

(12) **Übersetzung der neuen europäischen
Patentschrift**

(97) Veröffentlichungsnummer: EP 1527176

(96) Anmeldenummer: 2003784183
(96) Anmeldetag: 05.08.2003
(45) Ausgabetag: 14.02.2020

(51) Int. Cl.: **C12N 15/11** (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(30) Priorität:
05.08.2002 EUROPÄISCHES PATENTAMT
02017601 beansprucht.
12.08.2002 US 402541 P beansprucht.
10.04.2003 EUROPÄISCHES PATENTAMT
03008383 beansprucht.

(97) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
04.05.2005 Patentblatt 05/18

(97) Bekanntmachung des Hinweises auf die
Patenterteilung:
03.01.2007 Patentblatt 07/01

(97) Hinweis auf Einspruchsentscheidung:
22.03.2017 Patentblatt 17/12

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB
GR HU IE IT LI LU MC NL PT RO SE SI SK TR

(56) Entgegenhaltungen:
Die Entgegenhaltungen entnehmen Sie bitte der
entsprechenden europäischen Druckschrift.

(73) Patentinhaber:
Silence Therapeutics GmbH
D-13125 BERLIN (DE)

(72) Erfinder:
GIESE, KLAUS
10779 BERLIN (DE)
KAUFMANN, JÖRG
13437 BERLIN (DE)
KLIPPEL-GIESE, ANKE
10779 BERLIN (DE)

(74) Vertreter:
Patentanwaltskanzlei Matschnig & Forsthuber OG
WIEN

(54) **WEITERE NEUE FORMEN VON INTERFERIERENDE RNS MOLEKÜLE**

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Ribonukleinsäure umfassend eine doppelsträngige Struktur, wobei die doppelsträngige Struktur einen ersten Strang und einen zweiten Strang umfasst, wobei der erste Strang einen ersten Abschnitt aus zusammenhängenden Nukleotiden umfasst und wobei der erste Abschnitt vollkommen komplementär zu der Ziel-Nukleinsäure ist, und der zweite Strang einen zweiten Abschnitt aus zusammenhängenden Nukleotiden umfasst, wobei der zweite Abschnitt vollkommen identisch zu einer Ziel-Nukleinsäure ist, die Verwendung einer derartigen Ribonukleinsäure, eine Zelle bzw. ein Organismus, der eine derartige Ribonukleinsäure umfasst, eine Zusammensetzung, die eine derartige Ribonukleinsäure enthält, eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine derartige Ribonukleinsäure enthält, und ein Verfahren zum Inhibieren der Expression eines Zielgens.

RNA-vermittelte Interferenz (RNAi) ist ein post-transkriptioneller Gen-Abschaltmechanismus, der durch doppelsträngige RNA (dsRNA), die hinsichtlich ihrer Sequenz zu dem abgeschalteten Gen homolog ist, initiiert wird. (Fire (1999), Trends Genet 15, 358-63, Tuschl, *et al.* (1999), Genes Dev 13, 3191-7, Waterhouse, *et al.* (2001), Nature 411, 834-42, Elbashir, *et al.* (2001), Nature 411, 494-8, für eine Übersicht siehe Sharp (2001), Genes Dev 15, 485-90, Barstead (2001), Curr Opin Chem Biol 5, 63-6). RNAi ist weitgehend verwendet worden, um die Genfunktion bei einer Anzahl von Organismen zu bestimmen, einschließlich Pflanzen (Baulcombe (1999), Curr Opin Plant Biol 2, 109-13), Nematoden (Montgomery, *et al.* (1998), Proc Natl Acad Sci U S A 95, 15502-7), *Drosophila* (Kennerdell, *et al.* (1998), Cell 95, 1017-26, Kennerdell, *et al.* (2000), Nat Biotechnol 18, 896-8). Bei den Nematoden *C. elegans* ist bereits ein Drittel des Genoms Gegenstand einer funktionellen Analyse durch RNAi gewesen (Kim (2001), Curr Biol 11, R85-7, Maeda, *et al.* (2001), Curr Biol 11, 171-6).

Bis vor kurzem war RNAi bei Säugerzellen im Allgemeinen nicht anwendbar mit Ausnahme der frühen Mausentwicklung (Wianny, *et al.* (2000), Nat Cell Biol 2, 70-5). Die Entdeckung, dass die Transfektion mit Duplexen aus 21-ntin Säugetierzellen die Genexpression störte und keine Sequenz-unabhängige Interferon-getriebene anti-virale

Antwort induzierte, die üblicherweise mit langer dsRNA erhalten wird, führte zu neuen potentiellen Anwendungen bei differenzierten Säugerzellen (Elbashir et al. (2001), Nature 411, 494-8). Interessanterweise ähneln diese kleinen interferierenden RNAs (siRNAs) den Verarbeitungsprodukten aus langen dsRNAs, was einen möglichen Umgehungsmechanismus bei differenzierten Säugetierzellen nahelegt. Der Dicer-Komplex, ein Mitglied der RNase III-Familie, der für das initiale Verarbeiten von dsRNA erforderlich ist, ist identifiziert worden (Bernstein, *et al.* (2001), Nature 409, 363-6, Billy, *et al.* (2001), Proc Natl Acad Sci U S A 98, 14428-33). Eines der früher aufgetretenen Probleme bei der Verwendung von nicht-modifizierten Ribooligonukleotiden war der schnelle Abbau in Zellen oder sogar im Serum-enthaltenden Medium (Wickstrom (1986), J Biochem Biophys Methods 13, 97-102, Cazenave, *et al.* (1987), Nucleic Acids Res 15, 10507-21). Es wird von der speziellen Gen-Funktion und den speziellen Testsystemen, die verwendet werden, abhängen, ob der entsprechende Knock-Down, der durch transfizierter siRNA induziert wird, lang genug aufrechterhalten werden wird, um eine phänotypische Änderung zu erreichen.

Parrish S. et al. (Molecular Cell, Band 6, 1077-1087, November, 2005) beschreiben die Erfordernisse von dsRNAs, die auf das unc 22-Gen von *C. elegans* abzielen. Genauer wird der Einfluss von chemischer Modifikation auf bestimmte Nukleotide untersucht, wobei ob ein Nukleotid modifiziert wird, von der Chemie des Nukleotids abhängt. Die veröffentlichte internationale Patentanmeldung WO 02/055693 offenbart die Verwendung von RNAi-Molekülen mit einer doppelsträngigen Struktur, wobei ein derartiges RNAi-Molekül einen Überhang an einem Ende aufweist, der aus 1 – 4 Nukleotiden gebildet ist.

Die veröffentlichte internationale Patentanmeldung WO 02/044321 offenbart die Verwendung von RNAi-Molekülen mit einer doppelsträngigen Struktur, wobei derartige RNAi-Moleküle eine Länge von 19 – 23 Nukleotidpaaren aufweisen.

Die veröffentlichte internationale Patentanmeldung WO 95/13834 offenbart chimäre Oligonukleosidverbindungen, die bei der Aktivierung von RNAase H-vermittelter Spaltung von Ziel-Nukleinsäuresequenzen nützlich sind. Genauer sind derartige chimäre Oligonukleoside einzelsträngige Oligonukleotide, die zu einer Ziel-Nukleinsäure komplementär sind.

Das der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Problem bestand darin, synthetische interferierende RNA-Moleküle bereitzustellen, die sowohl stabil als auch in einer biochemischen Umgebung wie beispielsweise einer lebenden Zelle aktiv sind.

Das der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Problem wird durch den Gegenstand der beigefügten unabhängigen Ansprüche gelöst. Bevorzugte Ausführungsformen ergeben sich aus den beigefügten abhängigen Ansprüchen.

Gemäß der vorliegenden Erfindung wird eine Ribonukleinsäure bereitgestellt, bestehend aus einer doppelsträngigen Struktur, wobei die doppelsträngige Struktur einen ersten Strang und einen zweiten Strang aufweist, wobei der erste Strang aus einem ersten Abschnitt zusammenhängender Nukleotide besteht und wobei der erste Abschnitt vorzugsweise komplementär zu einer Ziel-Nukleinsäure ist, und der zweite Strang aus einem zweiten Abschnitt zusammenhängender Nukleotide besteht und wobei der zweite Abschnitt vollkommen identisch mit der Ziel-Nukleinsäure ist,

dadurch gekennzeichnet, dass

der erste Strang und der zweite Strang aus einem Muster einer Vielzahl von flankierenden Nukleotid-Gruppen bestehen, und eine Vielzahl von modifizierten Nukleotid-Gruppen dabei eine Veränderung an der 2'-Position haben, wobei innerhalb des Strangs jede modifizierte Nukleotid-Gruppe auf einer oder beiden Seiten von einer flankierenden Nukleotid-Gruppe flankiert wird,

wobei die flankierenden Nukleotide, die die flankierende Nukleotid-Gruppe bilden, unveränderte Nukleotide sind,

wobei jede Gruppe der modifizierten Nukleotide aus einem Nukleotid besteht und

wobei jede flankierende Nukleotid-Gruppe aus einem Nukleotid besteht,

jede Gruppe der modifizierten Nukleotide des ersten Strangs ist dabei an einer flankierenden Nukleotid-Gruppe am zweiten Strang ausgerichtet, wobei das endständige 5'-Nukleotid des ersten Strangs ein Nukleotid der Gruppe der modifizierten Nukleotide ist und das endständige 3'-Nukleotid des zweiten Strangs ein Nukleotid der flankierenden Nukleotid-Gruppe ist,

wobei der erste Strang acht bis zwölf, vorzugsweise neun bis elf, Gruppen modifizierter Nukleotide aufweist und wobei der zweite Strang sieben bis elf, vorzugsweise acht bis zehn, Gruppen modifizierter Nukleotide aufweist, und wobei die Länge des ersten Strangs und des zweiten Strangs 15 bis 23 Basen ist und wobei die Modifikation 2'-O-Methyl ist,

wobei die Ribonukleinsäure auf beiden Seiten stumpf ist, und

wobei die Ribonukleinsäure RNA-Interferenz vermittelt.

Vorzugsweise hat die doppelsträngige Struktur eine Länge von 18 oder 19 Basen.

Stärker bevorzugt betragen die Länge des ersten Strangs und die Länge des zweiten Strangs 18 oder 19 Basen.

Das Zielgen ist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Strukturgenen, Haushaltsgenen, Transkriptionsfaktoren, Motilitätsfaktoren, Zellzyklusfaktoren, Zellzyklusinhibitoren, Enzymen, Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Tumorsuppressoren.

Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung wird die Verwendung der Ribonukleinsäure gemäß der Erfindung für die Targetvalidierung bereitgestellt.

Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird die Verwendung der Ribonukleinsäure gemäß der Erfindung für die Herstellung eines Medikaments bereitgestellt.

Vorzugsweise ist das Medikament für die Behandlung einer Krankheit oder eines Zustands, der ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Glioblastom, Prostatakrebs, Brustkrebs, Lungenkrebs, Leberkrebs, Kolonkrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs und Leukämie, Diabetes, Adipositas, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Stoffwechselkrankheiten.

Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird eine Zelle bereitgestellt, vorzugsweise eine Knockdown-Zelle, die eine Ribonukleinsäure gemäß der vorliegenden Erfindung enthält, wobei die Zelle, wenn es eine menschliche Zelle ist, eine isolierte menschliche Zelle ist.

Gemäß einem noch weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Organismus bereitgestellt, vorzugsweise ein Knockdown-Organismus, der eine Ribonukleinsäure gemäß der vorliegenden Erfindung enthält, wobei der Organismus kein menschliches Wesen ist.

Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird eine Zusammensetzung bereitgestellt, die eine Ribonukleinsäure gemäß der vorliegenden Erfindung enthält.

Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird eine pharmazeutische Zusammensetzung bereitgestellt, die eine Ribonukleinsäure gemäß der vorliegenden Erfindung enthält und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger.

Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein In-Vitro-Verfahren bereitgestellt für die Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle oder einem Derivat daraus, das die Einführung einer Ribonukleinsäure gemäß der vorliegenden Erfindung in die Zelle aufweist, in einer Menge, die ausreicht, um die Expression des Zielgens zu hemmen, wobei das Zielgen das Zielgen der Ribonukleinsäure gemäß der vorliegenden Erfindung ist.

Die vorliegende Erfindung basiert auf der überraschenden Feststellung, dass kleine interferierende RNAs so konstruiert werden können, dass sie sowohl hoch spezifisch als auch hoch aktiv ebenso wie unter den Reaktionsbedingungen stabil sind, die typischerweise in biologischen Systemen wie beispielsweise biochemischen Tests oder zellulären Umgebungen angetroffen werden. Die verschiedenen, im Stand der Technik wie beispielsweise Tuschl et al. (internationale Patentanmeldung WO 01/75164) beschriebenen interferierenden RNAs sehen eine Länge von 21 – 23 Nukleotiden und eine Modifikation am 3'-Ende der doppel-strängigen RNA vor. Die vorliegenden Erfinder

haben überraschenderweise festgestellt, dass das Problem der Stabilität von interferierender RNA, einschließlich kleiner interferierender RNA (siRNA), die hierin allgemein im Folgenden als RNAi bezeichnet werden, tatsächlich im Angriff von Endonukleasen statt Exonukleasen, wie man früher glaubte, begründet liegt. Auf der Grundlage dieser Feststellung wurden verschiedene Strategien von den vorliegenden Erfindern entwickelt, die Gegenstand der vorliegenden Anmeldung sind.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit neue Formen von interferierender RNA, wie in Anspruch 1 definiert.

Wie hierin beschrieben, besteht die RNAi aus einer Ribonukleinsäure, die eine doppelsträngige Struktur umfasst. Die doppelsträngige Struktur wird durch einen ersten Strang und einen zweiten Strang ausgebildet. Wie hierin beschrieben umfasst der erste Strang einen Abschnitt aus zusammenhängenden Nukleotiden, der hierin auch als erster Abschnitt aus zusammenhängenden Nukleotiden bezeichnet wird, und dieser erste Abschnitt ist wenigstens teilweise komplementär zu einer Ziel-Nukleinsäure. Wie hierin beschrieben umfasst der zweite Strang auch einen Abschnitt aus zusammenhängenden Nukleotiden, wobei der zweite Abschnitt wenigstens teilweise identisch zu einer Ziel-Nukleinsäure ist.

Die spezielle Grundstruktur dieser Ribonukleinsäure ist schematisch in Fig. 1 gezeigt. Der erste Strang und der zweite Strang sind vorzugsweise miteinander hybridisiert und bilden die doppelsträngige Struktur. Die Hybridisierung erfolgt typischerweise durch Watson-Crick-Basenpaarung. Die erfindungsgemäße Ribonukleinsäure ist wie hierin beschrieben jedoch hinsichtlich ihrer Länge nicht notwendigerweise auf die doppelsträngige Struktur beschränkt. Es kann weitere Nukleotide geben, die an einem jeden Strang und/oder an ein jedes Ende eines jeden Stranges angefügt sind, der/die die RNAi bilden.

Im Allgemeinen, abhängig von der besonderen Sequenz des ersten Abschnittes und des zweiten Abschnittes, ist die Hybridisierung oder Basenpaarung nicht notwendigerweise vollständig oder perfekt, was bedeutet, dass der erste und zweite Abschnitt infolge von Fehlpaarungen nicht zu 100% basengepaart sind.

Im Allgemeinen haben eine oder mehrere Fehlpaarungen innerhalb eines Duplex keine Wirkung auf RNAi-Aktivität, wenn sie außerhalb eines Bereiches von vorzugsweise 15, 16 oder 17 passenden Nukleotiden angeordnet sind. Im Allgemeinen, wenn Fehlpaarungen so angeordnet sind, dass sie lediglich 15 oder weniger zusammenhängende passende Nukleotide ergeben, zeigt das RNAi-Molekül typischerweise eine verringerte Aktivität beim Herunterregulieren von mRNA für ein gegebenes Ziel verglichen mit einem Duplex aus 17 passenden Nukleotiden.

Der erste Abschnitt aus zusammenhängenden Nukleotiden des ersten Stranges ist komplementär zu einer Ziel-Nukleinsäure, bevorzugter zu einem Teil der Ziel-Nukleinsäure. Komplementär wie hierin verwendet bedeutet vorzugsweise, dass die Nukleotidsequenz des ersten Stranges an eine Nukleinsäuresequenz einer Ziel-Nukleinsäuresequenz oder einen Teil davon hybridisiert. Typischerweise ist die Ziel-Nukleinsäuresequenz oder Ziel-Nukleinsäure gemäß dem Wirkmechanismus von interferierenden Ribonukleinsäuren eine einzelsträngige RNA, bevorzugter eine mRNA. Eine derartige Hybridisierung erfolgt am wahrscheinlichsten durch Watson-Crick-Basenpaarung, ist sie jedoch nicht notwendigerweise darauf beschränkt.

Der Umfang, in dem der erste Strang und genauer der erste Abschnitt aus zusammenhängenden Nukleotiden des ersten Stranges komplementär zu einer Ziel-Nukleinsäuresequenz ist, kann wie hierin beschrieben so hoch wie 100% und so wenig wie 80%, vorzugsweise 80-100%, bevorzugter 85-100% und am bevorzugtesten 90-100% sein. Eine optimale Komplementarität scheint 95-100% zu sein. Komplementarität in diesem Sinne bedeutet, dass der vorerwähnte Bereich von Nukleotiden wie, beispielsweise, 80%-100% der Nukleotide oder einem weiteren speziellen Bereich, perfekt durch Watson-Crick-Basenpaarung gepaart sind.

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird gezeigt, dass die Komplementarität zwischen dem ersten Abschnitt von Nukleotiden und der Ziel-RNA 18-19 Nukleotide sein muss, wobei Bereiche von so wenig wie 17 Nukleotiden selbst mit zwei Sequenz-spezifischen Überhängen nicht funktional beim Vermitteln von RNAi sind.

Wie hierin beschrieben wäre in einem Duplex mit einer Länge von 19 Nukleotiden oder Basenpaaren eine minimale Komplementarität von 17 Nukleotiden oder Nukleotidbasenpaaren akzeptabel, was eine Fehlpaarung von zwei Nukleotiden erlaubt.

Wie hierin beschrieben, wäre im Falle eines Duplex, der aus 20 Nukleotiden oder Basenpaaren besteht, eine Komplementarität von 17 Nukleotiden oder Nukleotidbasenpaaren zulässig und funktionell aktiv. Das gleiche gilt für ein Duplex aus 21 Nukleotiden oder Basenpaaren mit insgesamt 17 komplementären Nukleotiden oder Basenpaaren.

Grundsätzlich kann der Umfang an Komplementarität, die für eine Länge eines Duplex erforderlich ist, d. h. einer doppelsträngigen Struktur, auch auf der Schmelztemperatur des Komplexes basieren, der durch entweder die doppelsträngige Struktur, wie sie hierin beschrieben ist, oder durch den Komplex aus dem ersten Abschnitt des ersten Stranges und der Ziel-Nukleinsäure gebildet ist.

