Beginn der Flüssigkulturen direkt aus den E. coli-Transformationsplatten mit 96 Vertiefungen und das Aufnehmen einzelner Kolonien. In beiden Fällen werden die Platten mit 96 Vertiefungen in einem Rotationsschüttler (New Brunswick Scientific, Innova, Bodenmodell oder Äquivalent) bei 37°C, 300 U/min inkubiert. Nach dem Züchten der Bakterien für etwa 12 bis etwa 24 Std. werden dann etwa 100 µl Bakterienkulturen mit 100 µl 50% Glycerin mit einem Multimek-Roboter (Beckman Coulter) oder einem Äquivalent gemischt und bei -80°C aufbewahrt. Diese Platten werden als 'Glycerin-Stamplatten' definiert. Aus diesen 'Glycerin-Stamplatten' kann Plasmid-DNA hergestellt werden und wie in Beispiel 12 beschrieben quantifiziert werden.

## B. Transfektion und Virus-Sammlung

**[0361]** Eine geeignete Verpackungs-Zelllinie wird anschließend zur Erzeugung einer geordneten Retrovirus-Bibliothek aus den gereinigten Retrovirus-Plasmid-sRNA-Konstrukten verwendet. Eine geeignete Verpackungszelllinie wird von Phoenix (φNX) Verpackungszellen (Nolan GP und Shatzman AR (1988) Expression vectors and delivery systems, Curr. Opin. Biotechnol. 9: 447–450) bereitgestellt, aber andere Verpackungszellen können gleichermaßen geeignet sein. Die Phoenix-Zellen exprimieren die gag/pol- und env-Proteine aus zwei verschiedenen Konstrukten, so dass die Wahrscheinlichkeit zur Erzeugung replikationskompetenter Retroviren minimiert wird. Darüber hinaus ermöglicht die Anwesenheit eines Selektionsmarkers auf jedem dieser Konstrukte die Selektion von Zellen, die diese zurückbehalten haben.

**[0362]** Ökotrophe Verpackungszellen (φNX-E) produzieren Retroviren, die nur Nagetierzellen infizieren können, wohingegen Viren, die in amphotrophen (φNX-A) Verpackungszellen erzeugt werden, Zellen unterschiedlicher Herkunft infizieren können. φNX-Zellen haften nicht sehr gut an den Gewebe-Petrischalen. Man muss darauf achten, dass die Trypsinisierung so kurz wie möglich ist, und dass die Zellen nicht unter Konfluenz- oder Superkonfluenz-Bedingungen wachsen.

**[0363]** Die Transfektion von Verpackungszellen erfolgt routinemäßig mittels Standard-Calcium-Cofällung, aber andere Verfahren können gleichermaßen geeignet sein, wie Lipofectamin und PEI (siehe ebenfalls WO 99/64582, US 6 340 595 und US 6 413 776). Darum wird die Zelllinie in Platten mit 96 Vertiefungen überimpft. Die Virusproduktion, Vermehrung und Titrierung kann mit Verfahren des Standes der Technik der Retrovirusvektor-Technik erfolgen. Nach der Produktion der Retrovirus-sRNA-Viren in Platten mit 96 Vertiefungen können die transfigurierten Zellen mit einem Flüssigkeits-Handler in Platten mit 384 Vertiefungen aliquotiert werden.

**[0364]** Zur Isolation der Viruspartikel kann das Sammeln des retrovirushaltigen Überstandes 24 Std. nach Transfektion starten, indem das Medium durch frisches Kulturmedium ersetzt wird. Ein 24 Std.-Sammlungszeitraum ist für einen Überstand mit hohem Titer gewöhnlich hinreichend. Zu diesem Zweck wird das Kulturmedium behutsam aus der Schale entnommen, bei  $3000 \times g$  zentrifugiert und aliquotiert. Die Aliquote können bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt werden und sind für mindestens sechs Monate stabil.

**[0365]** Alternativ können die Zellen trypsinisiert werden, so dass man auf transfizierte Zellen selektiert, und auf eine frische Platte überführt werden, die Medium enthält, das mit 2,5 mg/ml Puromycin angereichert ist. Die Selektion muss für einen Mindest-Zeitraum von 8 Tagen durchgeführt werden. Nach diesem Zeitraum wird das Medium durch normales Medium ohne Puromycin ersetzt. 24 Std. wird der Überstand gesammelt, indem das Medium durch frisches Kulturmedium ersetzt wird. Der Überstand wird bei  $3000 \times g$  zentrifugiert und in Aliquots bei  $-80^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert.

**[0366]** Die vorstehend beschriebenen geordneten Retrovirusbibliotheken können in krankheitsrelevanten Zellassays verwendet werden, so dass auf Knock-Down-induzierte Phänotypen untersucht wird. Es können auch diese retroviraalen sRNA-Expressionsbibliotheken verwendet werden, um Sammlungen von Zelllinien mit einzelnen oder mehreren Genen zu erzeugen, die einem stabilen Knock-Down unterworfen wurden.

**[0367]** Die einzelnen Knock-Down-Retroviren wie die anderen Elemente auf Vektor-Basis der vorstehend genannten Bibliotheken können in verschiedenen Graden gepoolt werden, d. h. in einem großen Pool von Retroviren oder in Subsets eines solchen Retrovirus-Pools. Die Sätze und Subsets der Pools können dann in krankheitsrelevanten Tests verwendet werden, wobei der Phänotyp ein selektierbarer Phänotyp ist, wie ein Durchflusszytometrie-Phänotyp (beispielsweise Induktion oder Repression von Marker) oder Wachstumsvorzeils-Phänotyp.

Beispiel 15 siRNA zur Unterdrückung der Expression exogener Gene während der Virusproduktion

**[0368]** Nichteinschränkende Beispiele mittels sRNA zum Knock-Down der Expression exogener Gene während der Adenovirus- und Retrovirus-Produktion werden nachstehend dargestellt.

Adenovirus-Produktion:

**[0369]** Die einzigartigen Sequenzen zwischen dem Transkriptionsstart des CMV-Promotors und dem Polylinker des Adenovirus-Vektors pIPsPAdapt 6 werden zum Herunterregulieren der Gene verwendet. Diese Sequenzen sind immer Teil der transkribierten mRNA und unabhängig von der Sequenz des toxischen Proteins, und sind nachstehend aufgeführt (SEQ ID NR: 97).

5' - TCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGAA  
CCGATCCAGCCTCCGGCCGGAACGGTGCATTGGAAGCTTGGTACCGGTGAATTGCGCGCC-3'

**[0370]** Alternativ können einzigartige Nukleinsäuresequenzen in der mRNA, die das toxische Protein codieren, als Zielsequenz für Knock-Down-Konstrukte verwendet werden. Polynukleotidsequenzen der Erfindung, die gegen diese Sequenzen oder einen Vektor gerichtet sind, der die Polynukleotidsequenzen codiert, werden mit dem oder den Virusplasmid(en) in die Verpackungszellen cotransfiziert, so dass die exogene Proteinproduktion unterdrückt wird. Alternativ können die erfindungsgemäßen Polynukleotidsequenzen oder ein Vektor, der die Polynukleotidsequenzen codiert, stabil in die Verpackungszellen integriert werden.

Produktion von Retrovirus:

**[0371]** Der Retrovirus-Vektor, der das exogene Gen enthält, enthält ein Verpackungssignal, das von zwei Spleißstellen umgeben ist, der Spleiß-Donorstelle und der Spleißakzeptorstelle. Die Replikation der Virus-RNA erfordert die Transkription des vollständigen Vektors. Das Verpackungssignal wird jedoch zur Produktion von mRNA vor der Proteinproduktion ausgespleißt. Zur Ermöglichung der Replikation der Virus-RNA, aber zur Unterdrückung der Expression des exogenen Gens, werden die Sequenzen neben der Spleißdonorstelle und der Spleißakzeptorstelle als Ziel für die erfindungsgemäßen Polynukleotidsequenzen verwendet. Die erste Sequenz der Polynukleotidsequenz besteht aus dem Komplement dieser zwei Teile, die kovalent gebunden sind, und die eine einzigartige Sequenz in der mRNA bilden, die das toxische Protein codiert. Der erste Teil ist komplementär zu etwa 9 bis 11 Nukleotiden der Sequenz stromauwärts der Spleißdonorsequenz, und der

zweite Teil ist komplementär zu etwa 9 bis 11 Nukleotiden der Sequenz stromabwärts der Spleißakzeptorsequenz. Wenn die RNA zur Produktion einer mRNA gespleißt wird, werden die Sequenz stromaufwärts der Spleißdonorstelle und die Sequenz stromabwärts der Spleißakzeptorstelle miteinander verbunden und werden das Ziel, das das vorstehend beschriebene Polynukleotid komplementär, wodurch der Abbau und der Knock-Down der gespleißten mRNA-Sequenz herbeigeführt wird. Die ungespleißte provirale RNA-Sequenz unterliegt keinem Knock-Down, da die beiden Zielsequenzen nicht verbunden sind.

**[0372]** Wiederum werden die Polynukleotidsequenzen wie oben beschrieben oder ein Vektor, der die Polynukleotidsequenzen codiert, mit dem oder den Virusplasmid(en) in die Verpackungszellen cotransfiziert, so dass die exogene Proteinproduktion unterdrückt wird. Alternativ können die Polynukleotidsequenzen stabil in die Verpackungszellen integriert werden.