Es soll verstanden werden, dass alle Ribonukleinsäuren der vorliegenden Erfindung geeignet sind, RNA-vermittelte Interferenz zu bedingen oder daran beteiligt sind, wie beispielsweise in den internationalen Patentanmeldungen WO 99/32619, WO 00/44895 und WO 01/75164 beschrieben ist.

Die erste Strategie gemäß der ein interferierendes Ribonukleinsäuremolekül in Übereinstimmung mit Anspruch 1 gemäß der vorliegenden Erfindung ausgestaltet sein kann, besteht darin, dass der Bereich, der komplementär zur Ziel-Nukleinsäure ist, eine optimale Länge von 18 und 19 Nukleotiden aufweist. Es ist auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die optimale Länge von 18 oder 19 Nukleotiden die Länge der doppelsträngigen Struktur in der verwendeten RNAi ist. Dieses Längenerfordernis ist eindeutig verschieden von der technischen Lehre des Standes der Technik, wie, beispielsweise, der internationalen Patentanmeldung WO 01/75164. Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass eine jegliche weitere Ausgestaltung gemäß der vorliegenden Erfindung und wie im Stand der Technik beschrieben, im Zusammenhang mit einer interferierenden Ribonukleinsäure mit diesen Längencharakteristiken realisiert werden kann, d. h. einer Länge von 18 oder 19 Nukleotiden.

Wie hierin beschrieben kann eine zweite Strategie gemäß der ein interferierendes Ribonukleinsäuremoleküle ausgestaltet sein, besteht darin, dass es am ersten Strang eine freie 5'-Hydroxylgruppe aufweist, die hierin auch als freie 5'OH-Gruppe bezeichnet wird. Eine freie 5'OH-Gruppe bedeutet, dass das endständige Nukleotid, das den ersten Strang bildet, vorhanden und nicht modifiziert ist, insbesondere nicht durch eine End-Modifikation modifiziert ist. Typischerweise liegt die terminale 5'-Hydroxygruppe des zweiten Stranges auch in einer nicht-modifizierten Form vor. In einer bevorzugteren Ausführungsform dieser zweiten Strategie ist auch das 3'-Ende des ersten Stranges bzw. ersten Abschnittes unmodifiziert, um eine freie OH-Gruppe zu präsentieren, die hierin auch als freie 3'OH-Gruppe bezeichnet wird, wobei die Ausgestaltung des 5'-terminalen Nukleotids eine solche gemäß einer der zuvor beschriebenen Ausführungsformen ist. Vorzugsweise ist eine derartige freie OH-Gruppe auch am 3'-Ende des zweiten Stranges bzw. zweiten Abschnittes vorhanden. In weiteren Ausführungsformen der Ribonukleinsäuremoleküle, wie sie zuvor beschrieben wurden, kann das 3'-Ende des ersten Stranges bzw. ersten Abschnittes und/oder das 3'-Ende des zweiten Stranges bzw. zweiten Abschnittes eine End-Modifikation am 3'-Ende aufweisen.

Wie hierin verwendet bezeichnen die Begriffe freie 5'OH-Gruppe und 3'-OH-Gruppe auch, dass das endständig gelegene Nukleotid am 5'-Ende bzw. am 3'-Ende des Polynukleotids eine OH-Gruppe repräsentiert. Eine derartige OH-Gruppe kann entweder von dem Zuckerteil des Nukleotids, vorzugsweise von der 5'-Position im Falle der 5'OH-Gruppe und von der 3'-Position im Falle der 3'OH-Gruppe stammen, oder von einer Phosphat-Gruppe, die an dem Zuckerteil des entsprechenden terminalen Nukleotids befestigt ist. Die Phosphat-Gruppe kann prinzipiell an irgendeine OH-Gruppe des Zuckerteils des Nukleotids befestigt sein. Vorzugsweise ist die Phosphat-Gruppe an der 5'-OH-Gruppe des Zuckerteils im Falle der freien 5'OH-Gruppe befestigt und/oder an der 3'OH-Gruppe des Zuckerteils im Falle der freien 3'OH-Gruppe, was immer noch das bereitstellt, was hierin als freie 5' oder 3'OH-Gruppe bezeichnet wird.

Wie hierin im Zusammenhang mit einer jeglichen Strategie für die Ausgestaltung von RNAi oder irgendeiner Ausführungsform der hierin offenbarten RNAi verwendet, bedeutet der Begriff End-Modifikation eine chemische Entität, die an das am meisten 5'

oder 3'-gelegene Nukleotid des ersten und/oder zweiten Stranges hinzugefügt ist. Beispiele für derartige End-Modifikation umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, invertierte abasische (Desoxy)Nukleotide, Amin, Fluor, Chlor, Brom, CN, CF, Methoxy, Imidazol, Carboxylat, Thioat, C₁ bis C₁₀ niedriges Alkyl, substituiertes niedriges Alkyl, Alkaryl oder Aralkyl, OCF₃, OCN, O-, S- oder N-Alkyl; O-, S- oder N-Alkenyl; SOCH₃; SO₂CH₃; ONO₂; NO₂, N₃; Heterocycloalkyl; Heterocycloalkaryl; Aminoalkylamino; Polyalkylamino oder substituiertes Silyl, wie, unter anderem, in den europäischen Patenten EP 0 586 520 B1 oder EP 0 618 925 B1 beschrieben.

Wie hierin verwendet bezeichnet Alkyl oder irgendein Begriff, der „Alkyl“ umfasst, eine jegliche Kohlenstoffatomkette, die 1 bis 12, vorzugsweise 1 bis 6 und bevorzugter 1 bis 2 C-Atome umfasst.

Wie hierin beschrieben, ist eine weitere End-Modifikation eine Biotin-Gruppe. Wie hierin beschrieben, kann eine derartige Biotin-Gruppe vorzugsweise an entweder dem am meisten 5' oder dem am meisten 3'-gelegenen Nukleotid des ersten und/oder zweiten Stranges oder beiden Enden befestigt sein. Wie hierin beschrieben, ist in einer bevorzugteren Ausführungsform die Biotin-Gruppe an ein Polypeptid oder ein Protein gekoppelt. Wie hierin beschrieben, kann das Polypeptid oder das Protein durch eine jegliche der zuvor erwähnten End-Modifikationen befestigt sein. Das Polypeptid oder Protein kann den Nukleinsäuremolekülen weitere Merkmale verleihen. Unter anderem kann das Polypeptid oder Protein als ein Ligand für ein weiteres Molekül dienen. Wenn das weitere Molekül ein Rezeptor ist, kann die Funktion und Aktivität des Rezeptors durch den bindenden Liganden aktiviert werden. Der Rezeptor kann eine Internalisierungsaktivität aufweisen, die eine effektive Transfektion des an die Nukleinsäuremoleküle gebundenen Liganden erlaubt. Ein Beispiel für den Liganden, der an die Nukleinsäuremoleküle gebunden werden soll, ist VEGF und der entsprechende Rezeptor ist der VEGF-Rezeptor.

Verschiedene mögliche Ausführungsformen von RNAi, wie hierin beschrieben, die verschiedene Arten von End-Modifikation(en) aufweisen, sind in der folgenden Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1: Verschiedene Ausführungsformen einer interferierenden Ribonukleinsäure, wie hierin beschrieben

Abschnitt	erster Strang/erster Abschnitt	zweiter Strang/zweiter
1.) 5'-Ende	freies OH	freies OH
3'-Ende	freies OH	freies OH
2.) 5'-Ende	freies OH	freies OH
3'-Ende	End-Modifikation	End-Modifikation
3.) 5'-Ende	freies OH	freies OH
3'-Ende	freies OH	End-Modifikation
4.) 5'-Ende	freies OH	freies OH
3'-Ende	End-Modifikation	freies OH
5.) 5'-Ende	freies OH	End-
Modifikation		
3'-Ende	freies OH	freies OH
6.) 5'-Ende	freies OH	End-
Modifikation		
3'-Ende	End-Modifikation	freies OH
7.) 5'-Ende	freies OH	End-
Modifikation		
3'-Ende	freies OH	End-Modifikation
8.) 5'-Ende	freies OH	End-
Modifikation		
3'-Ende	End-Modifikation	End-Modifikation

Die verschiedenen End-Modifikationen, wie sie hierin offenbart sind, sind vorzugsweise an dem Riboseteil eines Nukleotids der Ribonukleinsäure angeordnet. Bevorzugter kann die End-Modifikation an irgendeine der OH-Gruppen des Riboseteils gebunden sein oder diese ersetzen, einschließlich, aber nicht beschränkt auf die 2'OH-, 3'OH- und 5'OH-Position, unter der Voraussetzung, dass das solchermaßen modifizierte Nukleotid ein endständiges Nukleotid ist. Invertierte abasische Nukleotide sind Nukleotide, entweder Desoxyribonukleotide oder Ribonukleotide, die keinen Nukleobasenteil aufweisen. Die Art von Verbindung ist, unter anderem, in Sternberger et al. (2002), Antisense. Nucl. Ac. Drug Dev., in press, beschrieben.

Wie hierin beschrieben, kann eine jede der zuvor erwähnten End-Modifikationen im Zusammenhang mit den verschiedenen Ausführungsformen von RNAi, wie sie in Tabelle 1 dargestellt sind, verwendet werden. Im Zusammenhang damit gilt es festzuhalten,

dass eine jede der RNAi-Formen oder Ausführungsformen, wie sie hierin offenbart sind, wobei der Sense-Strang inaktiviert ist, vorzugsweise indem er eine End-Modifikation aufweist und bevorzugter am 5'-Ende eine Endmodifikation aufweist, besonders vorteilhaft ist. Dies ergibt sich aus der Inaktivierung des Sense-Stranges, der dem zweiten Strang der hierin beschriebenen Ribonukleinsäuren entspricht, der ansonsten mit einer nicht in Beziehung stehenden einzel-strängigen RNA in der Zelle interferieren könnte. Die Expression und insbesondere das Expressions- und besonders das Translationsmuster des Transkriptoms einer Zelle wird somit spezifischer beeinflusst. Diese Wirkung wird auch als Off-Target-Wirkung bezeichnet. Unter Bezugnahme auf Tabelle 1 sind jene als Ausführungen 7 und 8 dargestellten Ausführungen im obigen Sinne besonders vorteilhaft, da die Modifikation zu einer Inaktivierung des — Ziel-unspezifischen — Teils der RNAi führt (was der zweite Strang ist), wodurch eine jegliche unspezifische Wechselwirkung des zweiten Stranges mit einzelsträngiger RNA in einem zellulären oder ähnlichen System verringert wird, wo die RNAi verwendet werden soll, um spezifische Ribonukleinsäuren bzw. Proteine herunterzuregulieren.

Eine dritte Strategie besteht, wie hierin beschrieben darin, eine Ribonukleinsäure zu realisieren, die ein doppelsträngige Struktur umfasst, wobei die doppelsträngige Struktur einen ersten Strang und einen zweiten Strang umfasst, wobei der erste Strang einen ersten Abschnitt aus zusammenhängenden Nukleotiden umfasst, wobei der erste Strang wenigstens teilweise komplementär zu einer Ziel-Nukleinsäure ist, und der zweite Strang einen zweiten Abschnitt aus zusammenhängenden Nukleotiden umfasst, wobei der zweite Abschnitt wenigstens teilweise identisch zu einer Ziel-Nukleinsäure ist, wobei die doppelsträngige Struktur glattendig ist. Wie im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendet wird der Begriff doppelsträngige Struktur auch als Duplex bezeichnet. Die Ausgestaltung ist somit eindeutig verschieden von, beispielsweise, der von Tuschl et al., wie sie in der Patentanmeldung WO 01/75164 offenbart ist, die einen 3'-Überhang offenbart. Wie hierin verwendet bezeichnet Überhang eine doppelsträngige Struktur, wobei wenigstens ein Ende des Strangs länger ist als das korrespondierende Ende des anderen Stranges, das die doppelsträngige Struktur ausbildet, der hierin auch als der Gegenstrang bezeichnet wird. Vorzugsweise ist der erste Abschnitt identisch zu dem ersten Strang und der zweite Strang ist identisch zu dem zweiten Strang.

Mit Blick auf die Wirksamkeit von glattendiger RNAi und den Vorteilen einer End-Modifikation von entweder dem ersten oder dem zweiten Strang, oder beiden, der entsprechenden Ribonukleinsäure ist es bevorzugt, eine Kombination aus beiden Ausgestaltungsprinzipien zu haben. Mit anderen Worten, es ist im Rahmen der Beschreibung, dass eine glattendige RNAi vorliegt, die ein Endmodifikationsschema aufweist, wie es in Tabelle 1 dargestellt ist.

Die vierte Strategie besteht, wie hierin beschrieben, darin, am 5'-Ende der Ribonukleinsäure einen Überhang zu haben. Genauer kann ein derartiger Überhang im Prinzip an einem jeden oder sowohl dem ersten als auch dem zweiten Strang der Ribonukleinsäure vorhanden sein. Die Länge des Überhangs kann so wenig wie ein Nukleotid und so lang wie 2 bis 8 Nukleotide, vorzugsweise 2, 4, 6 oder 8 Nukleotide sein. Der 5'-Überhang ist an dem ersten Strang und/oder dem zweiten Strang der Ribonukleinsäure gemäß der Offenbarung angeordnet. Das/die Nukleotid(e), die den Überhang ausbildet/ausbilden, kann/können (ein) Desoxyribonukleotid(e), (ein) Ribonukleotid(e) oder eine Fortsetzung davon sein.

Der Überhang umfasst vorzugsweise wenigstens ein Desoxyribonukleotid, wobei das eine Desoxyribonukleotid vorzugsweise das am meisten 5'-terminal gelegene ist. Es ist im Rahmen der vorliegenden Offenbarung, dass das 3'-Ende des entsprechenden Gegenstranges der Ribonukleinsäure keinen Überhang aufweist, vorzugsweise keinen Desoxyribonukleotid-Überhang. Hier wiederum kann eine jede der offenbarten Ribonukleinsäuren ein Endmodifikationsschema aufweisen, wie im Zusammenhang mit Tabelle 1 dargestellt und/oder eine End-Modifikation, wie hierin dargelegt.

Die Strategie bei der Ausgestaltung der interferierenden Ribonukleinsäuren besteht in der Ausbildung eines bestimmten Musters aus modifizierten Nukleotiden auf sowohl dem ersten als auch auf dem zweiten Strang und genauer auf dem ersten und zweiten Abschnitt aus zusammenhängenden Nukleotiden der Ribonukleinsäure(n) gemäß der vorliegenden Erfindung.

Wie hierin beschrieben, kann die Art von Modifikation der Nukleotide die gleiche sein, wie im Zusammenhang mit den anderen Strategien zur Ausgestaltung interferierender RNA diskutiert, wie sie hierin offenbart sind, und genauer die Art von Modifikation, wie sie hierin beschrieben ist, oder eine End-Modifikation, wie beispielsweise, ein invertiertes abasisches Nukleotid, Methoxy oder Amino und dergleichen am Riboseteil von wenigstens einem Nukleotid, das die Ribonukleinsäure gemäß der vorliegenden Erfindung ausbildet. Es ist festzuhalten, dass die Modifikation der Nukleotide eine jegliche Modifikationsform sein kann, wie sie hierin beschrieben ist, insbesondere die Art von Modifikation, wie sie hierin als End-Modifikation beschrieben ist, mit der Vorgabe, dass die so genannte End-Modifikation nicht notwendigerweise an terminalen Nukleotiden lokalisiert ist. Vielmehr erfolgt die Modifikation an einem nicht-terminalen Nukleotid. Unter derartigen Bedingungen ist die Modifikation vorzugsweise an den Riboseteil des – zu modifizierenden – Nukleotids und vorzugsweise an die 2'-Position des Riboseteils gebunden.

Es ist auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass eine jede Ribonukleinsäure gemäß Anspruch 1 auch die Merkmale aufweisen kann, die einer Ribonukleinsäure gemäß Anspruch 1 durch irgendeine der anderen Ausgestaltungsstrategien verliehen wird, wie sie hierin beschrieben sind. Entsprechend kann die interferierende Ribonukleinsäure mit einem Muster aus modifizierten Nukleotiden eine End-Modifikation, ein Endmodifikationsschema, oder eine Kombination aus zwei oder mehreren dieser Elemente oder Merkmale aufweisen.

Abgesehen von den zuvor erwähnten Modifikationen, die entweder als End-Modifikationen oder als Modifikationsmuster vorhanden sein können, kann das Ribonukleinsäurerückgrat als solches weiter modifiziert sein durch Ausbilden verschiedener Verbindungen zwischen den Nukleotiden. Derartige Verbindungen sind, unter anderen, in dem europäischen Patent EP 0 586 520 B1 und dem europäischen Patent EP 0 681 925 B1 beschrieben. Von besonderem Interesse hierin sind/ist eine interne Modifikation(en) des Ribonukleinsäurerückgrats, von der/denen gezeigt wurde, dass sie den Ribonukleotiden eine höhere Nukleinsäureresistenz verleihen.

In einer bevorzugten Ausführungsform gemäß der Erfindung ist die Modifikation des modifizierten Nukleotids eine Methoxylierung der 2'-OH-Gruppe des Riboseteils des Nukleotids.

Gemäß Anspruch 1 zeigen beide Stränge und insbesondere sowohl der erste Abschnitt als auch der zweite Abschnitt diese Art von Modifikation der Nukleotide, die die Stränge bzw. Abschnitte ausbilden.

Wie hierin verwendet kann der Begriff „Gruppe aus modifiziertem(n) Nukleotid(en)“ oder „flankierende Gruppe von Nukleotid(en)“ so wenig wie ein Nukleotid, d. h. ein oder mehrere Nukleotide umfassend darstellen.

Ausgehend von einem Abschnitt von zusammenhängenden Nukleotiden kann ein Modifikationsmuster der Nukleotide, die den Abschnitt ausbilden, so realisiert sein, dass ein einzelnes Nukleotid oder Gruppe von Nukleotiden, die kovalent miteinander mittels Standardphosphordiesterbindungen verbunden sind oder, wenigstens teilweise, durch Phosphothioatbindungen verbunden sind, eine derartige Modifikation aufweisen. In dem Falle, dass ein derartiges Nukleotid oder Gruppe von Nukleotiden, die hierin als Gruppe aus modifizierten Nukleotiden bezeichnet werden, nicht das 5'-Ende oder 3'-Ende des Abschnittes ausbildet/ausbilden, folgt ein Nukleotid oder Gruppe von Nukleotiden auf beiden Seiten des Nukleotids, das die Modifikation des vorhergehenden Nukleotids oder Gruppe von Nukleotiden nicht aufweist. Es wird gemäß der Offenbarung verstanden, dass diese Art von Nukleotid oder Gruppe von Nukleotiden jedoch eine andere Modifikation aufweisen kann. Diese Gruppe von Nukleotiden wird hierin auch als die flankierende Gruppe von Nukleotiden oder flankierende Gruppe aus Nukleotiden bezeichnet. Diese Sequenz von modifiziertem Nukleotid bzw. Gruppe von modifizierten Nukleotiden und unmodifizierten oder unterschiedlich modifiziertem Nukleotid oder Gruppe von unmodifizierten oder anders modifizierten Nukleotiden kann ein oder mehrfach wiederholt sein. Vorzugsweise ist die Sequenz mehr als einmal wiederholt.