### Patentansprüche

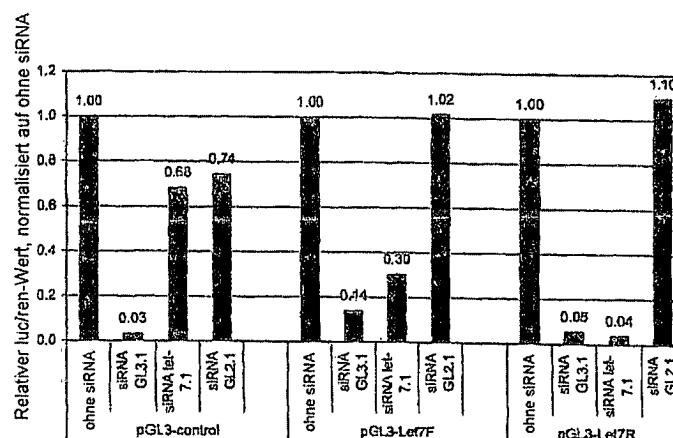
1. Vektor, der sich für die Transfektion von Wirtszellen eignet, umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das sich für den Abbau eines spezifischen mRNA-Moleküls in einer Wirtszelle eignet, umfassend eine erste Leit-Polynukleotidsequenz, die aus 19 bis 22 Nukleotiden besteht und zu 19 bis 22 Nukleotiden der spezifischen mRNA-Sequenz in der Wirtszelle komplementär ist, wobei die erste Sequenz mit einer zweiten Sequenz, die zur Bildung einer Stamm-Schleife-Struktur fähig ist, wenn es sich bei der zweiten Sequenz um eine RNA-Sequenz handelt, kovalent gebunden ist, wobei die erste Sequenz im Wesentlichen aus einem Einzelstrang-DNA-Äquivalent einer RNA-Sequenz besteht und wobei das Polynukleotid weiterhin eine dritte Sequenz, die aus 19 bis 22 Nukleotiden besteht, die zu der ersten Sequenz komplementär ist und mit dem distalen Ende der zweiten Sequenz kovalent gebunden ist, umfaßt und wobei alle Nukleotide in der ersten und dritten Sequenz miteinander eine Basenpaarung eingehen wobei die Nukleotide der ersten und dritten Sequenz alle einer in der spezifischen mRNA gefundenen Sequenz entsprechen und wobei ein pol-III-Promotor stromaufwärts von der ersten Sequenz liegt.
2. Vektor nach Anspruch 1, wobei die zweite Sequenz mindestens eine Enzymspaltstelle enthält.
3. Vektor nach Anspruch 2, mit mindestens zwei Enzymspaltstellen.
4. Vektor nach Anspruch 2 oder 3, wobei mindestens eine der Enzymspaltstellen im Stammabschnitt der Stamm-Schleife-Struktur liegt.
5. Vektor nach den Ansprüchen 2, 3 oder 4, wobei mindestens eine Enzymspaltstelle zwischen der ersten Sequenz und der zweiten Sequenz insertiert ist.
6. Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Funktion der mit der ersten Sequenz assoziierten Expressionsprodukte unbekannt ist.
7. Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei der Promoter aus der Gruppe 5S-rRNA, tRNAs, VA-RNAs, Alu-RNAs oder U6 kleine nukleäre RNA stammt.
8. Vektor nach einem der Ansprüche 1–7, welcher ein Adenovirusvektor ist.
9. In-vitro-Verfahren zur Reduktion der Menge von mindestens einer in einer Wirtszelle befindlichen RNA-Sequenz, bei dem man die Zelle mit einem Vektor nach den Ansprüchen 1–8, wobei die erste Sequenz zu der RNA-Sequenz komplementär ist, transfiziert.
10. In-vitro-Verfahren zur Bestimmung der Funktion einer natürlich vorkommenden Polynukleotidsequenz, bei dem man eine Wirtszelle mit einem Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 8 transfiziert, wobei der Vektor eine Polynukleotidsequenz, die zu dem natürlich vorkommenden Polynukleotid komplementär ist, beinhaltet, und man eine Veränderung des Zellphänotyps nachweist.
11. Bibliothek von Vektoren nach den Ansprüchen 1 bis 8.
12. Bibliothek nach Anspruch 11, wobei es sich bei den Vektoren um virale Vektoren handelt.
13. Bibliothek nach Anspruch 12, wobei es sich bei den Vektoren um Adenovirus-Vektoren handelt, wobei die Adenovirus-Vektoren vorzugsweise replikationsdefizient sind.

14. Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 5 zur Verwendung als Arzneimittel.
15. Verwendung eines Vektors nach den Ansprüchen 1 bis 5 zur Herstellung eines Arzneimittels für die Verringerung der Mengen an spezifischer RNA oder an von RNA translatiertem Protein.

Es folgen 34 Seiten Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

Figur 1



Figur 2

<i>5'-Extension</i>	<i>let7-Anisense</i>	<i>Schleife</i>	<i>let7-Sense</i>	<i>3'-Extension</i>
NT_011523.4 H s22_11680 Homo sapiens Chromosom 22				
TTGGGG.	TGAGGTAGTAGGTT GTATAGT	TTGGGGCTCTGCCCTGC TATGGATA	ACTATACAATCTAC TGTCTTT	CCTGAA
NT_009215.3 H s11_9372 Homo sapiens Chromosom 11				
TCCCAAGT.	TGAGGTAGTAGGTT GTATAGT	TTAGAATTACATCAAGG GAGATA	ACTGTACAGCCTCC TAGCTTT	CCTTGGG
NT_025808.2 H Hs9_25964 Homo sapiens Chromosom 9				
GTGGGA.	TGAGGTAGTAGGTT GTATAGT	TTTAGGGTCACACCCAC CACTGGAGATA	ACTATACAATCTAC TGTCTTT	CCTAAC
NT_025808.2 H s9_25964 Homo sapiens Chromosom 9, A				
TTGCTCTATCA GAG.	TGAGGTAGTAGATT GTATAGT	TGTGGGTAGTGATTTC ACCCCTTCAGGAGATA	ACTATACAATCTAT TGCCTT	CCCTGAGGA GTAG
NT_011512.3 H Hs21_11669 Homo sapiens Chromosom 21; 21 D				
GTCATCC GGGT.	TGAGGTAGTAGGT GTATGGT	TTAGAGTTACACCCCTGG GAGTTA	ACTGTACACCTTC TAGCTT	CCCTGGAG CACAC
NT_011799.5 H sX_11956 Homo sapiens Chromosom : X; X B				
GTCCTGTGG GA	TGAGGTAGTAGATT GTATAGT	TTTAGGGTCATACCCCA TCTTGGAGATA	ACTATACAGTCTAC TGTCTT	TCCCACGGT GGTAC
NT_011091.5 H s19_11248 Homo sapiens Chromosom 19; 19 C				
CCTGCCCGGCC CCCCGGGC	TGAGGTAGGAGGT GTATAGT	TGAGGAGGACACCAAG GAGATC	ACTATACGGCCTCC TAGCTT	TCCCCAGGC TCCGCCCTG CAGGGACG GGGCCCCGGC GGG