Aus Gründen der Klarheit wird das Muster detailliert im Folgenden diskutiert, wobei allgemein auf eine Gruppe modifizierter Nukleotide oder eine Gruppe von

unmodifizierten Nukleotiden Bezug genommen wird, wobei eine jede der Gruppe tatsächlich so wenig wie ein Nukleotid umfassen kann.

Unmodifiziertes Nukleotid, wie hierin verwendet, bedeutet entweder, dass es keine der zuvor erwähnten Modifikationen an dem Nukleotid vorhanden ist, dass das entsprechende Nukleotid oder Gruppe von Nukleotiden ausbildet, oder eine Modifikation aufweist, die verschieden ist von der des modifizierten Nukleotids bzw. Gruppe von Nukleotiden.

Gemäß der Offenbarung kann die Modifikation der/des unmodifizierten Nukleotids/Nukleotide, wo (ein) derartige(s) nicht-modifizierte(s) Nukleotid(e) tatsächlich anders modifiziert ist/sind als die Modifikation der/des modifizierten Nukleotids/Nukleotide, gleich oder sogar verschieden für die verschiedenen Nukleotide sein, die die unmodifizierten Nukleotide oder die verschiedenen flankierenden Gruppen von Nukleotiden ausbilden.

Das Muster aus modifizierten und unmodifizierten Nukleotiden kann so sein, dass das 5'-terminale Nukleotid des Stranges oder des Abschnittes mit einer modifizierten Gruppe von Nukleotiden oder mit einer unmodifizierten Gruppe von Nukleotiden beginnt. In einer alternativen Ausführungsform der Offenbarung ist es jedoch auch möglich, dass das 5'-terminal Nukleotid durch eine unmodifizierte Gruppe aus Nukleotiden gebildet ist.

Diese Art von Muster kann entweder auf dem ersten Abschnitt oder dem zweiten Abschnitt der interferierenden RNA oder auf beiden realisiert sein. Man muss festhalten, dass ein 5'-Phosphat auf dem zum Zielmolekül komplementären Strang des siRNA-Duplexes für die Funktion der siRNA-Funktion erforderlich ist, was vorschlägt, dass Zellen die Authentizität von siRNAs durch ein freies 5'-OH überprüfen (das phosphoryliert sein kann) und nur solchen bonafide siRNAs erlaubt, eine Zerstörung der Ziel-RNA zu steuern (Nykanen, et al. (2001), Cell 107, 309-21).

Gemäß der Offenbarung weisen sowohl der erste als auch der zweite Abschnitt diese Art von Muster auf. Vorzugsweise ist ein Muster aus Modifikation und Nicht-Modifikation das gleiche für sowohl den ersten als auch den zweiten Abschnitt.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Offenbarung ist die Gruppe aus Nukleotiden, die den zweiten Abschnitt ausbilden und der modifizierten Gruppe aus Nukleotiden des ersten Abschnittes entspricht, ebenfalls modifiziert, wohingegen die unmodifizierte Gruppe aus Nukleotiden, die den zweiten Abschnitt ausbilden oder jene des zweiten Abschnittes, der unmodifizierten Gruppe aus Nukleotiden, die den ersten Abschnitt ausbilden oder jene des ersten Abschnittes entspricht. Diese Möglichkeit ist schematisch in Fig. 2A dargestellt.

Eine weitere Alternative gemäß der vorliegenden Erfindung besteht darin, dass es eine Phasenverschiebung des Modifikationsmusters des ersten Abschnittes bzw. ersten Stranges relativ zu dem Modifikationsmuster des zweiten Abschnittes bzw. zweiten Stranges gibt. Vorzugsweise ist gemäß der vorliegenden Erfindung die Verschiebung von der Gestalt, dass die modifizierte Gruppe aus Nukleotiden des ersten Stranges zu der unmodifizierten Gruppe aus Nukleotiden des zweiten Stranges korrespondiert und umgekehrt. Diese Möglichkeit ist in Fig. 2B gezeigt. Es ist auch im Rahmen der vorliegenden Offenbarung, dass die Phasenverschiebung des Modifikationsmusters nicht vollständig ist, sondern, wie in Fig. 2C dargestellt, überlappt.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das zweite Nukleotid am Ende des Stranges bzw. Abschnittes ein unmodifiziertes Nukleotid oder der Beginn einer Gruppe von nicht-modifizierten Nukleotiden. Vorzugsweise ist dieses unmodifizierte Nukleotid oder diese unmodifizierte Gruppe aus Nukleotiden am 5'-Ende des ersten bzw. zweiten Stranges angeordnet und sogar bevorzugter des ersten Stranges. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das unmodifizierte Nukleotid oder die unmodifizierte Gruppe aus Nukleotiden am 5'-Ende des ersten Stranges bzw. ersten Abschnittes angeordnet. In einer bevorzugten Ausführungsform besteht das Muster aus alternierenden einzelnen modifizierten und unmodifizierten Nukleotiden.

In der vorliegenden Erfindung umfasst die interferierende Ribonukleinsäure zwei Stränge, wobei ein 2'-O-Methyl-modifiziertes Nukleotid und ein nicht-modifiziertes Nukleotid, vorzugsweise ein Nukleotid, das nicht 2'-O-Methyl-modifiziert ist, auf beiden Strängen in einer alternierenden Art und Weise eingebaut ist, was bedeutet, dass jedes zweite Nukleotid ein 2'-O-Methyl-modifiziertes bzw. ein nicht-modifiziertes Nukleotid ist. Dies bedeutet, dass auf dem ersten Strang ein 2'-O-Methyl-modifiziertes Nukleotid von einem nicht-modifizierten Nukleotid gefolgt ist, das wiederum von einem 2'-O-Methyl-modifizierten Nukleotid gefolgt ist und so weiter. Die gleiche Sequenz aus 2'-O-Methyl-Modifikation und Nicht-Modifikation existiert auf dem zweiten Strang, wobei eine Phasenverschiebung in der Form besteht, dass das 2'-O-Methyl-modifiziert Nukleotid auf dem ersten Strang basenpaart mit (einem) nicht-modifizierten Nukleotid(en) auf dem zweiten Strang und umgekehrt. Diese spezielle Anordnung, d. h. Basenpaaren von 2'-O-Methyl-modifizierten und nicht-modifizierten Nukleotid(en) auf beiden Strängen ist besonders bevorzugt im Falle kurzer interferierender Ribonukleinsäuren, d. h. kurzer basengepaarter doppelsträngiger Ribonukleinsäuren, da angenommen wird, dass, obwohl die vorliegenden Erfinder nicht durch diese Theorie beschränkt sein wollen, eine bestimmte Abstoßung zwischen zwei basenpaarenden 2'-O-Methyl-modifizierten Nukleotiden besteht, was einen derartigen Duplex destabilisieren würde, insbesondere kurze Duplexe. Hinsichtlich der speziellen Anordnung der Erfindung, beginnt der Antisense-Strang mit einem 2'-O-Methyl-modifizierten Nukleotid am 5'-Ende, wobei entsprechend das zweite Nukleotid nicht-modifiziert ist, und wobei die dritten, fünften, siebten usw. Nukleotide somit wieder 2'-O-Methyl-modifiziert sind, wohingegen die zweiten, vierten, sechsten, achten und dergleichen Nukleotide nicht-modifizierte Nukleotide sind. Wiederum ohne durch eine Theorie gebunden zu sein, scheint, dass der Position 2 und optional der Position 4, 6, 8 und ähnlichen Positionen am 5'-terminalen Ende des Antisense-Stranges eine besondere Bedeutung zugemessen werden kann, die keine Modifikation umfassen soll, wohingegen das am weitesten 5'-terminal gelegene Nukleotid, d. h. das erste 5'-terminale Nukleotid des Antisense-Stranges eine derartige Modifikation aufweisen kann, wobei eine jegliche ungerade Position wie die erste, optional dritte, fünfte und ähnliche Position(en) des Antisense-Stranges modifiziert sein können. In weiteren Ausführungsformen der Offenbarung kann die Modifikation bzw. Nicht-Modifikation der/des modifizierten und nicht-modifizierten Nukleotide/Nukleotids eine jegliche der hierin beschriebenen sein.

Obwohl nicht darauf beschränkt, wird die doppelsträngige Struktur der erfindungsgemäßen Ribonukleinsäure, die auch als Duplex bezeichnet wird, durch den ersten Strang und zweiten Strang ausgebildet, oder den ersten und zweiten Abschnitt aus zusammenhängenden Nukleotiden. Gemäß der vorliegenden Erfindung beträgt die Länge des ersten Abschnittes bzw. zweiten Abschnittes typischerweise etwa 15 bis etwa 23, bevorzugter 17 bis 21 und am bevorzugtesten 18 oder 19 Basen. Im Zusammenhang damit soll festgehalten werden, dass eine Länge von weniger als 30 Nukleotiden, vorzugsweise weniger als 21 Nukleotiden, nicht dazu führt, dass ein biologisches System, das grundsätzlich in der Lage ist, eine RNA-Interferenz und auch eine Interferon-Antwort zu zeigen, eine Interferon-Antwort entwickelt. Der Grund dafür liegt in der Beobachtung, dass eine gegebene Zelle tiefreichende physiologische Änderungen erfährt, wenn doppelsträngige RNA, die länger als 30 Basenpaare ist, Proteinkinase PKR und 2',5'-Oligoadenylatsynthetase bindet und aktiviert. Aktivierte PKR unterbindet die Translation durch Phosphorylierung von eIF2a, aktivierte 2',5'-AS bedingt mRNA-Abbau. Diese Wirkungen sind bei der Target-Validierung und in Tiermodellen nicht erwünscht, da sie über die Wirkung des Ziel-spezifischen Knock-Downs auf den Phänotyp die Oberhand gewinnen.

Entsprechend einer hierin offenbarten sechsten Strategie bei der Ausgestaltung von interferierenden Ribonukleinsäuren umfasst die Ribonukleinsäure eine doppelsträngige Struktur, wobei die doppelsträngige Struktur einen ersten Strang und einen zweiten Strang umfasst, wobei der erste Strang einen ersten Abschnitt aus zusammenhängenden Nukleotiden umfasst und wobei der erste Abschnitt wenigstens teilweise komplementär zu einer Ziel-Nukleinsäure ist, und der zweite Strang einen zweiten Abschnitt aus zusammenhängenden Nukleotiden umfasst, wobei der zweite Abschnitt wenigstens teilweise identisch zu einer Ziel-Nukleinsäure ist, wobei ein Terminus des ersten Stranges und ein Terminus des zweiten Stranges durch eine Schleifen-Struktur verbunden sind.

In einer Ausführungsform der hierin beschriebenen sechsten Strategie besteht die Schleifen-Struktur aus einem Nicht-Nukleinsäure-Polymer. Ein derartiges Nicht-Nukleinsäure-Polymer kann Polyethylenglycol oder ähnliche Polymere sein. Die Nicht-

Nukleinsäure-Polymere können im Prinzip aus der Gruppe ausgewählt sein, die Polymere umfasst, die kein Polynukleotid umfassen, und erlauben, dass die zwei Stränge, die verbunden werden sollen, tatsächlich miteinander hybridisieren. Um eine derartige Hybridisierung zu erlauben, muss das Molekül oder der Teil des Moleküls, das/der die zwei Abschnitte, die miteinander hybridisieren, verbindet, eine bestimmte Molekülstruktur oder Molekülflexibilität aufweisen, um das Biegen des Moleküls zu erlauben, um wiederum zu erlauben, dass beide Stränge miteinander in engen Kontakt und in eine dreidimensionale Orientierung gelangen, die eine Hybridisierung erlaubt. Ein derartiges Molekül oder Teil fungiert faktisch als ein Gelenk. Im Prinzip kann ein jegliches Molekül, das diesem Erfordernis gerecht wird, in Verbindung mit der vorliegenden Offenbarung verwendet werden. Neben Polyethylenglycol können Aminosäure-basierte Moleküle verwendet werden. Derartige Aminosäure-basierte Moleküle können entweder Homopolymere oder Heteropolymere sein. Ein nützliches Beispiel ist ein Homopolymer, das aus sieben Glycin-Resten besteht, das die Erzeugung eines Gelenkes erlaubt, wie es erforderlich ist, um die beiden Abschnitte für das Hybridisieren in die erforderliche räumliche Nähe zu bringen. Dieses Glycin-basierte Gelenk ist, beispielsweise in Gaun K. L. und Dixon J. E. (1991), *Anal. Biochem.* 192, 262 beschrieben. In einer weiteren Ausführungsform kann das Gelenk durch Kronenether ausgebildet sein, die in der Technik bekannt sind.

In einer alternativen Ausführungsform der hierin beschriebenen sechsten Ausführungsform besteht die Schleife aus einer Nukleinsäure. Wie hierin verwendet werden LNA, (wie in Elayadi und Corey (2001), *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 2(4): 558-61 (Review); Orum und Wengel (2001), *Curr. Opin. Mol. Ther.* 3(3): 239-43) beschrieben, und PNA als Nukleinsäuren betrachtet und können auch als Schleifen-bildende Polymere verwendet werden. Im Grunde kann das 5'-Ende des ersten Stranges mit dem 3'-Terminus des zweiten Stranges verbunden sein. In einer Alternative kann das 3'-Ende des ersten Stranges mit dem 5'-Terminus des zweiten Stranges verbunden sein. Die Nukleotidsequenz, die die Schleifenstruktur ausbildet, wird im Allgemeinen als nicht kritisch betrachtet. Die Länge der Nukleotidsequenz, die eine derartige Schleife ausbildet, scheint jedoch aus sterischen Gründen kritisch zu sein. Entsprechend scheint eine Minimallänge aus vier Nukleotiden angemessen zu sein, um eine Schleifen-Struktur auszubilden. Im Prinzip ist die maximale Anzahl von Nukleotiden, die das Gelenk oder

die Bindung zwischen beiden Strängen, die hybridisiert werden sollen, nicht beschränkt. Je länger ein Polynukleotid jedoch ist, desto wahrscheinlicher werden Sekundär- und Tertiär-Strukturen ausgebildet und somit die erforderliche Orientierung der Abschnitte beeinflusst. Vorzugsweise ist eine maximale Anzahl von Nukleotiden, die das Gelenk ausbilden, etwa 12 Nukleotide. Es ist im Rahmen der Offenbarung dieser Anmeldung, dass eine jegliche der oben beschriebenen Ausgestaltungen mit der hierin beschriebenen sechsten Strategie kombiniert werden kann, d. h. durch kovalentes Verbinden der zwei Strängen in einer Art und Weise, dass eine Rückfaltung (Schleife) durch eine Schleifen-Struktur oder ähnliche Struktur erfolgen kann.

Die vorliegenden Erfinder haben überraschenderweise festgestellt, dass, wenn die Schleife 3' zum Antisense-Strang angeordnet ist, d. h. dem ersten Strang der Ribonukleinsäure(n) gemäß der Offenbarung, die Aktivitäten dieser Art von RNAi größer sind verglichen mit der Anordnung der Schleife 5' zu dem Antisense-Strang. Entsprechend ist die spezielle Anordnung der Schleife relativ zu dem Antisense-Strang und Sense-Strang, d. h. zum ersten Strang bzw. dem zweiten Strang, entscheidend und ist somit im Gegensatz zu dem Verständnis, wie es im Stand der Technik zum Ausdruck gebracht wird, wo ausgeführt wird, dass die Orientierung keine Bedeutung hätte. Dies scheint jedoch mit Blick auf die hierin präsentierten experimentellen Ergebnisse nichtzutreffend zu sein. Das Verständnis, wie im Stand der Technik zum Ausdruck gebracht, basiert auf der Annahme, dass eine jegliche RNAi Gegenstand eines Prozessierens ist, währenddessen eine nicht durch Schleifen verbundene RNAi erzeugt wird. Wenn dies der Fall wäre, könnte die eindeutig beobachtete erhöhte Aktivität jener Strukturen nicht erklärt werden, bei denen die Schleife 3' zum Antisense angeordnet ist. Insoweit ist eine bevorzugte Anordnung in 5'→3'-Richtung für diese Art kleiner interferierender RNAi: zweiter Strang – Schleife – erster Strang. Die entsprechenden Konstrukte können in geeignete Vektor-Systeme eingebaut werden. Vorzugsweise umfasst der Vektor einen Promotor für die Expression von RNAi. Vorzugsweise ist der entsprechende Promotor pol III und bevorzugter sind die Promotoren U6, H1, 7SK-Promotor, wie in Good et al. (1997) *Gene Ther.*, 4, 45-54 beschrieben.

Infolge der allgemeinen Anwendbarkeit des Konzeptes der interferierenden RNA und somit des Knock-Downs oder Knock-Outs für eine kodierende Nukleinsäure wie

beispielsweise eine mRNA, kann ein jedes Gen, das eine derartige RNA produziert, hinsichtlich seiner Expression modifiziert werden, indem eine der Ribonukleinsäuren gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet wird. Infolge des grundlegenden und allgemein anwendbaren Mechanismus kann eine jegliche Anwendung auf der Basis desselben realisiert werden, was den Knock-Down oder Knock-Out eines Gens impliziert.

Eine bevorzugte Anwendung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Ribonukleinsäure für die Target-Validierung. Wie hierin verwendet soll Target-Validierung einen Prozess bezeichnen, der das Durchführen von Schritten umfasst, um zu belegen, dass eine DNA, eine RNA oder ein Proteinmolekül direkt in einem biologischen Prozess involviert ist, vorzugsweise in einem Prozess, der – kausal – bei einer Erkrankung oder einem Nicht-Standard-Zustand involviert ist, und deshalb ein geeignetes Ziel für die Entwicklung einer neuen therapeutischen Verbindung ist. Sequenzhomologiestudien haben erfolgreich Gene in Ziel-Familien eingeteilt. Die enorme Aufgabe, zu entschlüsseln, welche dieser Ziele Schlüsselemente bei Erkrankungen sind und die für eine nachfolgende Arzneimittelentwicklung verwendet werden sollten, muss in effizienter Art und Weise angegangen werden. Deshalb sollte der Knock-Down einer Genexpression um 50-100 % verringert sein, vorzugsweise um 90 %, um signifikante Wirkungen auf den Phänotyp zu sehen. In anderen Fällen, abhängig von den Genen, kann ein Knock-Down von so wenig wie 20 % ausreichend sein, um einen Phänotyp zu bedingen. Ein Phänotyp wird durch Vergleich von Zellen definiert werden, die funktionelle RNAi-Moleküle enthalten, mit Zellen, die keine funktionelle RNAi-Moleküle enthalten. Dies wird ein signifikantes Ableseergebnis gewährleisten, selbst unter Bedingungen, wo die Proteinfunktion nur teilweise inhibiert ist. Im Allgemeinen besteht keine lineare Korrelation zwischen dem Umfang der mRNA-Reduktion und dem Umfang der Änderung im Phänotyp. Man muss anerkennen, dass für einige Proteine eine Verringerung von etwa 20 % des Proteins ausreichend ist, um eine Änderung im Phänotyp zu erzeugen, wohingegen im Falle von anderen Genen bzw. mRNA so wenig wie 5-10 % verbleibendes Protein ausreichend ist, um den beobachteten Phänotyp aufrechtzuerhalten.