Figur 3

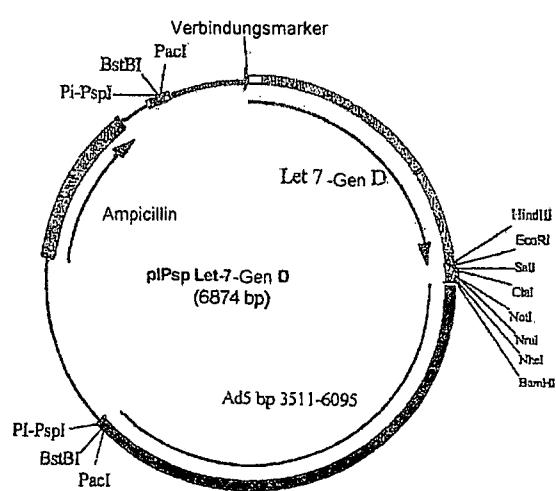
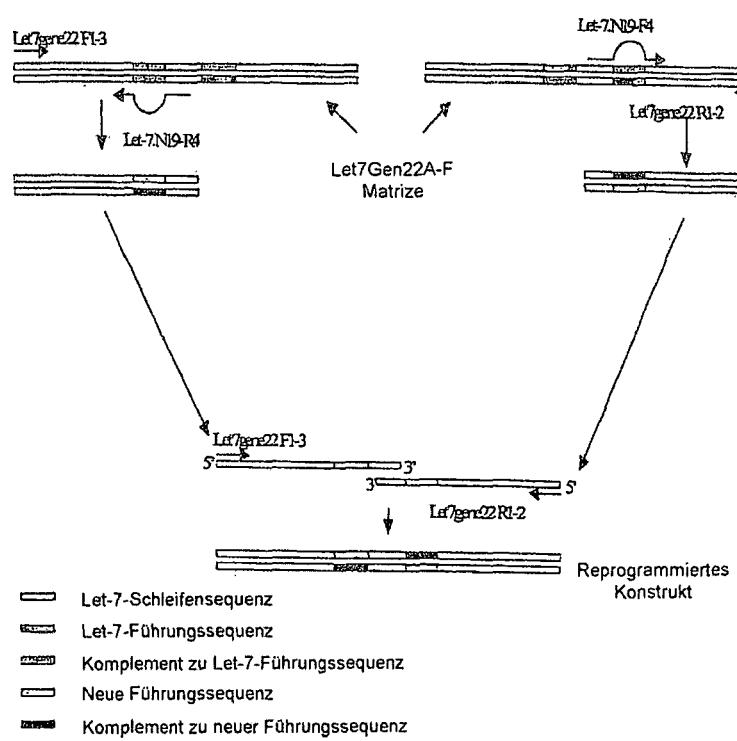
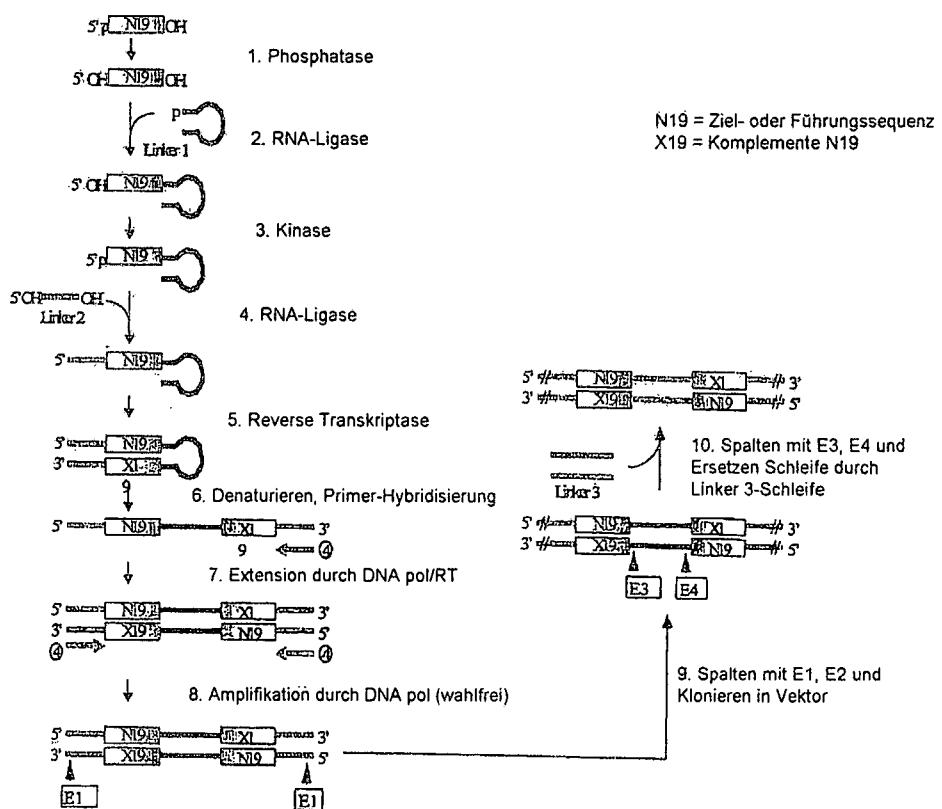