Eine weitere Verwendung der Ribonukleinsäuremoleküle gemäß der vorliegenden Erfindung besteht in deren Verwendung für die Herstellung eines Medikaments oder die

Verwendung als ein Medikament. Ein derartiges Medikament könnte entweder für die Behandlung und/oder Prävention von Erkrankungen oder Zuständen verwendet werden, wie eine jegliche Art von Krebs, wo ein Gen und sein Produkt mit dem Beginn, der Ursache oder dem Fortschreiten dieser Erkrankung verknüpft worden ist. Zusätzlich könnte ein derartiges Medikament verwendet werden, um Erkrankungen zu behandeln, wo die Anwesenheit oder Überexpression eines Genproduktes einen pathologischen Phänotyp erzeugt. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Erkrankung gekennzeichnet durch einen Zugewinn an Funktion und kann durch Anwendung oder Verabreichung der entsprechenden, biologisch aktiven RNAi geheilt werden.

Erkrankungen oder Zustände, die durch das Medikament behandelt werden können, das eine Ribonukleinsäure umfasst, wie hierin offenbart, können ausgewählt sein aus der Gruppe umfassend Krebs, Herzerkrankungen, Stoffwechselerkrankungen, dermatologische Erkrankungen, entzündliche Erkrankungen, Immunsystemstörungen und Autoimmunstörungen. Die verschiedenen Formen von Krebs umfassen, sind aber nicht beschränkt auf solide Tumoren und Tumoren des blutbildenden Systems, wie beispielsweise Glioblastom, Prostatakrebs, Brustkrebs, Lungenkrebs, Leberkrebs, Pankreaskrebs und Leukämie. Stoffwechselerkrankungen umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Fettleibigkeit und Diabetes. Dermatologische Erkrankungen umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Psoriasis.

In einem weiteren Aspekt können die Ribonukleinsäuremoleküle gemäß der vorliegenden Erfindung als Diagnostika verwendet werden, vorzugsweise für jene Erkrankungen, wie sie im Zusammenhang mit den oben erwähnten Erkrankungen und Zuständen angegeben sind. Eine derartige Diagnose könnte auf der Beobachtung basieren, dass nach Anwenden der Ribonukleinsäuremoleküle gemäß der vorliegenden Erfindung im Zusammenhang mit einer Probe, die vorzugsweise Zellen enthält, eine Änderung des Expressionsmusters der Probe erfolgt. Vorzugsweise umfasst eine derartige Probe Zellen von einem Lebewesen, von dem angenommen wird, dass es die Erkrankung oder den Zustand, die/der behandelt werden soll, oder eine Prädisposition dafür aufweist.

Eine weitere Anwendung der Nukleinsäuren gemäß der vorliegenden Erfindung besteht in ihrer Verwendung beim Screenen von pharmazeutisch aktiven Verbindungen

und/oder der Lead-Optimierung. Letzteres wird so durchgeführt, dass die Wirkung von Kandidatenarzneimitteln wie beispielsweise kleinen Molekülen überwacht oder bestimmt wird und die Wirkung, die durch die Kandidatenarzneimittel bedingt werden, mit der Wirkung verglichen werden, die nach Verabreichung von spezifischer RNAi beobachtet wird, die auf der Grundlage der hierin offenbarten Prinzipien ausgestaltet ist. Indem so verfahren wird, können Kandidatenarzneimittel, die Off-Target-Wirkungen zeigen, aus dem Screening-Prozess eliminiert werden, wohingegen jene Kandidatenarzneimittel, die einen ähnlichen oder identischen Phänotyp erzeugen, als hochrelevante Hauptverbindungen erachtet werden und können sogar selbst eine pharmazeutisch aktive Verbindung sein. Bei diesem Ansatz fungieren die hochspezifischen RNAi-Moleküle als Goldstandard, gegen die die Kandidatenarzneimittel gemessen werden.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung eine Zelle, vorzugsweise eine Knock-Down-Zelle, die eine Ribonukleinsäure gemäß der vorliegenden Erfindung enthält. Eine derartige Zelle ist vorzugsweise eine Zelle, die entweder aus einem Gewebe oder sogar Organ, das wiederum vorzugsweise nicht in einem Organismus enthalten ist, isoliert oder darin enthalten ist. Die Zelle kann jedoch auch in einem Organismus enthalten sein. Die Zelle ist vorzugsweise eine Zelle, die an der Erkrankung oder dem Zustand, der durch die erfindungsgemäßen Ribonukleinsäuren behandelt werden soll, involviert ist. Diese Art von Knock-Down-Zelle kann verwendet werden, um ein Expressionsprofil basierend, z. B., auf mRNA oder Protein zu erzeugen, um funktionelle Beziehungen aufzuklären und stromabwärtige Ziele zu bestimmen. In dem Fall, wo die Zelle eine menschliche Zelle ist, ist eine derartige menschliche Zelle eine isolierte menschliche Zelle.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung einen Organismus, der eine Ribonukleinsäure gemäß der vorliegenden Erfindung enthält. Vorzugsweise ist ein derartiger Organismus ein Vertebraten-Organismus und vorzugsweise ist der Vertebraten-Organismus ein Säugetier. Ein Säugetier, wie hierin verwendet, ist, unter anderem, aber nicht beschränkt auf, einen (Menschen)Affen, einen Hund, eine Katze, eine Ziege, ein Schaf, ein Schwein, ein Meerschweinchen, ein Kaninchen, eine Maus und eine Ratte. Der Organismus ist verschieden von einem Menschen.

In einem noch weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung eine Zusammensetzung, die Ribonukleinsäure gemäß der vorliegenden Erfindung enthält. Vorzugsweise umfasst eine derartige Zusammensetzung Negativ- und Positivkontrollen, entweder in Kombination mit der wirksamen Ribonukleinsäure oder getrennt davon. Eine derartige Zusammensetzung kann weiter ein Lösungsmittel, vorzugsweise einen Puffer umfassen.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine Ribonukleinsäure gemäß der vorliegenden Erfindung enthält und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger. Pharmazeutisch akzeptable Träger sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt und umfassen, unter anderem, Verdünnungsmittel, Puffer und dergleichen. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann weitere pharmazeutisch aktive Verbindungen umfassen. In dem Fall, wo die Erkrankung oder der Zustand, der unter Verwendung der Ribonukleinsäuren gemäß der vorliegenden Erfindung behandelt werden soll, vorzugsweise jene sind, die bereits jetzt im Zusammenhang mit der Behandlung der Erkrankungen oder Verwendungen der Erkrankungen oder Zustände verwendet werden. Infolge der verschiedenen Wirkweisen der Ribonukleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung und der Medikamente, die für die Behandlung der Erkrankungen und Zustände gemäß dem Stand der Technik verwendet werden, werden synergistische Wirkungen auftreten.

Die Erfindung und die Offenbarung oder Beschreibung werden nun unter Bezugnahme auf die Figuren und Beispiele veranschaulicht werden, aus denen weitere Merkmale, Ausführungsformen und Vorteile der vorliegenden Erfindung, Beschreibung und/oder der Offenbarung entnommen werden können. Beispiele von Ribonukleinsäuren, die nicht Teil der Erfindung sind, können als Referenzbeispiele angesehen werden.

Fig. 1 zeigt eine schematische Darstellung, die die hierin verwendete Terminologie definiert. Der obere der zwei Stränge ist der erste Strang und der Antisense-Strang der gezielten Nukleinsäure, wie beispielsweise mRNA. Der zweite Strang ist derjenige, der im Wesentlichen hinsichtlich seiner Sequenz der gezielten Nukleinsäure entspricht und somit den Sense-Strang ausbildet. Beide, d. h. der erste und der zweite Strang bilden eine doppelsträngige Struktur, typischerweise durch Watson-Crick-Basenpaarung.

Fig. 2 veranschaulicht einige Ausführungsformen der Ribonukleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung (oder wie hierin offenbart) mit (einem) Muster(n) aus modifizierten und unmodifizierten Gruppe(n) aus Nukleotiden, das hierin auch als Modifikationsmuster bezeichnet wird. Die modifizierten Gruppen aus Nukleotiden werden hierin auch als Gruppe aus modifizierten Nukleotiden bezeichnet. Die unmodifizierten Nukleotide oder unmodifizierten Gruppen aus Nukleotiden, die hierin als flankierende Gruppe(n) aus Nukleotiden bezeichnet werden, können, wie hierin verwendet, auch eine oder mehrere der Modifikation(en), wie hierin offenbart, aufweisen, die jedoch verschieden von der Modifikation der Nukleotiden ist/sind, die die Gruppe(n) aus modifizierten Nukleotiden ausbilden.

In Fig. 2A sind, wie hierin beschrieben, die modifizierten und unmodifizierten Gruppen aus Nukleotiden, d. h. Gruppen aus modifizierten Nukleotiden und den flankierenden Gruppen aus Nukleotiden auf sowohl dem ersten Abschnitt als auch auf dem zweiten Abschnitt auf entsprechenden Teilen der Abschnitte angeordnet und somit miteinander ausgerichtet (Gruppen aus modifizierten Nukleotiden auf dem ersten Strang ausgerichtet mit Gruppen aus modifizierten Nukleotiden auf dem zweiten Strang und flankierende Gruppen aus Nukleotiden auf dem ersten Strang ausgerichtet mit flankierenden Gruppen aus Nukleotiden auf dem zweiten Strang).

Wohingegen Fig. 2B, die der vorliegenden Erfindung entspricht, das auf dem ersten Strang realisierte Muster ebenfalls auf dem zweiten Strang realisiert ist, jedoch mit einer Phasenverschiebung, so dass die modifizierte Gruppe aus Nukleotiden auf dem ersten Abschnitt mit einer unmodifizierten Gruppe aus Nukleotiden des zweiten Abschnittes basenpaart und umgekehrt, so dass eine Gruppe modifizierter Nukleotide auf dem ersten Strang mit einer flankierenden Gruppe aus Nukleotiden auf dem zweiten Strang ausgerichtet ist.

In Fig. 2C ist eine weitere Möglichkeit der Anordnung der modifizierten und unmodifizierten Gruppen aus Nukleotiden realisiert. Es ist auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass das Muster des ersten Abschnittes unabhängig von dem Muster des zweiten Abschnittes ist und dass beide Muster teilweise hinsichtlich der

relativen Position zueinander in der doppelsträngigen Struktur, die durch Basenpaarung definiert ist, überlappen. In einer weiteren Ausführungsform kann das Ausmaß dieser Überlappung über die Länge des/der Abschnittes/Abschnitte bzw. Strang/Stränge variieren.

Fig. 3 zeigt das Ergebnis eines Knock-Down-Experimentes unter Verwendung von RNAi-Molekülen mit verschiedenen Endschutzgruppen. Genauer zeigt Fig. 3A, dass die verschiedenen Formen von endgeschützten RNAi-Molekülen hinsichtlich des Knock-Downs von PTEN-mRNA funktionell sind.

Fig. 3B zeigt die Sequenz verschiedener RNAi-Moleküle, die in dem Experiment verwendet wurden, dessen Ergebnis in Fig. 3A dargestellt ist. Fig. 3C zeigt das Ergebnis einer Immunoblot-Analyse von PTEN-Protein nach Behandlung mit modifizierten RNAi-Molekülen verglichen mit PTEN-spezifischen Antisense-Konstrukten.

Fig. 4 zeigt, dass der 3'-Überhang von RNAi-Molekülen für RNA-Interferenz nicht wichtig ist. Genauer zeigt Fig. 4A eine Dosis-Antwort-Kurve verschiedener RNAi-Moleküle und Fig. 4B zeigt die Sequenz von RNAi-Molekülen, die in dem Experiment verwendet wurden, dessen Ergebnis in Fig. 4A gezeigt ist.

Fig. 5 zeigt, dass die Duplexlänge der RNAi-Moleküle wenigstens 18-19 Nukleotide lang sein muss. Genauer zeigt Fig. 5B die Sequenz der PTEN-spezifischen RNAi-Moleküle, die in dem Experiment verwendet wurden, dessen Ergebnis in Fig. 5A als Dosis-Antwort-Kurve dargestellt ist.

Fig. 6 zeigt, dass vier terminale fehlgepaarte Nukleotide in RNAi-Molekülen mit einer Länge von 19 Nukleotiden hinsichtlich der Vermittlung eines Knock-Downs von Akt1 noch funktionell sind. Genauer zeigt Fig. 6B die Sequenz der in dem Experiment verwendeten RNAi-Moleküle, dessen Ergebnis in Fig. 6A gezeigt ist.

Fig. 7 zeigt weitere Ergebnisse hinsichtlich der Duplexlängenerfordernisse und Toleranz gegenüber Mutationen in siRNAs. Genauer zeigt Fig. 7A die verschiedenen Konstrukte, die verwendet wurden (linke Tafel) und die entsprechende Wirkung auf die Inhibition

von Akt1-mRNA-Expression in HeLa-Zellen relativ zur Expression von p110 α , die in den angegebenen siRNA-Molekülmengen verwendet wurden (rechte Tafel). Die Nukleotidänderungen in den Fehlpaarungs-siRNA-Molekülen sind durch Pfeile angegeben; das 3'-Desoxynukleotid, wenn es ein solches gibt, ist in Großbuchstaben angegeben. Fig. 7B zeigt die verschiedenen PTEN-spezifischen siRNAs (linke Tafel), die Inhibition von PTEN-mRNA-Expression in HeLa-Zellen, ausgedrückt als das Verhältnis PTEN/p110 α , bei verschiedenen Mengen von siRNA (mittlere Tafel), und Fig. 7C eine Western Blot-Analyse, die die Inhibition der PTEN-Proteinexpression darstellt unter Verwendung von PTEN-spezifischer siRNA (30nM) und entsprechender fehlpaarender siRNA nach 48 bzw. 96 Stunden, wobei p100 α als Ladekontrolle verwendet ist.

Fig. 8 zeigt das Ergebnis von Studien hinsichtlich der Stabilität in Serum, die RNAi-Moleküle durch 2'-O-Methylierung verliehen wird, und dass End-Modifikationen keine vorteilhaften Wirkungen auf die RNAi-Stabilität aufweisen. Genauer zeigt Fig. 8A das Ergebnis einer Gel-Elektrophorese der verschiedenen, in Fig. 8B gezeigten RNAi-Moleküle, die eine Inkubation mit fötalem Kälberserum ausgesetzt waren.

Fig. 9 zeigt, dass eine Amino-Endmodifikation zum Verlust an Aktivität führt. Fig. 9B zeigt die speziellen RNAi-Moleküle, die in Experimenten verwendet wurden, deren Ergebnis in Fig. 9A gezeigt ist, ausgedrückt als PTEN/p110 α -Expressionsniveauverhältnis. Fig. 9C zeigt die Ausgestaltungsprinzipien, die aus den in Fig. 9A dargestellten Ergebnissen abgeleitet werden können. Wie in Fig. 9C verwendet, bedeutet der Begriff funktionell funktionell aktiv in dem speziellen Testsystem, wie in dem Beispiel beschrieben und „nicht funktionell“ bedeutet nicht funktionell in dem besagten System.

Fig. 10 zeigt, dass 2'-O-Alkyl(Methyl)-Modifikationen RNAi-Moleküle stabilisieren, aber auch zur Verringerung ihrer Aktivität führen. Genauer zeigt Fig. 10C die Sequenz der RNAi-Molekülen, die in dem Experiment verwendet wurden, dessen Ergebnis als eine Dosis-Antwort-Kurve in Fig. 10A dargestellt ist. Fig. 10B zeigt das Ergebnis einer Gel-Elektrophorese der verschiedenen in Fig. 10C dargestellten RNAi-Moleküle, die einer zweistündigen Inkubation in fötalem Kälberserum ausgesetzt waren.

Fig. 11 zeigt das Ergebnis eines Experiments hinsichtlich der Wirksamkeit von RNAi-Molekülen mit Blöcken aus 2'-O-Methylmodifikationen, wobei Fig. 11A graphisch die Ergebnisse der Experimente als eine Dosis-Antwort-Kurve darstellt und Fig. 11C die Sequenzen der speziellen RNAi-Moleküle zeigt, die in den Experimenten verwendet wurden, und Fig. 11B das Ergebnis einer Gel-Elektrophorese der verschiedenen in Fig. 11C dargestellten RNAi-Moleküle zeigt, die einer zweistündigen Inkubation in fötalem Kälberserum unterzogen worden waren.

Fig. 12 zeigt, dass eine alternierende 2'-O-Methylmodifikation zu einer Aktivität der modifizierten RNAi-Moleküle verglichen mit unmodifizierten Formen führt. Genauer zeigt Fig. 12B die Sequenz der in diesem Experiment verwendeten RNAi-Moleküle, deren Ergebnis in Fig. 12A gezeigt ist. Fig. 12C zeigt die Stabilität der RNAi-Moleküle nach Inkubation in Serum für zwei Stunden, wohingegen Fig. 12D einen Immunoblot für PTEN-Protein nach Anwenden verschiedener RNAi-Moleküle auf HeLa-Zellen zeigt. Wie daraus ersichtlich sind RNAi-Moleküle mit alternierenden Modifikationen gegen Endonukleaseabbau stabilisiert und aktiv beim Vermitteln eines PTEN-Protein-Knock-Downs.

Fig. 13 zeigt das Ergebnis einer Western Blot-Analyse, um den Zeitverlauf eines PTEN-Protein-Knock-Downs zu bestimmen. Die Zellen wurden kontinuierlich mit 2'-O-Methyl-modifizierten gegenüber unmodifizierten RNAi-Molekülen unter Verwendung von kationischen Lipiden für 72 Stunden transfiziert. Proteinlysate wurden hergestellt und durch Immunoblot nach 48 und 120 Stunden analysiert. Für die 96 Stunden- und 120 Stunden-Zeitpunkte wurden die Zellen aufgeteilt, erneut ausplattiert und in Abwesenheit von RNAi-Molekülen für weitere 24 und 48 Stunden inkubiert.