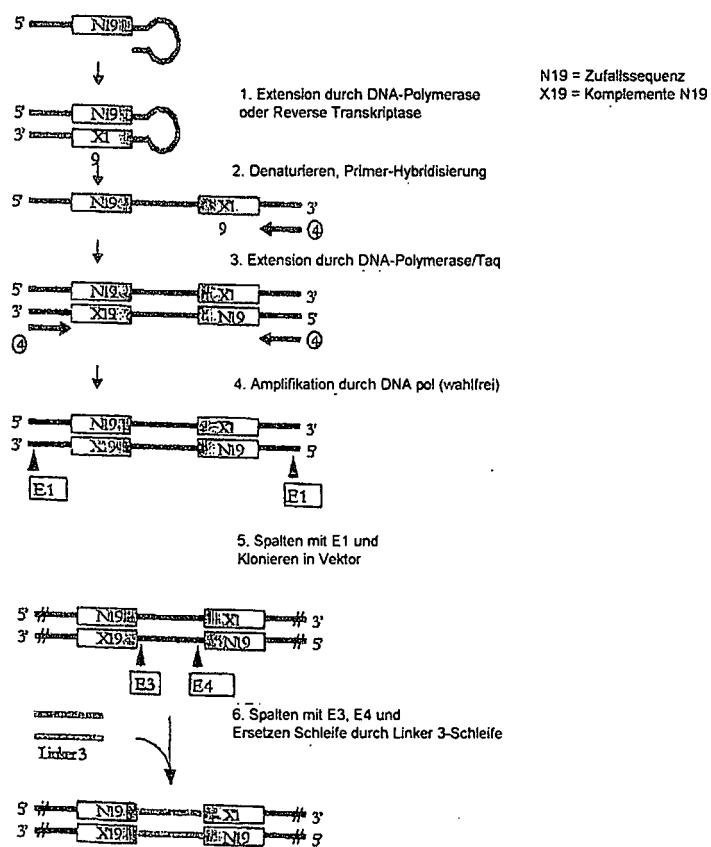
Figure 4

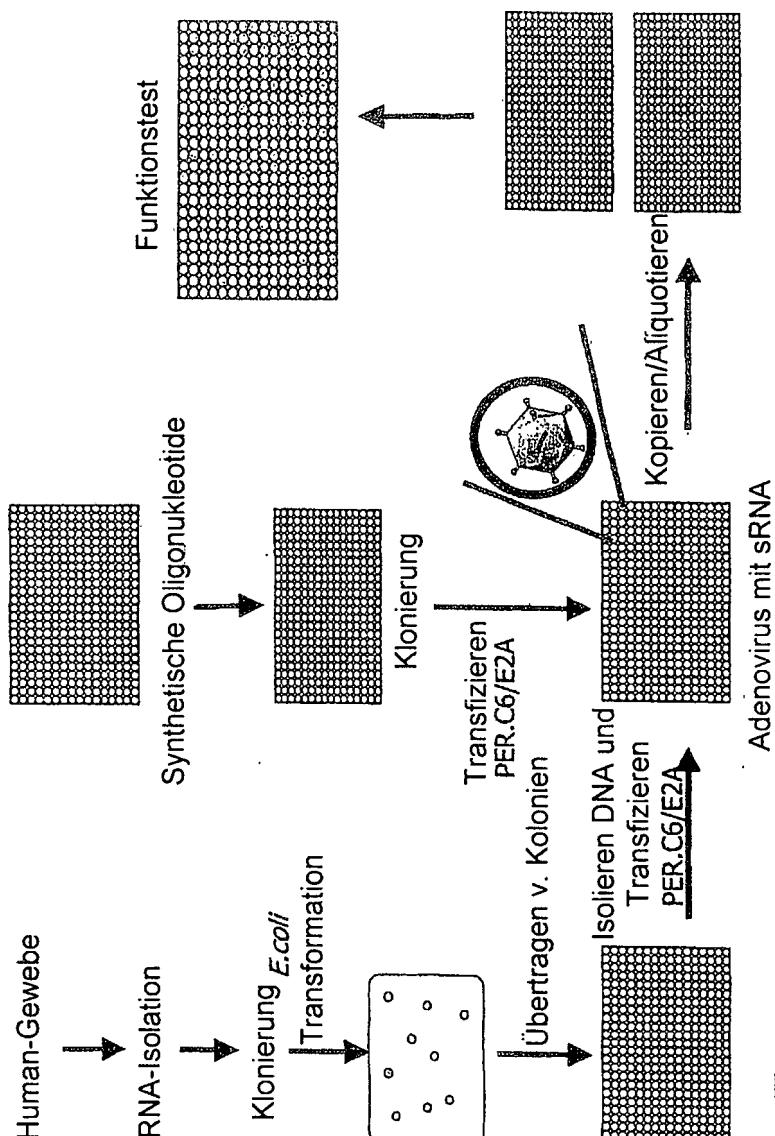


Figur 5



Figur 6

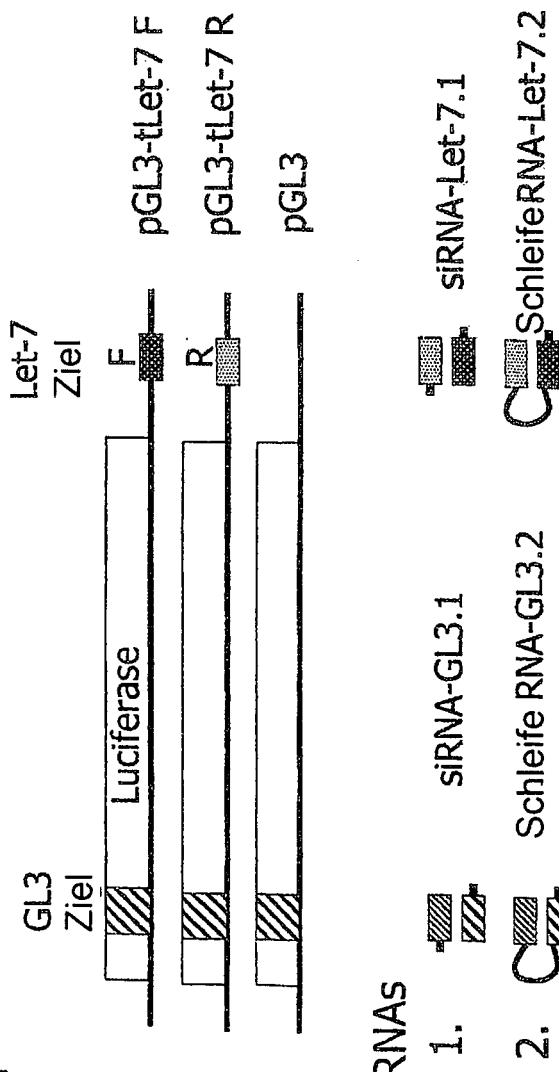




Figur 7

# Das Reportersystem

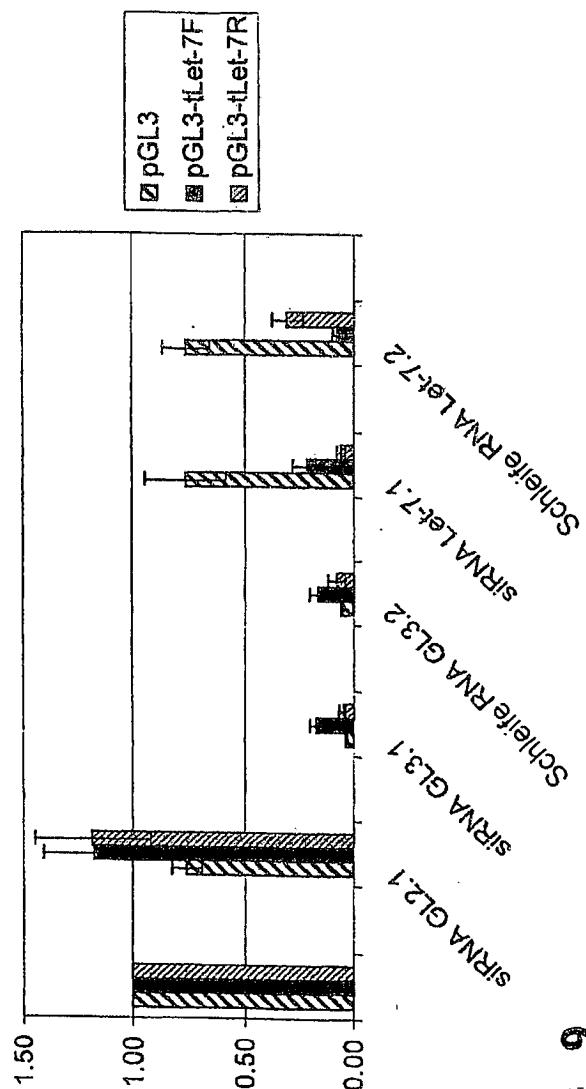
## Reporterkonstrukte



Figur 8

# Ergebnisse

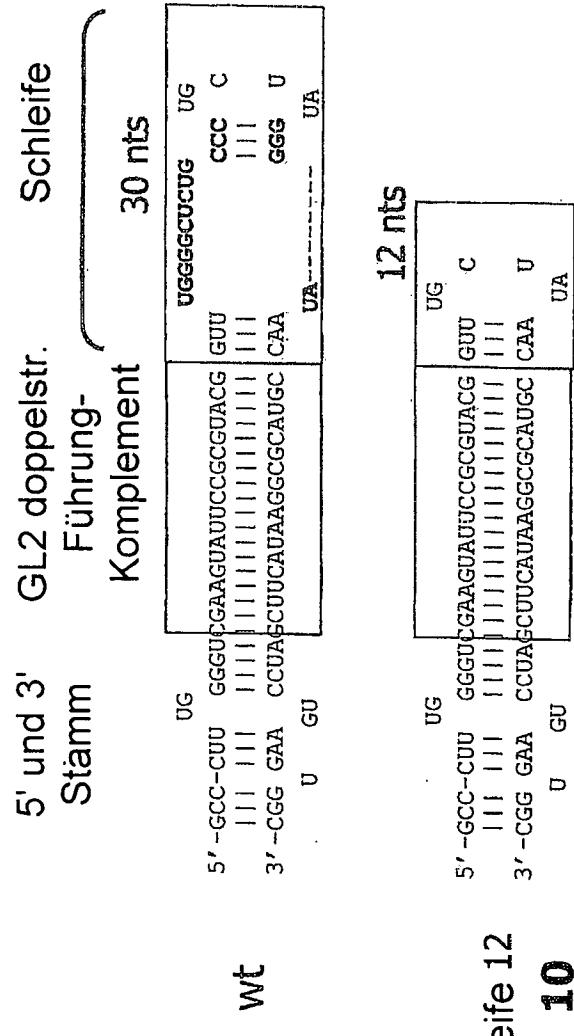
## RNA-Cotransfektion



Figur 9

# Let-7 RNA Sekundärstrukturen

## Let7-gGL2-Schleife 12

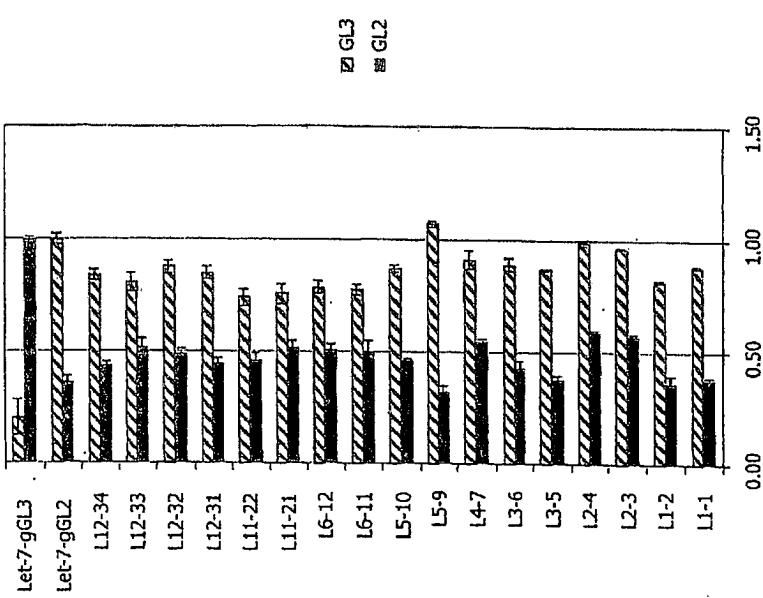
**Figur 10**

## Adenovirus-Vektor-Entwicklung

Reduzieren der Schleifengröße: von miR und Let-7 hergeleitet

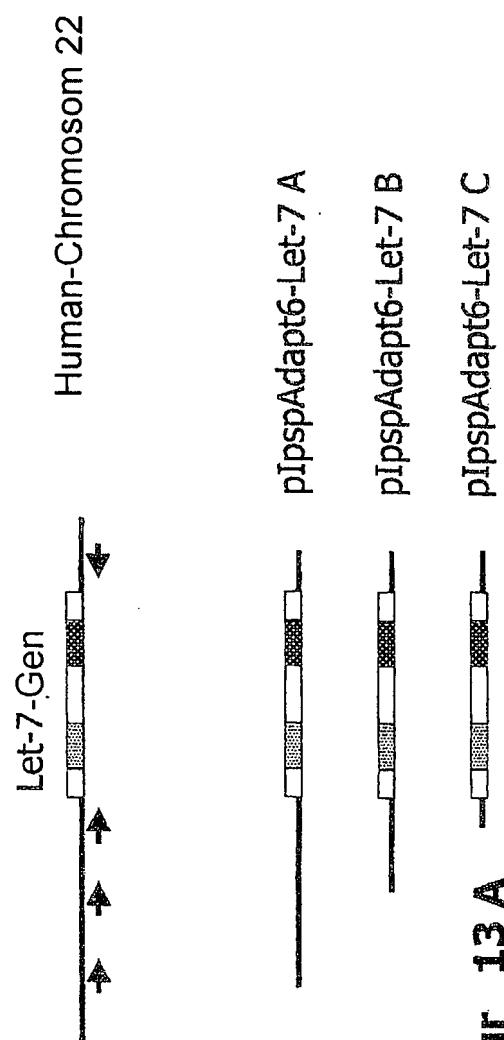
Name	hergel.	Schleifensequenz	Schleifengröße (nts)
Let-7 L1:	mir-26b	GT- GTGTGCTGTCC-	AC- 15
Let-7 L2:	mir-26b	- GTGTGCTGTCC-	- 11
Let-7 L3:	mir-28	GT- TTACCTTTCTGA-	AC- 16
Let-7 L4:	mir-28	- TTACCTTTCTGA-	- 12
Let-7 L5:	mir-31	GT- TTGAACTGGAA-	AC- 16
Let-7 L6:	mir-31	- TTGAACTGGAA-	- 12
Let-7 L11:	Let7L	GT- TGCTCTGCTA -	AC- 14
Let-7 L12:	Let7L	GT- TTGCTATA -	AC- 12

Figur 11



Figur 12

## Genomische Human-Let-7-Konstrukte



Figur 13 A

## Let-7-Genexpressions-Konstrukte

Reporterkonstrukte und Let-7-Plasmide

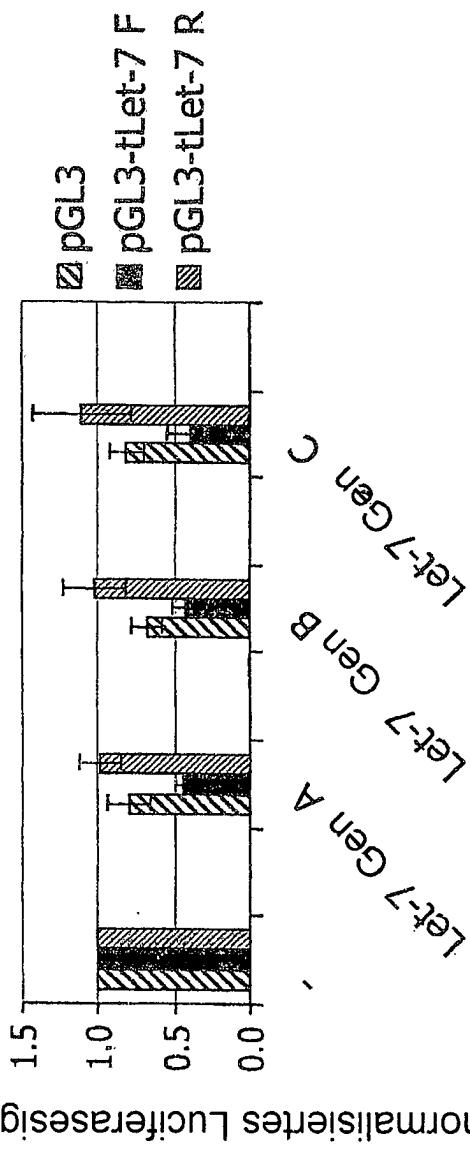
pGL3 Reporter-Plasmide



**Figur 13 B**

# Ergebnisse

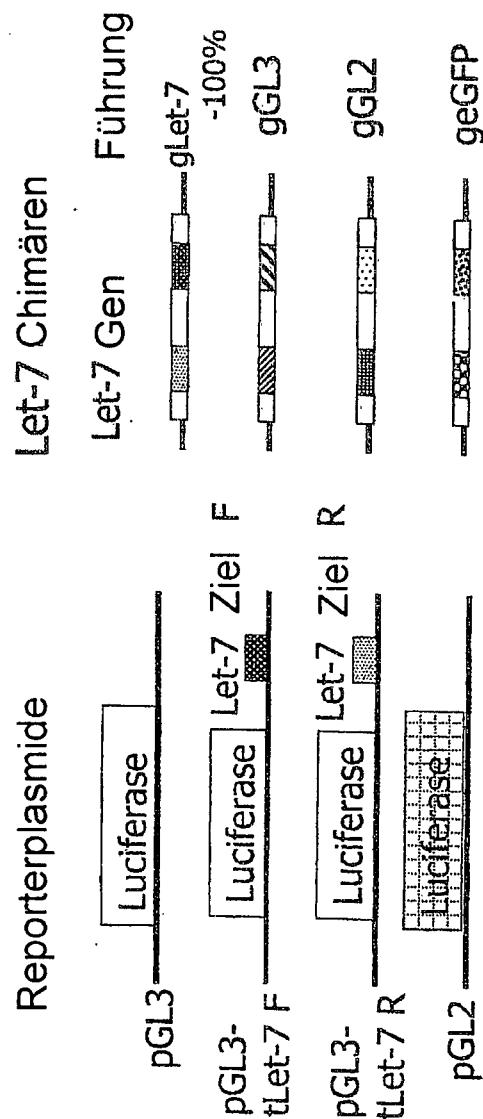
## Let-7 Genkonstrukte Cotransfektion



Figur 14

# Reprogrammierte Let-7-Chimären

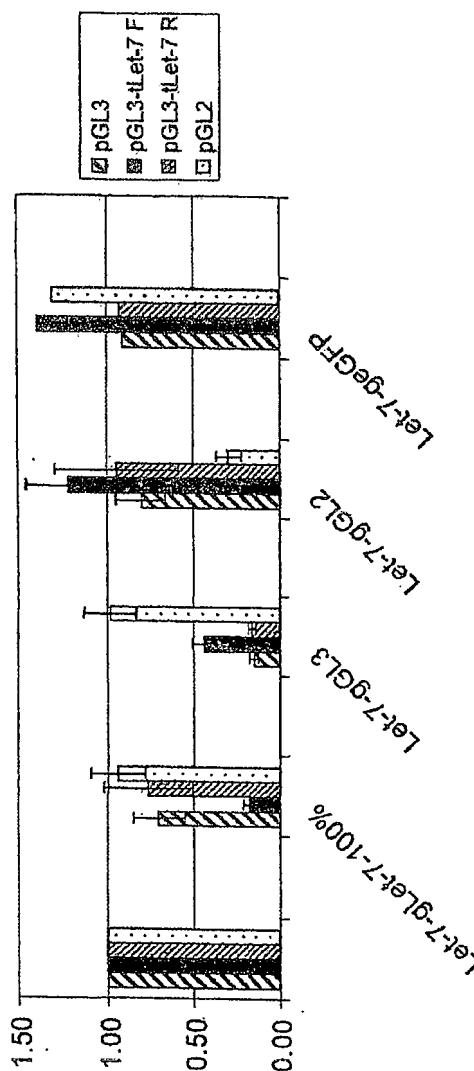
## Reporterkonstrukte und Let-7-Chimären-Konstrukte