Fig. 14 zeigt einen Western Blot, der den Protein-Knock-Down von PTEN darstellt, der persistent ist bei Verwendung von alternierend modifizierten RNAi-Molekülen verglichen mit unmodifizierten RNAi-Molekülen. Die Transfektion wurde für nur 5 Stunden durchgeführt und neues Medium ohne Transfektionsreagenzien wurde hinzugegeben. Die Lysate wurden analysiert durch Immunoblot 72 und 96 Stunden nach Transfektion mit den angegebenen RNAi-Molekülen.

Fig. 15 zeigt, dass siRNA-Moleküle mit distinkten 2'-O-Ribonukleotidmodifikationen eine erhöhte Stabilität in Serum aufweisen und Protein-Knock-Down in HeLa-Zellen vermitteln. Insbesondere zeigt Fig. 15A die verschiedenen siRNA-Molekülkonstrukte, die verwendet wurden (linke Tafel), wobei 2'-O-Methylribonukleotidmodifikationen unterstrichen und durch Fettdruck in der Sequenz angegeben sind. Die Inhibierung von PTEN-mRNA-Expression in HeLa-Zellen, die mit den angegebenen Mengen modifizierter siRNA-Moleküle infiziert waren, ist als Verhältnis PTEN/p110 α ausgedrückt und auf der rechten Tafel angegeben. Fig. 15B zeigt auf der linken Tafel die verschiedenen siRNA-Konstrukte, die verwendet wurden, und auf der rechten Tafel eine PAA-Gel-Elektrophorese modifizierter und unmodifizierter siRNA-Moleküle nach Inkubation in Serum. Die verschiedenen Konstrukte mit 2'-O-Methylribonukleotiden sind durch Unterstreichung und Fettdruck angegeben. Fig. 15C zeigt einen SDS-PAGE-basierten Immunoblot, der die Inhibierung von PTEN-Proteinexpression unter Verwendung verschiedener der siRNA-Konstrukte (30 nM), wie in Fig. 15A bzw. 15B gezeigt, veranschaulicht. Wiederum wird p110 α als Ladekontrolle verwendet. Schließlich ist Fig. 15D ein Immunoblot, der einen verlängerten Protein-Knock-Down zeigt, d. h. die Inhibierung von PTEN-Proteinexpression, nach Verabreichung von siRNA-Molekülen (30 nM) mit distinkten 2'-O-Methylribonukleotidmodifikationen nach 48 und 128 Stunden. Wie in Fig. 15C wird p110 α als Ladekontrolle verwendet.

Fig. 16 zeigt, dass siRNA-Moleküle mit distinkten 2'-O-Methylribonukleotidmodifikationen, die für Akt1- und p110 β -mRNA spezifisch sind, eine erhöhte Stabilität in Serum aufweisen und Protein-Knock-Down in HeLa-Zellen vermitteln. Genauer zeigt Fig. 16A auf der linken Tafel die verschiedenen Konstrukte, die verwendet wurden, wobei wiederum 2'-O-Methylribonukleotide unterstrichen und in Fettdruck dargestellt sind. Die Integrität der angegebenen siRNA-Moleküle nach Inkubation in Serum ist in der rechten Tafel gezeigt. Fig. 16B zeigt einen Immunoblot von Akt1-, Akt2- und Akt-Phosphorylierung und p110 ist als Ladekontrolle nach Transfektion der Zellen mit den angegebenen siRNAs (30 nM) verwendet. Fig. 16C zeigt verschiedene p110 β -spezifische siRNA-Konstrukte (linke Tafel), wobei die 2'-O-Methylmodifikationen unterstrichen und in Fettdruck gehalten sind, und das Ergebnis einer Immunoblot-Analyse der Inhibierung der Phosphorylierung der stromabwärts Kinase Akt1 durch die siRNA-Konstrukte (rechte Tafel). P110 α ist als Ladekontrolle verwendet worden.

Fig. 17 zeigt die Wirksamkeit verschiedener RNAi-Moleküle mit Hairpin-Strukturen als Dosis-Antwort-Kurven, während Fig. 17B die Struktur der RNAi-Moleküle zeigt, deren Ergebnis in Fig. 17A dargestellt ist. Synthetische siRNAs mit unterschiedlichen Schleifen sind hinsichtlich der Verringerung der Expression von p110 β , Akt1 und Akt2 funktionell. (14A) Inhibierung von p110 β -mRNA-Expression in siRNA-transfizierten HeLa-Zellen. Proben wurden parallel auf das Niveau der p110 β -mRNA-Expression 24 Stunden nach Transfektion der angegebenen siRNAs analysiert. Die transfizierten bimolekularen siRNAs (21mer mit 3' TT-Überhängen, Molekül 1AB) oder die monomolekularen siRNAs mit Schleifen-Strukturen sind schematisch gezeigt. Es ist beachtlich, dass die Position der Schleifen (HIV-abgeleitete pA-Schleife; (A)₁₂-Schleife) relativ zu der Antisense-Sequenz in 3A, 4A relativ zu 3B, 4B umgekehrt ist. Das 2AB siRNA-Molekül enthält 6 Fehlpaarungen in dem 21mer-Duplex und dient als Negativkontrolle zusammen mit der unbehandelten Probe. RNA wurde hergestellt und einer Echtzeit-RT-PCR (Taqman)-Analyse unterzogen. p110 β -mRNA-Niveaus sind relativ zu den mRNA-Niveaus von p110 α gezeigt, die als interne Referenz dienen. Ein jeder Balken stellt Dreifachtransfektionen dar ($\pm$ Standardabweichung). HeLa-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 50 % (2500 Zellen pro 96 Napf) mit siRNAs bei den angegebenen Konzentrationen in Wachstumsmedium transfiziert.

Fig. 18 zeigt die Wirksamkeit verschiedener RNAi-Moleküle mit intermolekularen und intramolekularen Schleifenstrukturen als Dosis-Antwort-Kurven. (18A) Inhibition von Akt1-mRNA-Expression in siRNA-transfizierten HeLa-Zellen. Proben wurden parallel auf das Niveau von Akt1- und Akt2-mRNA-Expression 24 Stunden nach Transfektion der angegebenen siRNAs analysiert. Die verschiedenen Schleifen (A-Schleifen; GAGA-Schleife und ein Polyethylenglycol (PEG)-Linker) und ihre mutmaßliche Sekundärstruktur sind schematisch gezeigt. Das siRNA-Molekül 9A ist spezifisch für Akt2 und dient als Negativkontrolle. Beachte, dass 10A und 10B keine selbst-komplementären Sequenzen enthalten und in Kombination transfiziert sind. Akt1-mRNA-Niveaus sind relativ zu den mRNA-Niveaus von p110 β angegeben, die als interne Kontrolle dienen. (18B) Inhibierung von Akt2-mRNA-Expression in HeLa-Zellen, die mit den angegebenen siRNA-Molekülen transfiziert sind. Akt2-mRNA-Niveaus sind relativ zu den mRNA-Niveaus von p110 β gezeigt. Das Akt1-spezifische Molekül 7A dient hier als Negativkontrolle.

Fig. 18C zeigt eine Western Blot-Analyse betreffend Akt-Protein, die die Funktionalität von synthetischen siRNAs mit verschiedenen Schleifen hinsichtlich des spezifischen Verringerens der Akt1- und Akt2-Expression darstellt. Die Inhibierung von Akt1- und Akt2-Proteinexpression wurde durch Immunoblot analysiert. Die Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion der angegebenen Hairpin-siRNAs (20nM) geerntet. Zellextrakte wurden durch SDS-PAGE getrennt und durch Immunblotten unter Verwendung von anti-p110-Antikörper anti-Akt 1/2 analysiert. Ähnliche Ergebnisse wurden mit einem Antikörper erhalten, der für die phosphorylierte Form von Akt1 spezifisch ist. Die Positionen von p110 α , einer weiteren katalytischen Untereinheit der PI 3-Kinase, die als Ladekontrolle verwendet wurde, und von Akt1, Akt2 und phosphoryliertem Akt (P^{*}-Akt) sind auf der linken Seite angegeben.

Fig. 19 zeigt eine NH₂-Modifikation, die hierin auch als Amino-Modifikation bezeichnet wird, die entweder am 3'-OH-terminalen Nukleotid oder dem 5'-terminalen Nukleotid vorhanden sein kann. Die Aminogruppe ist an das Phosphat gebunden, das wiederum an die OH-Gruppe des Zuckerteils gebunden ist, durch eine Alkylgruppe, die eine Alkylkette aus 1 bis 8, vorzugsweise 6 C-Atomen umfasst, wobei das zweite C-Atom nahe an der Phosphatgruppe eine CH₂OH-Gruppe daran gebunden aufweist. Als eine Alternative kann der Linker durch einen Ether ausgebildet sein, wobei der Ether aus zwei Alkoholen besteht, wobei ein Alkohol ein Aminoalkohol und der andere ein Dialkohol ist, wobei eine Alkoholgruppe an der Ausbildung der Ethergruppe beteiligt ist und die andere eine OH-Gruppe ist, die an einem jeden der C-Atome angeordnet ist, vorzugsweise an dem zweiten C-Atom relativ zur Phosphatgruppe.

Beispiel 1: Dosis-Antwort synthetischer Duplex-RNAi-Moleküle

Bei diesem Beispiel wurde der Einfluss von NH₂-Endschutzgruppen auf die Aktivität von Duplex-RNAi-Molekülen untersucht. Synthetische siRNAs wurden von Biospring (Frankfurt, Deutschland) gekauft. Die Ribo-Oligonukleotide wurden in RNase-freiem TE auf eine Endkonzentration von 50 μ M resuspendiert. Im Falle von bimolekularen siRNA-Molekülen wurden gleiche Aliquots (100 μ M) kombiniert zu einer Endkonzentration von 50 μ M. Für die Ausbildung von intramolekularen Duplexen wurden die siRNAs bei 50°C

für 2 Minuten in glühendem Puffer (25mM NaCl; 5mM MgCl₂) inkubiert und auf Raumtemperatur abgekühlt. Transfektionen wurden in Platten mit 96 Näpfen oder 10cm-Platten (bei 30 % bis 50 % Konfluenz) unter Verwendung verschiedener kationischer Lipide wie beispielsweise Oligofectamin, Lipofectamin (Life Technologies), NC388 (Ribozyme Pharmaceuticals, Inc., Boulder, CO), oder FuGene 6 (Roche) gemäß den Anweisungen der Hersteller durchgeführt. RNAi-Moleküle wurden transfiziert durch Hinzugeben von vorab ausgebildetem 5x-konzentriertem Komplex aus geglähter RNAi und Lipid in Serum-freiem Medium zu Zellen in vollständigem Medium. Vor der Transfektion wurden 2500 HeLa-Zellen pro Napf 15 bis 18 Stunden vor der Transfektion für das 96-Napf-Format transfiziert.

Das Gesamttransfektionsvolumen beträgt 100 µl für Zellen, die in Platten mit 96 Näpfen ausplattiert waren, und 10 ml für in 10cm-Platten ausplattierten Zellen. Die Lipidendkonzentration betrug 0,8 bis 1,2 µg/ml, abhängig von der Zelldichte; die RNAi-Konzentration ist in einem jeden Experiment angegeben.

Man erlaubte, dass die Komplexbildung für 30 Minuten bei 37°C stattfand. Komplexe wurden zu den Zellen hinzugegeben, um eine 1x Endkonzentration von sowohl Lipid als auch RNAi zu ergeben. Abhängig von der nach Transfektion durchgeführten Analyse wurden Zellen lysiert unter Verwendung von Standardzelllysepuffer für die Proteinextraktion (Klippel, A., Escobedo, J. A., Hirano, M. and Williams, L. T. (1994). Mol. Cell Biol., 14, 2675-2685) oder einen denaturierenden Puffer für RNA-Isolierung gemäß dem RNA-Isolierungskit (Invitex, Berlin (Deutschland)), 24 bis 48 Stunden nach Transfektion für RNA-Analyse und 48 bis 72 Stunden nach Transfektion für Proteinanalyse durch Western Blot.

Bestimmung von relativen Mengen von RNA-Niveaus durch Taqman-Analyse:

24 Stunden nach Transfektion wurde die RNA von Zellen, die in Platten mit 96 Näpfen transfiziert waren, isoliert und gereinigt unter Verwendung des Invisorb RNA HTS 96 kit (Invitex GmbH, Berlin). Inhibierung von PTEN-mRNA-Expression wurde nachgewiesen durch Echtzeit-RT-PCR (Taqman)-Analyse unter Verwendung von 300 nM PTEN 5'-Primer CACCGCCAAATTTAACTGCAGA, 300 nM PTEN 3'-Primer AAGGGTTTGATAAGTTCTAGCTGT

und 100 nM der PTEN-Taqman-Sonde Fam-TGCACAGTATCCTTTTGAAGACCATAACCCA-Tamra in Kombination mit 40 nM β -Actin 5'-Primer GTTTGAGACCTTCAACACCCCA, 40 nM β -Actin 3'-Primer GACCAGAGGCATACAGGGACA und 100 nM der β -Actin Taqman-Sonde Vic-CCATGTACGTAGCCATCCAGGCTGTG-Tamra. Die Akt-Primer- und Sonden wurden wie in Stemberger et al. bestimmt (Stemberger, a.a.O.) und werden verwendet gemäß den Angaben des Herstellers (Applied Biosystem; Verwendung des Amplicon-Sets). Die Primer und Sonden können auch ausgestaltet werden unter Verwendung des Software-Programms Primer Express (Applied Biosystem). Die Reaktion wurde in 50 μ l durchgeführt und auf dem ABI PRISM 7700-Sequenz-Detektor (Applied Biosystem) gemäß den Anweisungen des Herstellers unter den folgenden Bedingungen getestet: 48°C für 30 Minuten, 95°C für 10 Minuten, gefolgt von 40 Zyklen aus 15 Sekunden bei 95°C und einer Minute bei 60°C.

RNA-Knock-Down ist durch Echtzeit-RT-PCR-Analyse von HeLa-Zellen gezeigt, die mit 21 nt-langen Duplex-Molekülen transfiziert waren, die entweder unmodifiziert oder mit entweder NH₂ oder invertierten abasischen Nukleotiden am 5'-Ende modifiziert waren, bei einer Lipidträgerkonzentration von 1,0 μ g/ml. Die Zelldichte betrug 2000 Zellen/Napf. Modifikationen am 3'-Ende sind entweder RNA-Überhänge, RNA-Überhänge mit Aminogruppen oder DNA-Überhänge.

Herstellung von Zellextrakten und Immunbloten. Zellen wurden zweifach mit kalter Phosphat-gepufferter Saline gewaschen und bei 4° C in Lysepuffer lysiert, der 20 mM Tris (pH 7,5), 137 mM NaCl, 15 % (Vol/Vol) Glycerol, 1 % (Vol/Vol) Nonidet P-40 (NP-40), 2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 10 mg Aprotinin pro ml, 20 mM Leupeptin, 2 mM Benzamidin, 1 mM Natriumvanadat, 25 mM β -Glycerolphosphat, 50 mM NaF und 10 mM NAPPi enthält. Lysate wurden geklärt durch Zentrifugation bei 14.000 x g für 5 Minuten und Aliquots der Zellextrakte, die gleiche Mengen an Protein enthielten, wurden hinsichtlich Proteinexpression durch Western-Bloten analysiert. Die Proben wurden durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulosefilter (Schleicher & Schuell) transferiert. Die Filter wurden blockiert in TBST-Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,05 % (Vol/Vol) Tween 20, 0,5 % (Gew/Vol) Natriumazid), der 5 % (Gew/Vol) getrocknete Milch enthält. Die entsprechenden Antikörper wurden in TBST mit geeigneten Verdünnungen hinzugegeben. Gebundener Antikörper wurde nachgewiesen

unter Verwendung von anti-Maus- oder anti-Kaninchen-konjugierter Meerrettichperoxidase (Transduction Laboratories) in TBST, gewaschen und entwickelt unter Verwendung des SuperSignal West Dura (Pierce) oder von ECL (Amersham)-chemilumineszierenden Substraten (siehe Sternberger et al. (2002). *Antisense. Nucl. Ac. Drug Dev. in press*).

Antikörper. Der murine monoklonale anti-p110-Antikörper U3A und der murine monoklonale anti-p85-Antikörper N7B sind beschrieben worden (Klippel et al., 1994, aaO). Polyklonale Kaninchen-anti-AKT und anti-Phospho-Akt (S473)-Antikörper wurden von Cell Signaling Technology erhalten. Der murine monoklonale anti-PTEN-Antikörper stammt von Santa Cruz Biotechnology. Das PTEN 53-spezifische Antisensemolekül, d. h. GeneBloc, ist beschrieben in Sternberger et al. (Sternberger aaO) mit der folgenden Sequenz (ucuccuTTGTTTCTGcuaacga), wobei die in Kleinbuchstaben dargestellten Nukleotide Ribonukleotide sind, wohingegen die Nukleotide in Großbuchstaben Desoxyribonukleotide sind. Das Antisense-Molekül ist ebenfalls identisch zu RNAi 1A ohne TT.

Die Ergebnisse sind in Fig. 3A und die entsprechenden RNAi-Moleküle in Fig. 3B gezeigt, die gegen die mRNA von PTEN gerichtet sind. Die in Kleinbuchstaben geschriebenen Nukleotide stellen Ribonukleotide dar, wohingegen Großbuchstaben Desoxyribonukleotide darstellen. Der Begriff NH₂ zeigt an, dass die 3'-Position des Ribonukleotids durch eine Amino-Gruppe modifiziert war. Die RNAi-Moleküle, die in diesem und anderen Beispielen, wie sie hierin offenbart sind, verwendet sind, werden auch als kleine interferierende RNA-Moleküle (siRNA) bezeichnet. Es soll festgehalten werden, dass in einer jeden der hierin enthaltenen Figuren der obere Strang der Antisense- oder erste Strang ist, wohingegen der untere Strang der Sense- oder zweite Strang des interferierenden RNA-Moleküls ist.

Wie aus Fig. 3A entnommen werden kann, sind Endmodifikationen wie beispielsweise Aminomodifikationen und invertierte abasische Nukleotide Modifikationen der terminalen OH-Gruppe der Nukleinsäure ebenso potent wie unmodifizierte Enden, wenn die Modifikation am 3'-Ende des Antisense-Stranges angeordnet ist (siehe auch Fig. 8A; 8B). Deshalb werden chemische Modifikationen zur Stabilisierung oder mit anderen

vorteilhaften Eigenschaften (Abgabe) toleriert werden ohne Aktivitätsverlust, wenn sie am 3'-OH lokalisiert sind; insbesondere, wenn das 3'-OH an einem überhängenden Nukleotid angeordnet ist.

Für das in Fig. 3C gezeigte Experiment wurden ähnliche Bedingungen wie oben angegeben verwendet. Der erste Strang und der zweite Strang der RNAi waren entweder durch eine NH₂-Gruppe an der 3'-Position des Riboseteils oder durch ein invertiertes abasisches Nukleotid an der Position modifiziert. Das erste Konstrukt ist als siRNA-NH₂ (3A3B) bezeichnet, das zweite als siRNA-iB (4A4B). Die Sequenz beider Moleküle ist in Fig. 3B dargestellt. Der Begriff 3A3B zeigt an, dass die interferierende Ribonukleinsäure aus Strang 3A als den Antisense-Strang und Strang 3B als den Sense-Strang besteht. Aus Vergleichsgründen wurde ein Antisense-Oligonukleotid erzeugt, das als GB53 bezeichnet ist (Steinberger et al. aaO), das ebenfalls gegen die mRNA von PTEN gerichtet war. Die Besonderheiten dieses letzteren Experimentes waren die folgenden.

Wie aus Fig. 3C entnommen werden kann, sind endgeschützte RNAi-Moleküle, wie sie in Fig. 3B dargestellt sind, funktionell dahingehend, dass sie einen PTEN-Protein-Knock-Down ergeben.

Aus diesem Beispiel kann entnommen werden, dass beide Endschutzgruppen RNAi-Moleküle hinsichtlich des Knock-Downs von PTEN-Protein aktiv machen. Diese Inhibierung ist so wirksam wie eine Inhibierung mit Antisense-Konstrukten, aber bei niedrigeren verwendeten Konzentrationen, was einen klaren Vorteil gegenüber der bereits sehr leistungsfähigen Antisense-Technologie darstellt.

Beispiel 2: Überhang-Erfordernisse für RNAi-Duplexaktivität in vivo

Die experimentellen Vorgehensweisen waren die gleichen wie im Zusammenhang mit Beispiel 1 dargestellt mit der Ausnahme, dass die PTEN-mRNA-abzielenden interferierenden RNAi-Moleküle unterschiedlich ausgestaltet waren. Die Ergebnisse sind in Fig. 4A als Dosis-Antwort-Kurven gezeigt, wobei Fig. 4B die besondere Sequenz und Modifikationen der interferierenden RNAi-Moleküle zeigt, die verwendet wurden, um die in Fig. 4A dargestellten Daten zu erzeugen. Die Nomenklatur ist so, dass,

beispielsweise, RNAi 18 aus Strang 18A als Antisense-Strang und Strang 18B als Sense-Strang zusammengesetzt ist.

Glattendige Moleküle werden mit Molekülen mit 3'-Überhängen (RNAi 18) und 5'-Überhängen (RNAi 30 und RNAi 31) hinsichtlich ihrer Aktivität verglichen, PTEN-mRNA in HeLa-Zellen herunterzuregulieren (Knock-Down). Die Aktivität von glattendigen Molekülen (RNAi 28) und Molekülen mit 5'-Überhängen ist vergleichbar mit der Aktivität von Molekülen mit 3'-Überhängen. Dies zeigt, dass 3'-Überhänge für RNAi-Aktivität nicht essentiell sind.

Beispiel 3: Duplexlängenerfordernis von interferierenden RNA-Molekülen für RNAi-Aktivität in vivo

Der experimentelle Ansatz war ähnlich dem im Zusammenhang mit Beispiel 1 dargestellten, mit der Ausnahme, dass die interferierenden RNA-Moleküle gegen die mRNA von Akt1 gerichtet waren. Die Negativkontrolle, um die Spezifität der RNAi-Moleküle zu zeigen, war wiederum p110-mRNA. Die experimentellen Ergebnisse sind in Fig. 5A gezeigt, wobei die Besonderheiten der interferierenden RNAi-Moleküle, wie sie verwendet wurden, in Fig. 5B gezeigt sind. Ähnliche Experimente wurden durchgeführt mit weiteren siRNA-Konstrukten, die in Fig. 7A, linke Tafel dargestellt sind, wobei die Pfeile Fehlpaarungen angeben und Desoxyribonukleotide in Großbuchstaben dargestellt sind. Die Inhibierung von Akt1-mRNA-Expression in HeLa-Zellen, die mit den angegebenen Mengen von siRNA-Molekülen transfiziert sind, ist in der rechten Tafel von Fig. 7A gezeigt.

Die Taqman-Analyse von Akt-RNA von HeLa-Zellen, die mit verschiedenen RNAi-Molekülen transfiziert waren, zeigt, dass der doppelsträngige Duplex der siRNA-Moleküle länger als 17 Basenpaare sein muss, um eine Aktivität zu zeigen, wohingegen Moleküle mit 17 Basenpaaren langen Duplexen oder kürzer nicht funktionell sind, selbst wenn Sequenz-spezifische Überhänge hinzugefügt sind. Die kürzesten, erfolgreich getesteten RNAi-Moleküle waren 18 bis 19 Nukleotide oder Basenpaare lang. Es soll festgehalten werden, dass die Ausgestaltung des interferierenden RNA-Moleküls 51A/51B, das als RNAi51 bezeichnet ist, derjenigen entspricht, wie sie in der

internationalen Patentanmeldung WO 01/75164 beschrieben ist. Das RNAi-Molekül 55A/55B umfasst einen Abschnitt aus 17 Nukleotiden und weist eine eindeutig verringerte Aktivität hinsichtlich des Abbaus von Akt1-mRNA auf.

Wie aus Fig. 7A entnommen werden kann, sind 19 nt lange Duplexe hocheffizient bei der Verringerung von Akt1-mRNA-Niveaus unabhängig von der Art (Desoxy- oder Ribonukleotide) des 3'-Überhanges (vergleiche Moleküle 1AB, 2AB, 3AB, 4AB). Die 17 Nukleotid-lange siRNA (Molekül 5AB) zeigte eine dramatisch verringerte Abschaltaktivität, was das oben ausgedrückte Verständnis bestätigt, dass aktive siRNA-Duplexe wenigstens 18 nt oder länger sein sollten. Ohne durch eine Theorie gebunden sein zu wollen, kann dieses Ergebnis mechanistisch durch zwei unterschiedliche Erfordernisse erklärt werden. Erstens kann eine minimale Basenpaarung aus 18 nt zwischen dem Antisense der siRNA und der Ziel-mRNA obligatorisch sein, oder, zweitens, erfordert der Einbau in den RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC) eine Minimallänge des siRNA-Duplex. Um diese Frage zu adressieren, wurde ein 19 nt langes siRNA-Duplexmodell mit einer und zwei terminalen Mutationen (CG und UA-Inversion) relativ zur Wildtyp-Sequenz synthetisiert (Moleküle 6AB und 7AB). Beide Moleküle, selbst das Molekül mit einem Abschnitt aus nur 15 nt, der mit der Ziel-mRNA basenpaarte, war bei der Induktion des Akt1-mRNA-Niveaus funktionell. Deshalb kann gefolgert werden, dass die Duplexlänge selbst, aber nicht die Basenpaarung der Antisense-siRNA mit der Ziel-RNA die Minimallänge funktioneller siRNAs zu bestimmen scheint. Dies schlägt vor, dass die Länge der doppelsträngigen Helix eine wichtige Determinante für den Einbau in den RISC-Komplex ist. Die eingeführten Fehlpaarungen an den terminalen Enden der siRNA-Duplexe hatten einen geringen Einfluss auf RNA-Interferenz.

Mit Blick auf die experimentellen Ergebnisse ist das Minimalerfordernis für optimale RNAi-vermittelte Interferenz einer Duplexlänge von 18 oder 19 Nukleotiden, unabhängig von dem weiteren Design der RNAi-Moleküle, wie beispielsweise glattendig oder mit 5'-Überhang oder irgendeiner anderen Form, wie hierin offenbart, sondern allgemein auf RNAi-Moleküle anwendbar. Es muss jedoch anerkannt werden, dass die spezielle Ausgestaltung der RNAi-Moleküle diesen Molekülen weitere Vorteile verleihen kann, wie beispielsweise erhöhte Wirksamkeit bzw. erhöhte Stabilität.

Beispiel 4: Ziel-Antisense-Homologie-Erfordernis für RNAi in vivo

Der experimentelle Aufbau war ähnlich zu dem in Beispiel 1 beschriebenen, wobei die RNAi spezifisch für Akt1 ist. Zusätzlich wurde ein PTEN-spezifisches interferierendes RNA-Molekül konstruiert und als Negativkontrolle verwendet. Die Ergebnisse sind in Fig. 6A und Fig. 6B gezeigt. Grundsätzlich wurde das gleiche Experiment ausgeführt unter Verwendung weiterer siRNA-Moleküle, wie in Fig. 7B dargestellt, wobei die Ergebnisse in Fig. 7B (rechte Tafel) bzw. Fig. 7C dargestellt sind.

Nachdem die minimale Duplexlänge von 18 oder mehr als 18 Nukleotiden für funktionelle siRNA-Moleküle etabliert war, stellten wir die Frage, wie viele passende Nukleotide zwischen Ziel-mRNA und siRNA für die Abschaltaktivität notwendig sind. Wie durch Taqman-Analyse an Akt1-RNA gezeigt, ist ein Abschnitt aus 19 bis 15 Nukleotiden, die perfekt zu der Ziel-RNA passen, in diesem Falle Akt1, ausreichend, um RNAi-Aktivität zu vermitteln. Ein PTEN-spezifisches RNAi-Molekül verringert die RNA-Mengen von Akt1 nicht, was somit die Spezifität dieses Ansatzes bestätigt. Fehlpaarungen aus einem oder zwei Nukleotiden an einem oder beiden Enden eines Stranges sind funktionell, was nahelegt, dass ein homologer Abschnitt aus 15 nt zwischen einer Ziel-mRNA und RNAi für das Abschalten eines Gens ausreichend ist. Es kann aus diesen Daten gefolgert werden, dass ein unspezifisches Abschalten eines Gens durch Zufall durch unspezifisches Binden an nichtverwandte Ziele erfolgen kann. Dies basiert auf dem Verständnis, dass ein Abschnitt aus 15 bis 17 passenden Basenpaaren für ein einzelnes Gen nicht spezifisch ist und durch Zufall, mit Blick auf die Komplexität und Größe des Genoms oder Transkriptoms von Vertebraten, auftreten wird. Neben den zuvor beschriebenen Experimenten wurde auch die Position der Fehlpaarung nachfolgend analysiert. Zu diesem Zweck wurde eine 19 nt lange glattendige siRNA verwendet, die gegen PTEN-mRNA gerichtet war. Die Sequenzänderungen in einem siRNA-Strang wurden ausgeglichen durch komplementäre Änderungen in dem anderen Strang, um ein Auseinanderreißen der Duplexbildung zu vermeiden. Wie sowohl aus Figs. 7B als auch C entnommen werden kann, war eine siRNA mit nur einer Punktmutation im Zentrum des Moleküls hinsichtlich seiner Fähigkeit stark eingeschränkt, mRNA und Protein-Niveaus zu verringern. Dieses Ergebnis zeigt an, dass die RNA-Maschinerie stark zwischen

perfektem und nicht-perfektem Basenpaaren zwischen Ziel-mRNA und siRNA im Zentrum des Duplex unterscheidet. Diese extreme Abhängigkeit von einer perfekten Komplementarität zwischen Ziel- und siRNA ist bereits für RNAi-Interferenz im Drosophila-System beschrieben worden, jedoch noch nicht im Zusammenhang mit Säugersystemen wie beispielsweise HeLa.

Auf der Grundlage dieser Beobachtung verringert die vorliegende Erfindung dieses Off-Target-Problem von siRNA durch zwei Ansätze. Zuerst durch Verringern der Moleküllänge der siRNA-Moleküle auf die minimalen Erfordernisse (18-19 nt) und dadurch Verringern der Chance einer Homologie zu einem Off-Target. Zweitens, durch Inaktivieren des Sense-Stranges, um eine unerwünschte RNA-Abschaltung zu verhindern, die durch eine zufällige Komplementarität des Sense-Stranges zu einer nichtverwandten Ziel-RNA bedingt wird (siehe auch Beispiel 6).

Beispiel 5: Stabilität von modifizierten RNAi-Molekülen in Serum

Oligonukleotide wurden in menschlichem Serum für 15 Minuten und 2 Stunden inkubiert und auf 10 % Polyacrylamidgel zusammen mit unbehandelten Kontrollen geladen. Die Ergebnisse sind in Fig. 8A gezeigt. Die verschiedenen RNAi-Moleküle, die verwendet wurden, sind in Fig. 8B gezeigt und detaillierter beschrieben.

Aus diesem Beispiel kann entnommen werden, dass die RNAi-Duplexe von RNA-Molekülen, bei denen alle Nukleotide mit 2'-O-Methylgruppen modifiziert sind (RNAi-Moleküle 79A79B und 28A28B) eine höhere Stabilität in Serum aufweisen. Es ist auch gezeigt, dass ein glattendiger Duplex stabiler ist als das Duplexmolekül mit Überhängen. Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass der Endschutz (z. B. iB oder Amino) die Stabilität in Serum nicht erhöht.

Zusätzlich kann auch gefolgert werden, dass im Gegensatz zu dem Verständnis in der Technik vor dem Einreichen dieser Anmeldung Endonukleasen statt Exonukleasen beim Schutz von RNAi-Molekülen wichtiger sind.

Im Lichte dessen kann zusätzlich zu den verschiedenen Modifikationen oder Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen RNAi-Molekülen, wie sie in dieser Anmeldung offenbart sind, eine weitere oder zusätzliche Modifikation der Nukleotide in der Verwendung eines Phosphorthioatrückgrates der RNAi-Moleküle gesehen werden, die entweder vollständig oder teilweise sein kann, um die Endonuklease-Funktion zu inhibieren. Ein vollständiges Phosphorthioatrückgrat bedeutet, dass ein jedes Nukleotid eine Phosphorthioatgruppe aufweist, wohingegen ein teilweises Phosphorthioatrückgrat bedeutet, dass nicht alle der Nukleotide, die das RNAi-Molekül ausbilden, eine Phosphorthioatmodifikation aufweisen. Diese Modifikation ist geeignet, die Lebenszeit von RNAi-Molekülen unabhängig von der weiteren Ausgestaltung von RNAi-Molekülen zu erhöhen. In dieser Hinsicht ist eine teilweise oder vollständig Phosphorthioat-modifizierte RNAi Gegenstand der vorliegenden Erfindung, die im Zusammenhang mit den verschiedenen Strategien für die Ausgestaltung von interferierenden RNA-Molekülen, wie sie hierin offenbart sind, oder mit irgendeiner der in der Technik bekannten Ausgestaltungen realisiert sein kann.

Beispiel 6: Inaktivierung des Sense-Stranges durch NH₂-Endschutzgruppen an den 5'- und 3'-Enden

Der experimentelle Aufbau war ähnlich dem im Zusammenhang mit Beispiel 1 beschriebenen, wobei die Zielnukleinsäuresequenz PTEN-mRNA ist. Die Konzentration von HeLa-Zellen betrug 2000 Zellen pro Napf. RNA von PTEN wurde in Taqman-Tests nach Transfektion unterschiedlich modifizierter RNAi-Moleküle analysiert. Die verschiedenen interferierenden RNA-Moleküle, die verwendet wurden, sind in Fig. 9B dargestellt, wohingegen die experimentellen Ergebnisse in Fig. 9A gezeigt sind.

Wie aus diesen Dosis-Antwort-Kurven verschiedener RNAi-Moleküle, die in Fig. 8A dargestellt sind, entnommen werden kann, sind RNAi-Moleküle funktionell, wenn der Sense-Strang, d. h. der zweite Strang, an beiden Enden mit Aminogruppen modifiziert ist. Besonders wirksam sind die RNAi-Moleküle 20A26B, 18A26B und 28A26B. Die niedrigste Aktivität wird von dem RNAi-Molekül 26A26B gezeigt, das einer Endmodifikation an allen vier Enden des Duplex entspricht (Tuschl ist 18AB).

Die RNAi-Aktivität wird jedoch auch erreicht, wenn der Antisense-Strang, d. h. der erste Strang, nur an dem 3'-Ende modifiziert ist, wodurch eine freie OH-Gruppe am 5'-Ende verbleibt (RNAi-Konstrukte 22A26B; 20A26B). Es gibt keine Aktivität, wenn der Antisense-Strang an sowohl dem 5'- als auch dem 3'-Ende mit Aminogruppen modifiziert ist (26A26B). Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass ein jegliches Ende des Antisense-Stranges und spezieller das 5'-Ende des Antisense ohne Modifikation verbleiben sollte. Zusätzlich ist es wert festzuhalten, dass die NH₂-Endmodifikation verwendet werden kann, um den Sense-Strang an dem 5'- und 3'-Ende zu inaktivieren und deshalb off-target-Wirkungen zu verringern, die durch einen ansonsten funktionellen Sense-Strang vermittelt werden, was zu einer signifikant erhöhten Spezifität der RNAi-Moleküle führt, was für Target-Validierung ebenso wie für eine jegliche medizinische Verwendung von RNAi-Molekülen vorteilhaft ist.

Die weitere Verallgemeinerung der Ergebnisse aus diesem Experiment ist in Fig. 9C dargestellt. Funktionell aktive RNAi sind entsprechend jene, die keine Amino-Modifikation am Antisense-Strang oder eine Aminomodifikation nur an dem 3'-Ende des Antisense-Stranges aufweisen, wohingegen eine Aminomodifikation an beiden Enden des Antisense-Stranges nicht funktionell ist, d. h. nicht zu einem Knock-Down der Ziel-mRNA führt.

Beispiel 7: Einfluss von 2'-O-Methyl-Modifikation von RNAi-Molekülen hinsichtlich Schutz vor Endonukleasen

RNA-Knock-Down ist wiederum unter Verwendung der Echtzeit RT-PCR-Analyse an HeLa-Zellen gezeigt, die mit RNAi-Duplex-Molekülen transfiziert sind, die gegen die PTEN-mRNA gerichtet sind, wie in Fig. 10A dargestellt. Die experimentellen Verfahrensweisen waren grundsätzlich die gleichen wie in Beispiel 1 angegeben. Die Struktur der untersuchten RNAi-Moleküle und ihre Dosisantworten, die in Fig. 10A gezeigt sind, sind in Fig. 10C gezeigt. Die in Fettdruck gehaltenen Nukleotide sind jene mit einer 2'-O-Methyl-Modifikation.

Es ist durch die Dosis-Antwort-Kurven, die für verschiedene RNAi-Moleküle in Fig. 10A gezeigt sind, veranschaulicht, dass interne 2'-O-Alkylgruppen RNAi-Aktivität verringern.