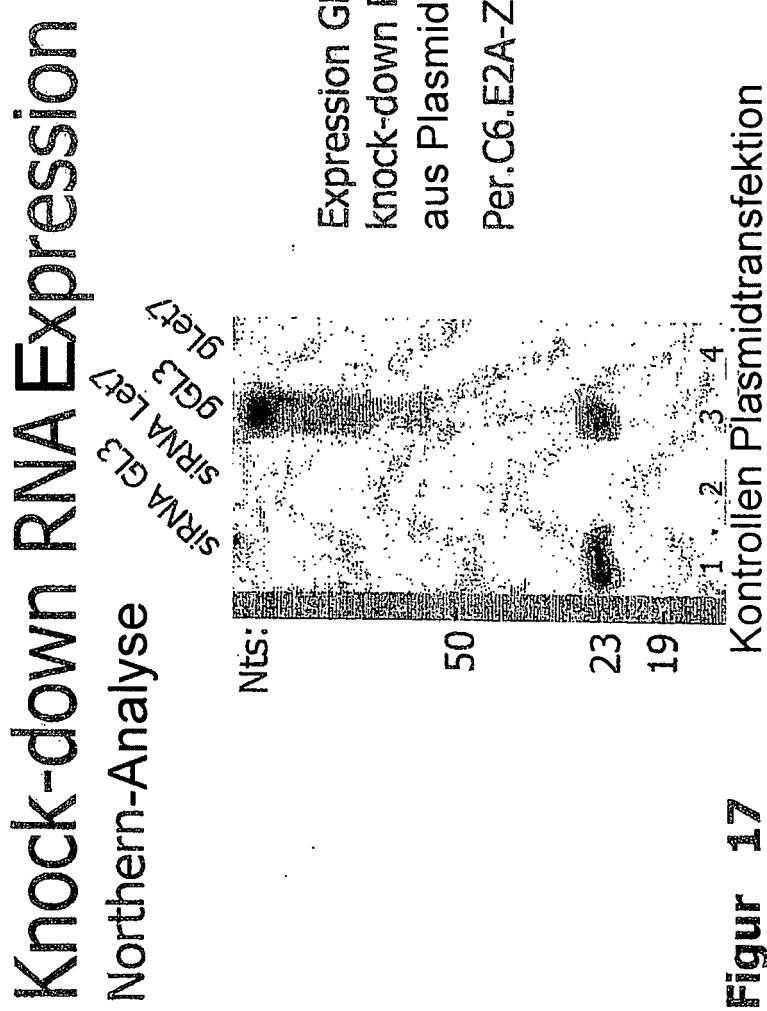
Figur 15

## Ergebnisse

### Reprogrammierte Let-7-Chimären Cotransfektion

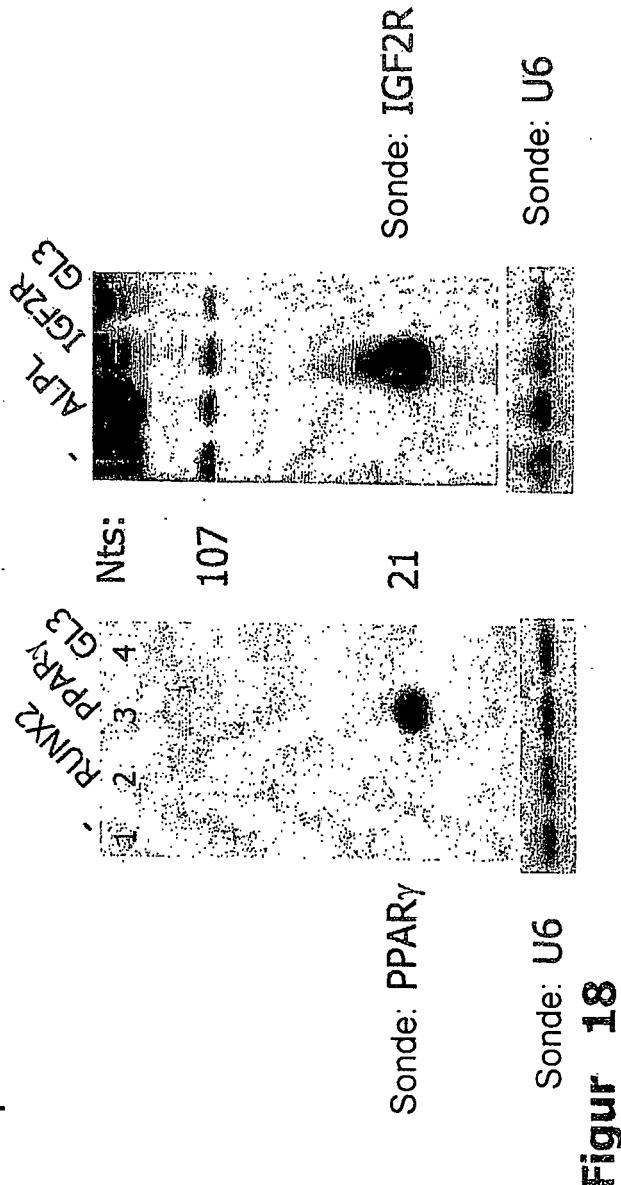


Figur 16



**Figur 17**

## Plasmidexpression Expression kleiner RNA in PER.C6.E2A



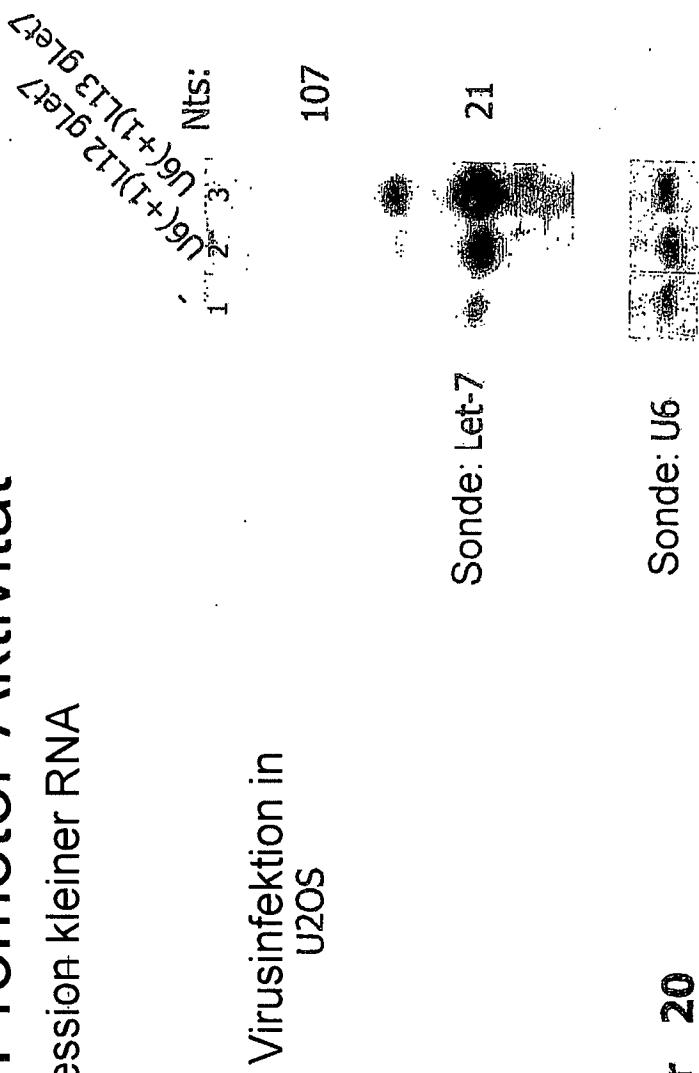
**Figur 18**

## Promotor-Varianten



Figur 19

## U6-Promotor-Aktivität Expression kleiner RNA



Figur 20

# Promotor-Varianten

## Plasmidtransfektion

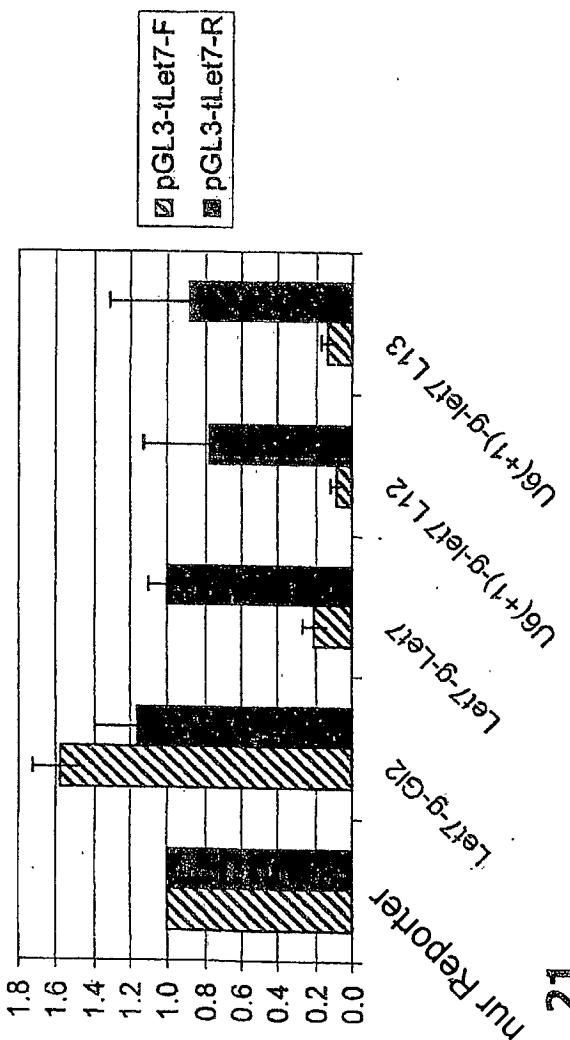
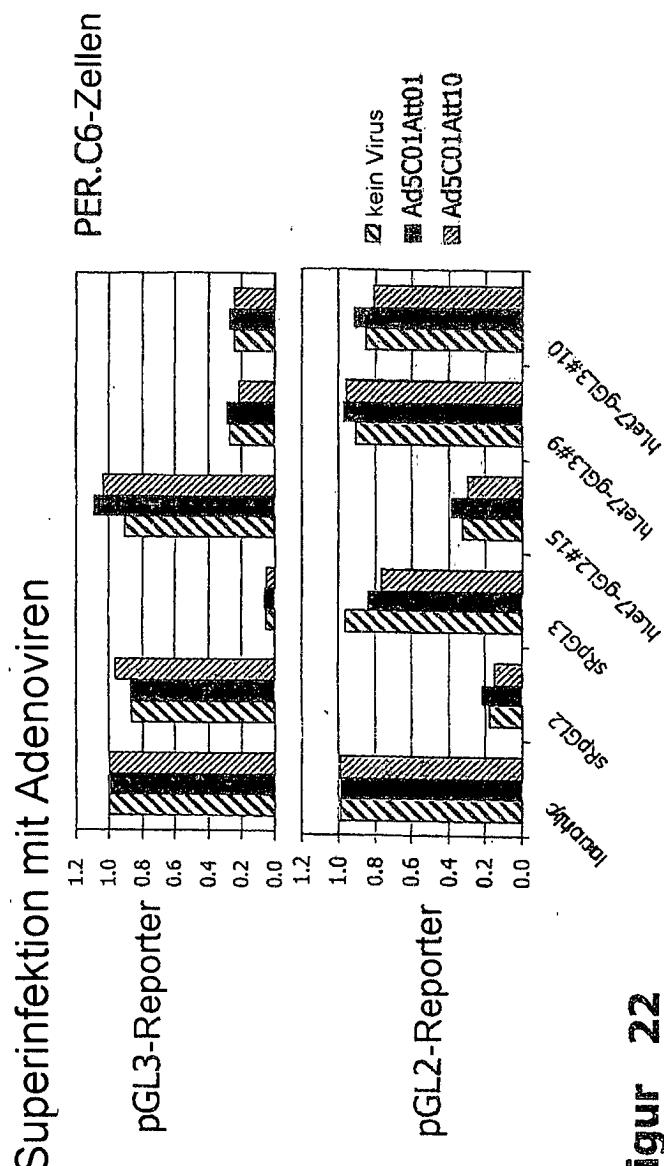


Figure 21

# Transfektion von Ad-EGFP



Figur 22

## Virus-Knock-Down

RNA-Expression

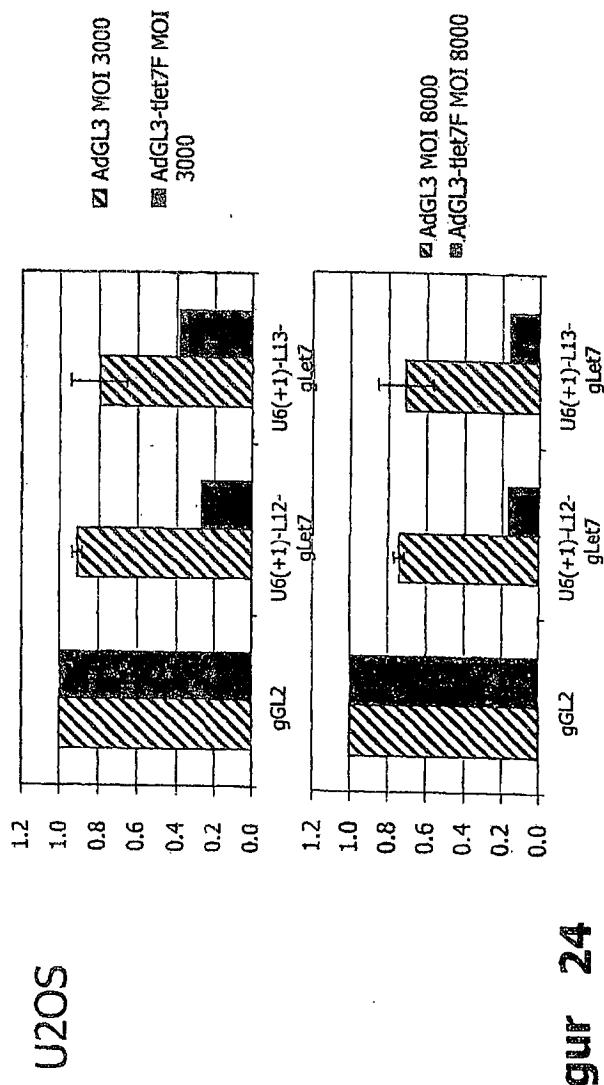
# Expression GL3 knock-down RNA aus Adenovirus U2OS-Zellen

## Adenoinfektion Kontrollen

FIGURE 23

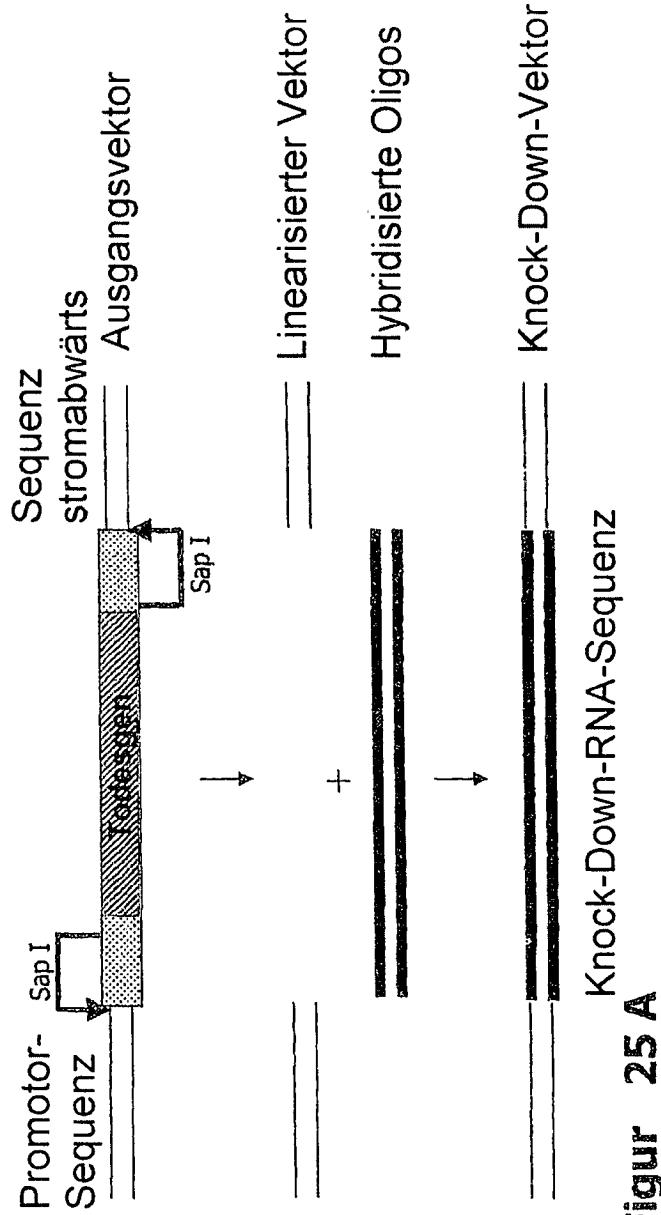
# Virus-Knock-Down

## Coinfektion von Adenovirus-Reporter-Konstrukten



Figur 24

## Vektor-Entwicklung



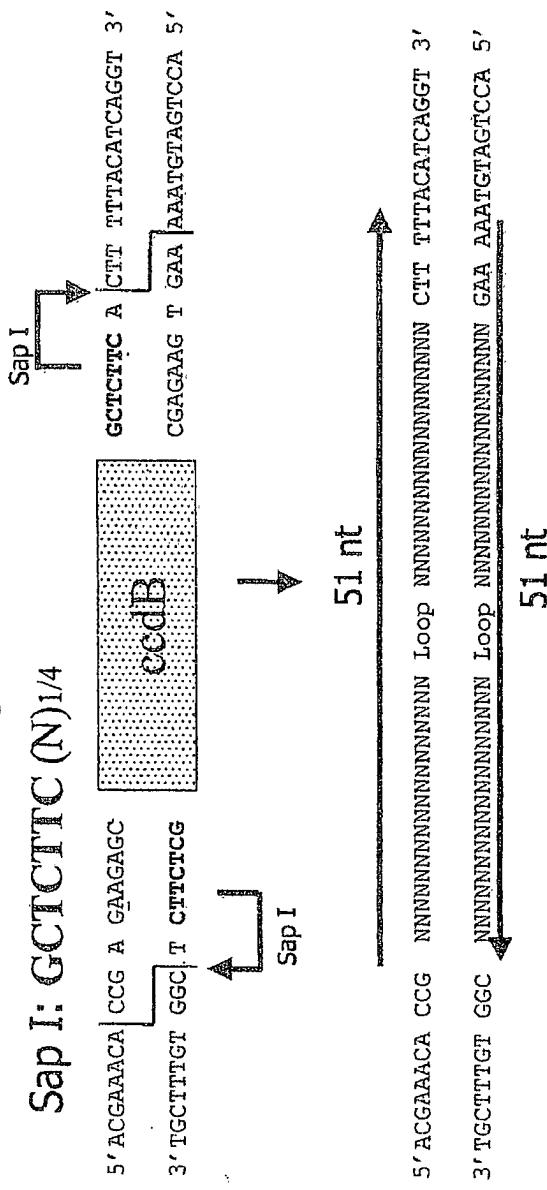
Figur 25 A  
Knock-Down-RNA-Sequenz



# Adenovirus-Vektor-Entwicklung

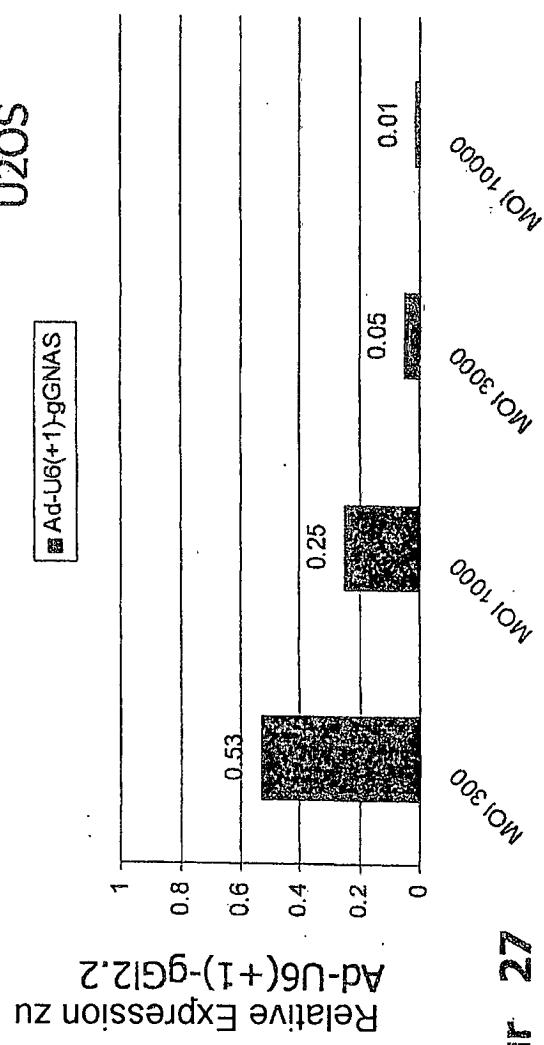
## Knock-down Klonierungsvektor

Sap I: GCTCTTC (N)<sup>1/4</sup>



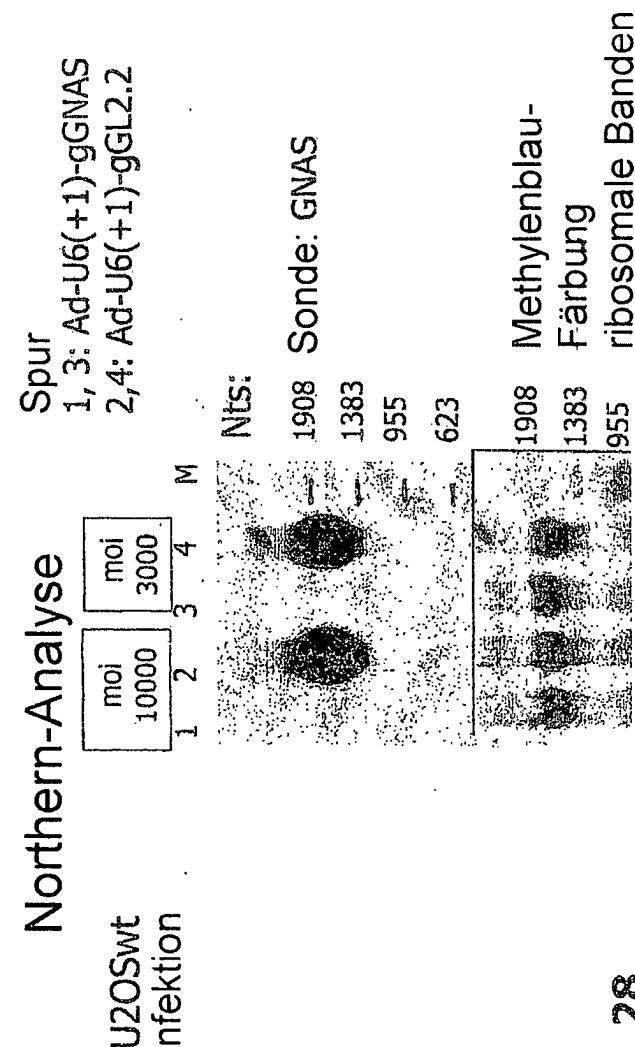
Figur 26 Option 2

# Virus-Knock-Down endogenes Ziel Echtzeit-PCR

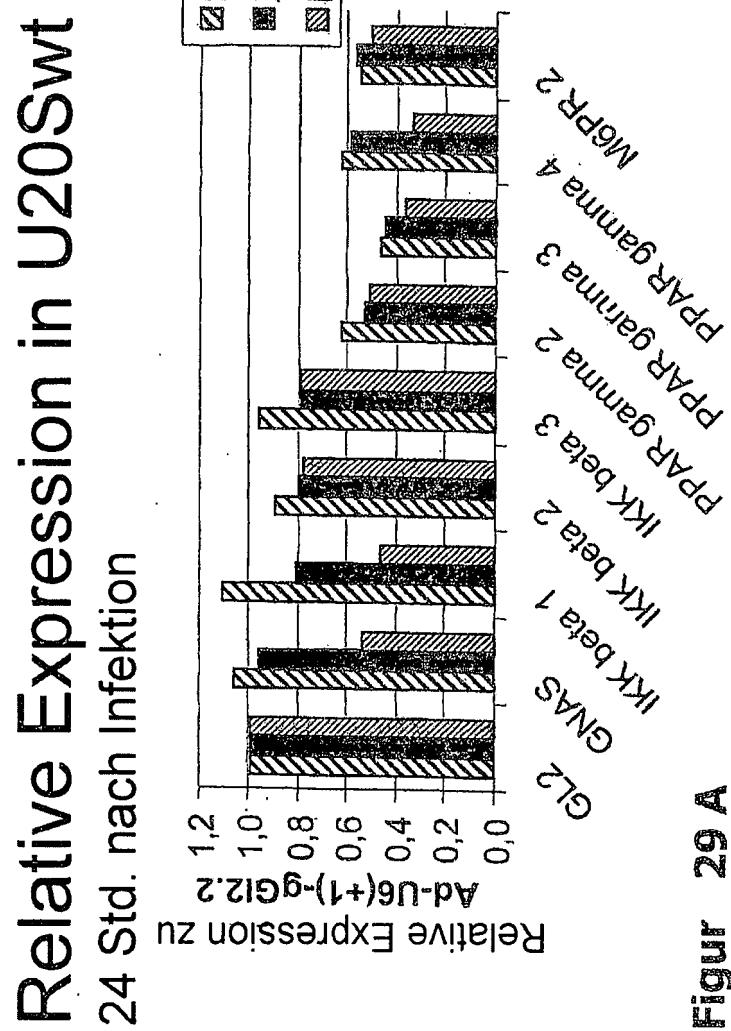


Figur 27

## Virus-Knock-Down endogenes

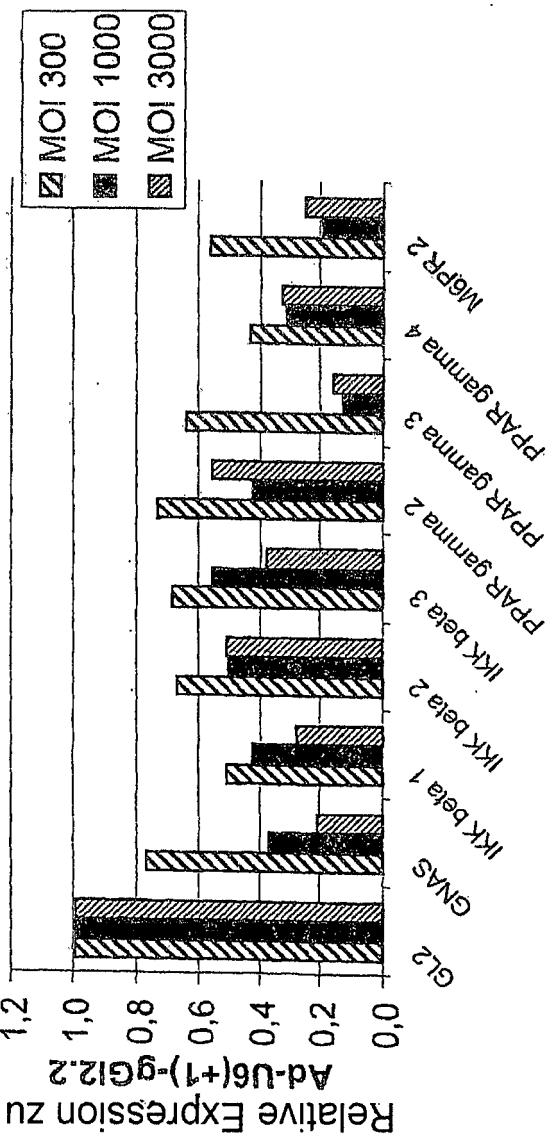


Figur 28



Figur 29 A

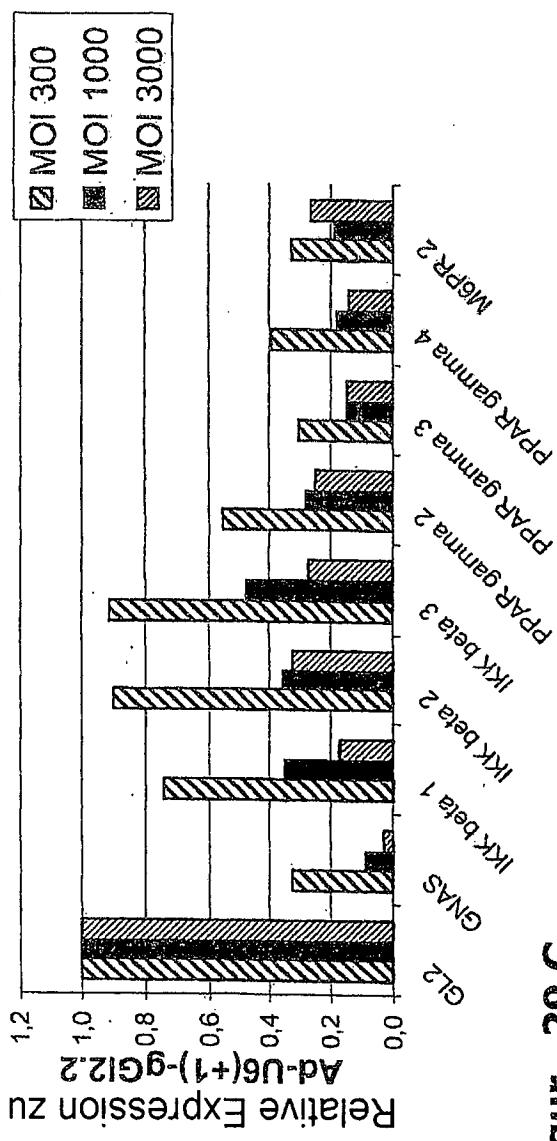
Relative Expression in U20Swt  
48 Std. nach Infektion



Figur 29 B

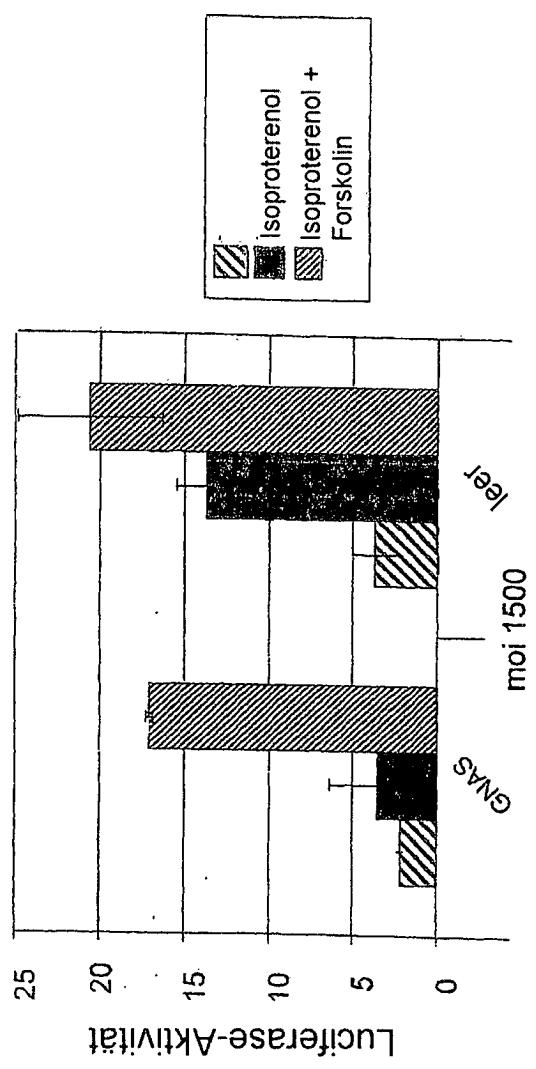
# Relative Expression in U20Swt

144 Std. nach Infektion



**Figur 29 C**

## Functionelles Knock-Down von GNAS



Figur 30