Vorzugsweise sind solche 2'-O-Alkylgruppen 2'-O-Methyl- oder 2'-O-Ethylgruppen. Moleküle mit unmodifizierten Nukleotiden in Verbindung mit 2'-O-Alkyl-Modifikation zeigen jedoch eine signifikante Aktivität. Wie auch in Fig. 10A dargestellt, tritt keine Aktivität auf, wenn der Antisense-Strang vollständig mit 2'-O-Methylgruppen modifiziert ist und deren Sense-Strang nicht modifiziert ist (siehe, beispielsweise, RNAi-Molekül 79A28B). Im Lichte dieser Ergebnisse eines Stabilitätstests wie beispielsweise Inkubieren der verschiedenen RNAi-Moleküle in Serum, wie in Fig. 10B gezeigt, zeigt, dass 2'-O-Alkyl-Modifikationen RNAi-Moleküle gegen Abbau stabilisieren. Diese eindeutig vorteilhafte Wirkung wird jedoch in einem bestimmten Umfang ausgeglichen durch die Wirkung, dass 2'-O-Alkyl-Modifikationen im Allgemeinen zu einer verringerten Knock-Down-Aktivität führen. Entsprechend muss die Ausgestaltung von RNAi-Molekülen Stabilität gegen Aktivität ausbalancieren, was es wichtig macht, dass man sich der verschiedenen Ausgestaltungsprinzipien, wie sie in der vorliegenden Anmeldung offenbart sind, bewusst ist.

Beispiel 8: Einfluss von Blöcken interner 2'-O-Methyl-Modifikationen auf die Stabilität von RNAi-Molekülen in Serum

Der experimentelle Ansatz im Zusammenhang mit dieser Studie war tatsächlich der gleiche, wie der in Beispiel 1 beschriebene. Wiederum wird PTEN-RNA durch Echtzeit-FT-PCR an HeLa-Zellen bei einer Dichte von 2000 Zellen pro Napf analysiert, die mit unterschiedlichen Dosen von RNAi-Molekülen transfiziert waren. RNAi-Moleküle wurden in Serum für 2 Stunden inkubiert und auf einem 10 % Polyacrylamidgel analysiert. Die Ergebnisse dieser Studie sind in Figs. 11A bis 11C dargestellt, wobei Fig. 11A die Dosis-Antwort verschiedener RNAi-Moleküle zeigt, die in Fig. 11C dargestellt sind, und Fig. 11B die Ergebnisse eines Stabilitätstests unter Verwendung von einigen der in Fig. 11C gezeigten RNAi-Molekülen zeigt. Es soll verstanden werden, dass die in Fig. 11C in Fettdruck dargestellten Nukleotide diejenigen sind, die eine Modifikation tragen, die in diesem Falle eine 2'-O-Methyl-Modifikation des Riboseteils der Nukleotide ist.

Es existiert eine dosisabhängige Inhibierung durch die unmodifizierten RNAi-Moleküle. Es ist auch gezeigt, dass die 2'-O-Methyl-Modifikation der neun Kernnukleotide die RNAi in Serum stabil macht und eine Aktivität des Duplex im Sinne des Interferenz-

Phänomens erlaubt, was zu einem Abbau der PTEN-mRNA führt. Die Gesamtmodifikation des Sense-Stranges macht das RNAi-Molekül in Serum stabil und erlaubt eine gewisse Aktivität.

Abwechselnde Blöcke aus fünf Nukleotiden mit 2'-O-Methyl-Modifikation machen das RNAi-Molekül stabil in Serum und erlauben eine Aktivität auf PTEN-RNA, wie gezeigt durch Inkubation des RNAi-Duplex in Serum für 2 Stunden und Laden der Proben auf ein 10 % Polyacrylamidgel. Wie aus Fig. 11B entnommen werden kann, ist der Duplex umfassend die Stränge 80A und 80B nach Inkubation in Serum für 2 Stunden stark abgebaut. Der Duplex, der aus den Strängen 82A und 82B besteht, bestätigt das Ergebnis, dass das 5'-Ende des ersten Stranges, der den Antisense-Strang umfasst, nicht am 5'-terminalen Nukleotid modifiziert sein soll (vergleiche 82A und 82B mit dem umgekehrt orientierten 81A81B). Dies wird auch bestätigt durch die Ergebnisse, die erhalten wurden, wenn der Duplex aus den Strängen 86A und 86B besteht, der sowohl aktiv als auch in Serum stabilisiert ist. Es ist beachtlich, dass Moleküle mit unmodifizierten Blöcken am terminalen 5'-Ende des Antisense-Stranges aktiver sind, wobei die 5'-terminale OH-Gruppe vorzugsweise nicht derivatisiert ist.

Weitere Experimente wurden durchgeführt unter Verwendung verschiedener Modifikationsmuster aus 2'-O-Methylmodifikation der Nukleotide. Die Ergebnisse davon sind in Fig. 12A bis 12C gezeigt und werden weiter hierin in Beispiel 9 diskutiert.

Beispiel 9: Der Einfluss von alternierender interner 2'-O-Alkyl-Modifikation auf Serumstabilität von RNAi-Molekülen

Der experimentelle Aufbau für die Durchführung dieser Art von Studie war der gleiche, wie er im Zusammenhang mit den in Beispiel 1 bzw. Beispiel 8 berichteten Studien verwendet wurde, wobei die Ziel-Nukleinsäure wiederum PTEN-mRNA war. HeLa-Zellen wurden mit den verschiedenen RNAi-Molekülen transfiziert, die in Fig. 12B dargestellt sind, und RNA-Knock-Down wurde gezeigt unter Verwendung von Echtzeit-RT-PCR an PTEN-RNA in einer dosisabhängigen Art (Fig. 12A). Die Stabilität der verschiedenen RNAi-Moleküle nach 15 Minuten und 2 Stunden in Serum bei 37° C ist in Fig. 12C gezeigt und ein Western Blot für p110 und PTEN als das Zielprotein der verschiedenen RNAi-

Moleküle ist in Fig. 12D gezeigt, wobei die getesteten RNAi-Moleküle in beiden Experimenten, die Fig. 12C und Fig. 12D zugrunde liegen, identisch sind.

Wie in Fig. 12A und 12C gezeigt, machen Nukleotide, die mit 2'-O-Methylgruppen modifiziert sind, und mit unmodifizierten Nukleotiden abwechseln, RNAi-Moleküle in Serum stabil, während sie erlauben, dass sie in dem Sinne aktiv sind, dass sie mit Ziel-mRNA interferieren. Es ist gezeigt, dass die Inkubation von RNAi-Duplexmolekülen für 15 Minuten und 2 Stunden in Serum den unmodifizierten Duplex und den Duplex abbauen wird, wo die zehn am meisten 5'-positionierten Nukleotide unmodifiziert sind.

Bei den in Fig. 12B dargestellten RNAi-Molekülen sind verschiedene Muster aus modifizierten und unmodifizierten Nukleotiden realisiert. Das RNAi-Molekül 94A1/94B1 umfasst eine Struktur, wobei ein modifiziertes Nukleotid von einem unmodifizierten Nukleotid flankiert ist, wobei das unmodifizierte Nukleotid am 5'-Ende des ersten Stranges angeordnet ist. Das RNAi-Molekül, das aus den Strängen 94A2 und 94B2 besteht, ist ein weiteres Beispiel, wo die modifizierten Nukleotide und die unmodifizierten Nukleotide des ersten und zweiten Stranges an gegenüberliegenden Stellen angeordnet sind. Im Gegensatz dazu hat das RNAi-Molekül, das aus den Strängen 94A1 und 94B2 besteht, das gleiche Muster aus modifizierten und unmodifizierten Nukleotiden. Es existiert jedoch eine Phasenverschiebung, so dass die modifizierten Nukleotide Basenpaare mit einem unmodifizierten Nukleotid ausbilden. Die zwei RNAi-Moleküle, die aus den Strängen 94A1 und 94B1 und Strängen 94A2 und 94B2 bestehen, unterscheiden sich darin, dass im ersten Falle der erste Strang mit einem unmodifizierten Nukleotid beginnt und das korrespondierende erste Nukleotid auf dem zweiten Strang, d. h. das Nukleotid am 3'-Ende des zweiten Stranges mit einem unmodifizierten Nukleotid beginnt, wobei die Anordnung dazu entgegengesetzt ist in dem RNAi-Molekül, das aus 94A2 und 94B2 besteht.

Zusätzlich sind alternierend modifizierte RNAi-Moleküle, wie sie in Fig. 12B gezeigt sind, funktionell hinsichtlich des Vermittelns eines PTEN-Protein-Knock-Downs wie in Fig. 12D gezeigt, aber nur, wenn das zweite 5'- und zweite 3'-terminale Nukleotid nicht modifiziert sind (siehe 94A294B1 und 94A294B2). Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die stabilsten und aktivsten RNAi-Moleküle alternierende 2'-O-Alkyl-modifizierte

und unmodifizierte Nukleotidreste aufweisen. Es sollte festgehalten werden, dass diese Moleküle eine sehr ähnliche mRNA-Verringerung aufweisen, wenn sie mit unmodifizierten siRNA-Molekülen verglichen werden, was, da sie in Serum stabil sind, eine erhöhte oder leichtere Handhabung erlaubt.

Beispiel 10: Durch intern modifizierte RNAi-Moleküle vermittelter funktioneller Protein-Knock-Down

Der experimentelle Ansatz war ähnlich dem im Zusammenhang mit Beispiel 1 beschriebenen.

Western Blots wurden an HeLa-Zellen durchgeführt, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion (48, 72, 96 und 120 Stunden) mit alternierend modifizierten RNAi-Molekülen, wie in Fig. 12B dargestellt, durchgeführt wurden. Aus experimentellen Gründen ist es beachtlich, dass die Zellen des 96 Stunden-Zeitpunktes aufgeteilt worden sind und die Hälfte der Population erneut ausplattiert wurde. Insgesamt 40 nM der verschiedenen RNAi-Moleküle wurden an diese Zellen verabreicht. Die Zellen wurden kontinuierlich für 72 Stunden mit kationischen Lipiden wie in Beispiel 1 beschrieben transfiziert; dann in Abwesenheit von Transfektionsreagenzien erneut ausplattiert.

Die Transfektionen wurden in Platten mit 96 Näpfen oder in 10 cm Platten (bei Konfluenz von 30 % bis 50 %) unter Verwendung verschiedener kationischer Lipide wie beispielsweise Oligofectamin, Lipofectamin (Life Technologies), NC388, L8 (Atugen, Berlin) durchgeführt. RNAi wurde transfiziert durch Hinzugeben von zuvor ausgebildetem, fünffach konzentriertem Komplex aus siRNAs und Lipid in serumfreiem Medium zu Zellen in vollständigem Medium. Das Gesamttransfektionsvolumen betrug 100 µl für Zellen, die in Platten mit 96 Näpfen ausplattiert waren, und 10 ml für Zellen, die in 10 cm Platten ausplattiert waren. Die Lipidendkonzentration betrug 0,8 bis 1,2 µg/ml, abhängig von der Zelldichte; die siRNA-Konzentration ist in einem jeden Experiment angegeben.

Das Ergebnis der Western Blot-Analyse ist in Fig. 13 dargestellt. Wie aus dieser Figur ersichtlich, ergeben RNAi-Moleküle der Version 94A2B1 und 94A2B2 einen länger

andauernden PTEN-Protein-Knock-Down als unmodifizierte Moleküle. Das Fehlen von Protein-Knock-Down, der auch in Fig. 12 mit den Molekülen der Version 94A1B1 und 94A1B2 beobachtet wird, wird in diesem Experiment bestätigt. Unmodifizierte Moleküle (80AB) sind nicht so potent beim Unterstützen eines lang anhaltenden Protein-Knock-Downs, wenn die Zellen nicht kontinuierlich transfiziert werden.

Beispiel 11: Persistenter PTEN-Protein-Knock-Down mit RNAi-Molekülen mit alternierenden 2'-O-Methylmodifikationen

Der experimentelle Ansatz war ähnlich dem, wie er im Zusammenhang mit Beispiel 10 dargestellt ist, mit der Ausnahme, dass die Transfektion nach 5 Stunden beendet wurde durch Ersetzen des Transfektionsmediums durch neues Medium. Das Protokoll war geringfügig modifiziert derart, dass für ein jedes der RNAi-Moleküle eine 40 nM-Konzentration realisiert wurde unter Verwendung einer Stammlösung aus 1 µg RNAi/ml kationischem Lipid, wie im Zusammenhang mit Beispiel 1 beschrieben. 5 Stunden nach Transfektion wurde das Medium abgezogen und frisches EMEM hinzugegeben. Die Zellen wurden nach 72 Stunden aufgeteilt, wobei die Hälfte der Zellen lysiert wurde und die andere Hälfte erneut ausplattiert und 24 Stunden nach Transfektion später lysiert wurde (96 Stunden nach Transfektion). Das Ergebnis einer Western Blot-Analyse unter Verwendung dreier verschiedener RNAi-Moleküle (80AB, 94A1/B2, 94A2/B1) sind in Fig. 14 dargestellt. Als Positivkontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet. Fig. 14 zeigt die Expression von PTEN nach 72 Stunden bzw. 96 Stunden. Mit Blick auf die strukturellen Besonderheiten der verschiedenen RNAi-Moleküle kann man aus Fig. 14 entnehmen, dass der Protein-Knock-Down mit alternierenden Molekülen von der Art des 94A2B1 persistent ist, selbst nach 96 Stunden nach Aufteilen und erneutem Ausplattieren von Zellen verglichen mit unmodifizierten RNAi-Molekülen (wie beispielsweise 80AB) und RNAi-Molekül 94A1B2.

Ein weiteres Experiment wurde durchgeführt unter Verwendung der siRNA-Konstrukte, wie in Fig. 15A (linke Tafel) dargestellt. Aus den Ergebnissen, dargestellt als Verhältnis von PTEN/p110α-mRNA-Abbau bei verschiedenen Konzentrationen an siRNA-Konstrukten, die dem Testsystem verabreicht wurden, kann entnommen werden, dass siRNA-Moleküle, wo entweder einer oder beide Stränge aus 2'-O-Methyl-Resten

bestehen, nicht in der Lage waren, RNAi-Interferenz in dem Säugetiersystem zu induzieren (Fig. 15A, Moleküle V2, V5, V6). Die Abnahme an Aktivität war jedoch weniger ausgeprägt, wenn nur Teile der Stränge modifiziert waren. Interessanterweise war ein Molekül mit einem unmodifizierten Antisense-Strang (das ist der obere Strang in der Darstellung im Rahmen dieser Beschreibung, sofern nicht anders angegeben), und ein vollständig modifizierter Sense-Strang signifikant aktiver verglichen mit der umgekehrten Version (Fig. 5A, Moleküle V5 und V6). Dieses Ergebnis schlägt vor, dass der Antisense-Strang von siRNA kritischer und hinsichtlich Modifikation empfindlicher zu sein scheint. Die wirksamsten Moleküle, die PTEN-mRNA induzierten, wiesen nur Bereiche von Modifikationen auf, wobei das 5'-Ende unmodifiziert war, oder waren an alternierenden Positionen an beiden Strängen modifiziert (Fig. 15A, Moleküle V10, V12).

Um die Nukleaseresistenz zu testen, wurden die verschiedenen siRNA-Versionen in Serum inkubiert, gefolgt von PAA-Gelelektrophorese. Das Ergebnis ist in Fig. 15B gezeigt (rechte Tafel mit den verschiedenen Sequenzen, die auf der linken Tafel von Fig. 15B angegeben sind). Wie früher gezeigt wurden glattendige siRNA-Moleküle mit unmodifizierten Ribonukleotiden sehr schnell abgebaut, wohingegen eine vollständige Substitution mit 2'-O-Methylnukleotiden Resistenz gegen aus Serum stammenden Nukleasen vermittelte (Fig. 15B, vergleiche Molekül AB mit V1). siRNA-Moleküle mit teilweiser 2'-O-Methylmodifikation zeigten ebenso eine erhöhte Stabilität verglichen mit unmodifizierten siRNAs. Insbesondere Moleküle mit alternierenden Modifikationen auf beiden Strängen zeigten eine signifikante Verbesserung der Stabilität (Fig. 15B, Moleküle V13, V14, V15 und V12). Wichtiger ist, dass die Transfektion von 3 dieser Moleküle in HeLa-Zellen zu einer signifikanten Herunterregulierung der PTEN-Proteinexpression führte, wie in Fig. 15C, Spuren 6, 9 und 10 dargestellt. In diesem RNA-Interferenz-Aktivitätstest wurde eine unerwartete Präferenz für Moleküle beobachtet, die an einem jeden zweiten Nukleotid beginnend mit dem am meisten 5'-terminal gelegenen Nukleotid des Antisense-Stranges modifiziert waren (Moleküle V15 und V12). Moleküle, die Modifikationen enthielten beginnend mit dem zweiten Nukleotid am 5'-Ende des Antisense-Stranges waren stabiler, hatten aber eine stark verringerte Aktivität hinsichtlich des Abschaltens von Genen (Moleküle V13, V14). Dieses Ergebnis weist auf hochspezifische Wechselwirkungen zwischen den beteiligten Enzymen und präzisen Nukleotiden in dem siRNA-Duplex hin. Zusammengefasst belegen die hierin

gezeigten Daten, dass 2'-O-Methylmodifikationen an besonders ausgewählten Positionen in dem siRNA-Duplex die Nukleaseresistenz erhöhen können und RNAi nicht notwendigerweise vollständig beseitigen.

Obwohl eine erhöhte Stabilität von synthetischer siRNA primär für *in vivo* Anwendungen Implikationen aufweist, wurde auch analysiert, ob die spezielle Modifikation auch zu einem verlängerten Protein-Knock-Down in Zellkultursystemen führen kann. In Übereinstimmung damit wurden HeLa-Zellen transient für sechs Stunden transfiziert unter Verwendung verschiedener Versionen von PTEN-spezifischen siRNAs. Der Lipid-siRNA-Komplex wurde dann gewaschen und der PTEN-Protein-Knock-Down 48 Stunden und 120 Stunden später analysiert. Obwohl Knock-Down-Experimente ohne fortgesetzte Transfektion von siRNAs infolge des schnellen Wachstums von nicht-transfizierten Zellen in dieser Zeitspanne kompliziert sind, was zu einem sehr transienten Knock-Down führt, waren die vorliegenden Erfinder in der Lage, einen verlängerten PTEN-Protein-Knock-Down mit siRNA-Molekülen zu zeigen, die durch die beschriebene 2'-O-Methyl-Modifikation stabilisiert sind. 48 Stunden nach Transfektion zeigte die unmodifizierte siRNA (AB) die stärkste Verringerung hinsichtlich des PTEN-Proteinniveaus, 120 Stunden nach Transfektion ist jedoch die Verringerung der PTEN-Proteinexpression mit der siRNA überlegen, die durch alternierende 2'-O-Methylmodifikationen stabilisiert ist (Fig. 15D, vergleiche Spur 2 mit Spuren 4, 6 und 7).

Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass bevorzugterweise die Startnukleotidposition der alternierenden Modifikation wichtig zu sein scheint. Um diese Bevorzugung detaillierter zu testen, wurden zwei zusätzliche Serien von siRNAs synthetisiert, eine spezifisch für die Kinase Akt1 und die andere für p110 β , was eine der zwei katalytischen Untereinheiten von PI(3-)-Kinase ist. Die speziellen Konstrukte sind in Fig. 16A gezeigt. Wie daraus entnommen werden kann, wurden nur 19 nt lange siRNA-Duplexe entweder ohne oder mit 2'-O-Methylmodifikation an einem jeden zweiten Nukleotid verwendet. Unter Verwendung von Akt1 als ein Zielmolekül wurde ein wirksamer Protein-Knock-Down ebenso wie eine dramatische Verringerung der Niveaus von Phospho-Akt mit glattendigen, unmodifizierten siRNAs beobachtet (Fig. 16A, rechte Tafel). Aus diesen verschiedenen Versionen von Molekülen mit Modifikationen an nur einem jeden zweiten Nukleotid war lediglich eine wirksam beim Vermitteln von RNAi

(Fig. 16A, Molekül V5). Dieses siRNA-Molekül enthielt einen Antisense-Strang, der an dem am meisten 5'-terminal und 3'-terminal gelegenen Nukleotid modifiziert war. Der Sense-Strang begann mit den unmodifizierten Nukleotiden an der endständigen Position, was zu einer Struktur führt, bei der die modifizierten und unmodifizierten Ribonukleotide beider Stränge einander gegenüberliegen. Wie erwartet war auch dieses Molekül gegen aus dem Serum stammende Nukleasen geschützt, wie in Fig. 16B gezeigt (Molekül V5).

Interessanterweise zeigt ein sehr ähnliches 19 nt langes siRNA-Molekül (V4) mit Modifikationen beginnend an dem zweiten Nukleotid des Antisense-Stranges, in dem speziell verwendeten Test keine RNA-Interferenz-Aktivierung. Die Version V6, bei der die modifizierten Nukleotide des Antisense-Stranges modifizierten Nukleotiden auf dem Sense-Strang gegenüberliegen, war bei diesem Experiment ebenfalls inaktiv. Eine identische Serie aus 19 nt langen siRNA-Molekülen, die für p110 β spezifisch waren, bestätigte diese Beobachtung, wie in Fig. 16C dargestellt. Wiederum war das ähnlich modifizierte siRNA-Moleküle (V5) das aktivste, wie angegeben durch Verringerung der Akt-Phosphorylierung, was ein Zeichen für eine verringerte P (I)-3-Kinaseaktivität infolge verringerter p110 β -Niveaus ist. Die verringerte Aktivität der Moleküle V6 könnte durch verringerte Duplexstabilität erklärt werden, da die gleiche Struktur aktiv war in dem PTEN-Knock-Down-Experiment mit 21mer siRNAs. Obwohl bekannt ist, dass 2'-O-Methylmodifikationen auf beiden Strängen, die einander gegenüberliegen, die Stabilität von Nukleinsäure-Duplexen verringern wird, rührt der Unterschied zwischen der Aktivität von siRNA-Molekülen V4 und V5 (Figs. 16B und C) wahrscheinlich nicht von den Unterschieden der Duplexstabilität her, da die Anzahl von Basenpaarungen von modifizierten und unmodifizierten Nukleotiden identisch ist. Der Unterschied in der Aktivität könnte auf spezifischen Erfordernissen der interagierenden Proteine beruhen, die beim Abbau der Ziel-mRNA beteiligt sind. Weiterhin kann diesen Experimenten entnommen werden, dass die am meisten terminal gelegenen Nukleotide des Antisense-Stranges an der 2'-OH-Gruppe ohne einen erheblichen Verlust an Abschaltaktivität modifiziert sein können.

Beispiel 12: Unterschiedliche Schleifen-Strukturen sind funktionell bei der Vermittlung von RNA-Interferenz

Um zu testen, ob RNAi-Moleküle, vorzugsweise synthetische RNAi-Moleküle mit selbstkomplementären Strukturen, die Genexpression so wirksam inhibieren können, wie standardmäßige doppelsträngige siRNA-Moleküle, wurden HeLa-Zellen mit p110 β -spezifischen siRNAs transfiziert. Die Transfektionen wurden in Platten mit 96 Näpfen oder 10 cm großen Platten (bei einer Konfluenz von 30 bis 50%) unter Verwendung verschiedener kationischer Lipide wie beispielsweise Oligofectamin, Lipofectamin (Life Technologies) durchgeführt. GeneBlocs wurden transfiziert durch Hinzugeben von vorab ausgebildeten 5x konzentrierten Komplexen aus GB und Lipid in Serum-freiem Medium zu Zellen in vollständigem Medium. Das Gesamttransfektionsvolumen betrug 100 μ l für Zellen, die in Platten mit 96 Näpfen ausplattiert waren, und 10 ml für Zellen in 10 cm Platten. Die letztendliche Lipidkonzentration betrug 0,8 bis 1,2 μ g/ml, abhängig von der Zelldichte; die RNAi-Molekülkonzentration ist in einem jeden Experiment angegeben.

Eine Dosis-abhängige Titration zeigte keinen signifikanten Unterschied der Wirksamkeit von mRNA-Knock-Down, der durch das standardmäßige bimolekulare doppelsträngige 21-Mer und die entsprechenden monomolekularen Moleküle erreicht wurden, wie analysiert durch Echtzeit-PCR (Taqman) (Fig. 17A). Zwei unterschiedliche Schleifenstrukturen, eine (A)₁₂-Schleife und eine von HIV abgeleitete pA-Schleife, wurden parallel mit ähnlichen Ergebnissen getestet. Ein Vergleich der Relativposition der Antisense-Sequenz und der Schleifenstruktur ergab eine verbesserte Knock-Down-Wirksamkeit, wenn die Antisense-Sequenz 3' zur Schleife angeordnet ist (Fig. 17B; vergleiche Konstrukt 3A, 3B und 4A, 4B).

Beispiel 13: Studien zur Wirksamkeit von unterschiedlichen intramolekularen Hairpin-Schleifen und intermolekularen „Blasen“

Der Einfluss verschiedener Schleifenstrukturen auf die Inhibierung von mRNA und Proteinexpression wurde getestet. Für diese Experimente wurden Akt1 und Akt2 als Ziele ausgewählt. Der experimentelle Ansatz war ähnlich dem in Beispiel 12 beschrieben.

Die Verringerung von Akt1 mRNA, wie in Fig. 18A und Fig. 18B dargestellt, ebenso wie die der Akt1-Protein-Niveaus, wie in Fig. 18C dargestellt, vollkommen unabhängig von der getesteten Schleifenstruktur (vergleiche Moleküle 5A, 6A, 7A, 8A) (die Struktur des getesteten RNAi-Moleküls ist jeweils unter dem Balkendiagramm angegeben). Selbst ein Molekül, das eine vergleichsweise unphysiologische Struktur wie beispielsweise einen Polyethylenglycol-Linker (PEG) als eine Schleife enthielt, verringerte die Expression von Akt1 wirksam, was anzeigt, dass die Größe und die Nukleotidsequenz der Schleife nicht kritisch sind (Fig. 18A; Molekül 8A). Das synthetische siRNA-Molekül, das für Akt2 (9A) spezifisch ist, wurde verwendet, um auf Spezifität hin zu kontrollieren und hatte keine Wirkung auf Akt1-Niveaus, wie in Fig. 15A gezeigt. Dieses Molekül schaltete jedoch in wirksamer Weise die Expression von Akt2 aus (Fig. 18B; Fig. 18C). Selbst-komplementäre RNA-Moleküle mit Schleifenstrukturen haben die Möglichkeit, als Doppelstränge in molekularen oder biomolekularen Strukturen unter physiologischen Hybridisierungsbedingungen zu glühen (Fig. 18B, Schleifen- oder Blasenstruktur). Um die Frage zu adressieren, ob die siRNA-Moleküle ihre Funktion durch Einnehmen einer intramolekularen Schleife oder einer intermolekularen „Blase“ (schematisch in Fig. 18B gezeigt) ausüben, wurden zwei Moleküle, die nicht in der Lage sind, auf sich selbst zurückzufalten, transfiziert. Diese Strukturen enthielten Akt1- und Akt2-spezifische Sequenzen innerhalb des gleichen Moleküls (Fig. 18B, Konstrukte 10A, 10B) und wurden so konstruiert, dass sie dahingehend beschränkt waren, dass sie einen bimolekularen Komplex ausbilden („Blase“). Überraschenderweise vermittelte dieses Molekül sowohl den Akt1- als auch Akt2-mRNA-Knock-Down, ebenso wie Protein-Knock-Down, wenn nach dem Glühen beider Stränge transfiziert wurde.

Ob Schleifen- und Blasenstrukturen tatsächlich Substrate für RNA-prozessierende Enzyme, z. B. *Dicer*, sind, ist zu diesem Zeitpunkt nicht klar. Eine kürzlich durchgeführte Studie von Paddison und Mitarbeitern schlägt vor, dass Hairpin-enthaltene siRNAs stärker von der *Dicer*-Aktivität abhängen als doppelsträngige siRNAs. Diese Daten, die eine RNA-Interferenz-Aktivität bei Verwendung eines PEG-Linkermoleküls zeigen, belegen, dass die Linkersequenz wahrscheinlich irrelevant ist.

SEQUENZLISTE

[0159]

<110> atugen AG

< 120> WEITERE NEUE FORMEN VON INTERFERIERENDE RNS MOLEKÜLE

< 130> A 19014 PCT

< 160> 174

< 170> PatentIn Version 3.1

<210> 1

< 211> 23

< 212> DNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 1A (Fig 3B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(21)

< 223> RNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (22) (23)

< 223> DNA

<400> 1

cuccuuuugu uucugcuaac gtt 23

<210> 2

< 211> 23

< 212> DNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 1B (Fig. 3B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(21)
 < 223> RNA

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (22)..(23)
 < 223> DNA

<400> 2
 cguuagcaga aacaaaagga gtt 23

<210> 3
 < 211> 23
 < 212> DNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 3A (Fig. 3B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(21)
 < 223> RNA

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (22)..(23)
 < 223> DNA

<220>
 < 221> versch_Merkmal

< 222> (23)..(23)

< 223> NH2-modifiziert

<400> 3

cuccuuuuugu uucugcuaac gtt 23

<210> 4

< 211> 23

< 212> DNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 38 (Fig. 3B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(21)

< 223> RNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (22)..(23)

< 223> DNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (23)..(23)

< 223> NH2-modifiziert

<400> 4

cguuagcaga aacaaaagga gtt 23

<210> 5

< 211> 23

< 212> DNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 4A (Fig. 3B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(21)

< 223> RNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (22)..(23)

< 223> DNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (23)..(23)

< 223> angehängt an invertierter abasic

<400> 5

cuccuuuuugu uucugcuaac gtt 23

<210> 6

< 211> 23

< 212> DNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 4B (Fig. 3B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(21)

< 223> RNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (22)..(23)

< 223> DNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (23)..(23)

< 223>angehängt an invertierter abasic

<400> 6

cguuagcaga aacaaaagga gtt 23

<210> 7

< 211> 23

< 212> DNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> SAMM (Fig. 3B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(21)

< 223> RNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (22) (23)

< 223> DNA

<400> 7

cucauuuucu uugugcucac gtt 23

<210> 8

< 211> 23

< 212> DNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 5BMM (Fig. 3B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1) .. (21)
 < 223> RNA

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (22)..(23)
 < 223> DNA

<400> 8
 cgugagcaca aagaaaauga gtt 23

<210> 9
 < 211> 23
 < 212> DNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 18A (Fig. 4B, 8B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(21)
 < 223> RNA

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (22)..(23)
 < 223> DNA

<400> 9
 cuccuuuugu uucugcuaac gtt 23

<210> 10
 < 211> 23

< 212> DNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 18B (Fig. 4B, 8B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(21)
 < 223> RNA

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (22)..(23)
 < 223> DNA

<400> 10
 cguuagcaga aacaaaagga gtt 23

<210> 11
 < 211> 23
 < 212> DNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 19A(MM) (Fig. 4B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(21)
 < 223> RNA

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (22)..(23)
 < 223> DNA

<400> 11
cucauuuucu uugugcucac gtt 23

<210> 12
< 211> 23
< 212> DNA
< 213> Künstliche Sequenz

<220>
< 223> RNAi

<220>
< 221> versch_Merkmal
< 223> 19B(MM) (Fig. 4B)

<220>
< 221> versch_Merkmal
< 222> (1)..(21)
< 223> RNA

<220>
< 221> versch_Merkmal
< 222> (22)..(23)
< 223> DNA

<400> 12
cgugagcaca aagaaaauga gtt 23

<210> 13
< 211> 21
< 212> DNA.
< 213> Künstliche Sequenz

<220>
< 223> RNAi

<220>
< 221> versch_Merkmal
< 223> 28A Fig. 4B, 8B, 9C, 10C)

<400> 13
cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 14
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 28B (Fig. 4B, 8B, 9C, 10C)

<400> 14
 cguuagcaga acaaaaagga g 21

<210> 15
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 29A(MM) (Fig. 4B)

<400> 15
 cucauuuuucu uugugcucac g 21

<210> 16
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 29B(MM) (Fig. 4B)

<400> 16
 cgugagcaca aagaaaauga g 21

<210> 17
 < 211> 23
 < 212> DNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 30A (Fig. 4B, 8B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(2)
 < 223> DNA

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (3)..(23)
 < 223> RNA

<400> 17
 ttcuccuuuu guuucugcua acg 23

<210> 18
 < 211> 23
 < 212> DNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 30B (Fig. 4B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(2)
 < 223> DNA

<220>
 < 221> versch_Merkmal

< 222> (3)..(23)

< 223> RNA

<400> 18

ttcguuagca gaaacaaaag gag 23

<210> 19

< 211> 23

< 212> DNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAI

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 31 A(MM) (Fig. 4B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(2)

< 223> DNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (3)..(23)

< 223> RNA

<400> 19

ttcucauuuu cuuugugcuc acg 23

<210> 20

< 211> 23

< 212> DNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 31 B(MM) (Fig. 4B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1) .. (2)

< 223> DNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (3)..(23)

< 223> RNA

<400> 20

ttcgugagca caaagaaaau gag 23

<210> 21

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 51A (Fig. 5B)

<400> 21

ucuugaugua cucccccucgu u 21

<210> 22

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 51B (Fig. 5B)

<400> 22

cgaggggagu acaucaagau u 21

<210> 23
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 53A (Fig. 5B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(19)
 < 223> RNA

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (20)..(21)
 < 223> DNA

<400> 23
 ucuugaugua cucccccugu u 21

<210> 24
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 53B (Fig. 5B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(19)
 < 223> RNA

<220>
 < 221> versch_Merkmal

< 222> (20)..(21)

< 223> DNA

<400> 24

cgaggggagu acaucaagac c 21

<210> 25

< 211> 19

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 55A (Fig. 5A)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(17)

< 223> RNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (18)..(19)

< 223> DNA

<400> 25

cuugauguac uccccugc 19

<210> 26

< 211> 19

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 55B (Fig. 5B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(17)

< 223> RNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (18)..(19)

< 223> DNA

<400> 26

gaggggagua caucaagac 19

<210> 27

< 211> 21

< 212> DNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 57A (Fig. 5B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(19)

< 223> RNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (20).. (21)

< 223> DNA

<400> 27

ucuugaugua cucccccuct t 21

<210> 28

< 211> 21

< 212> DNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 57B (Fig. 5B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(19)

< 223> RNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (20)..(21)

< 223> DNA

<400> 28 21

cgaggggagu acaucaagac c 21

<210> 29

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 51A (Fig. 6B)

<400> 29 21

ucuugaugua cuccccucgu u 21

<210> 30

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 51B (Fig. 6B)

<400> 30

cgaggggagu acaucaagau u 21

<210> 31

< 211> 21

< 212> DNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 70A (Fig. 6B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(19)

< 223> RNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (20)..(21)

< 223> DNA

<400> 31

ucuugaugua cucccccuct t 21

<210> 32

< 211> 21

< 212> DNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 70B (Fig. 6B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(19)

< 223> RNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (20)..(21)

< 223> DNA

<400> 32

cgaggggagu acaucaagatt t 21

<210> 33

< 211> 21

< 212> DNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 71A (Fig. 6B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(19)

< 223> RNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (20)..(21)

< 223> DNA

<400> 33

acuugaugua cucccccuct t 21

<210> 34

< 211> 21

< 212> DNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 71B (Fig. 6B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(19)

< 223> RNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (20).. (21)

< 223> DNA

<400> 34

ggaggggagu acaucaagut t 21

<210> 35

< 211> 21

< 212> DNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 72A (Fig. 6B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(19)

< 223> RNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (20)..(21)

< 223> DNA

<400> 35

aguugaugua cucccccugct t 21

<210> 36
 < 211> 21
 < 212> DNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 72B (Fig. 6B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(19)
 < 223> RNA

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (20)..(21)
 < 223> DNA

<400> 36
 gcaggggagu acaucaacut t 21

<210> 37
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> Akt1 1A (Fig. 7A)

<400> 37
 ucuugaugua cucccccug u 21

<210> 38
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Akt1 1B (Fig. 7A)

<400> 38

cgaggggagu acaucaagau u 21

<210> 39

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220> .

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Akt1 2A (Fig. 7A)

<400> 39

ucuugaugua cuccccucgu u 21

<210> 40

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Akt1 2B (Fig. 7A)

<400> 40

cgaggggagu acaucaagac c 21

<210> 41

< 211> 21

< 212> DNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Akt1 3A (Fig. 7A)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(19)

< 223> RNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (20)..(21)

< 223> DNA

<400> 41

ucuugaugua cucccccucgt t 21

<210> 42

< 211> 21

< 212> DNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Akt1 3B (Fig. 7A)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1) .. (19)

< 223> RNA

<220>

< 221> misc_featuxe

< 222> (20).. (21)

< 223> DNA

<400> 42

cgaggggagu acaucaagac c 21

<210> 43
 < 211> 21
 < 212> DNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> Akt1 4A (Fig. 7A)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1) .. (19)
 < 223> RNA

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (20).. (21)
 < 223> DNA

<400> 43
 ucuugaugua cucccccucgt t 21

<210> 44
 < 211> 21
 < 212> DNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> Akt1 4B (Fig. 7A)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(19)
 < 223> RNA

<220>
 < 221> versch_Merkmal

< 222> (20)..(21)

< 223> DNA

<400> 44

cgagggggagu acaucaagat t 21

<210> 45

< 211> 19

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Akt1 5A (Fig. 7A)

<400> 45

cuugauguac uccccucgu 19

<210> 46

< 211> 19

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Akt1 5B (Fig. 7A)

<400> 46

gaggggagua caucaagac 19

<210> 47

< 211> 21

< 212> DNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> Akt1 6A (Fig. 7A)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(19)
 < 223> RNA

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (20).. (21)
 < 223> DNA

<400> 47
 acuugaugua cucccccuct t 21

<210> 48
 < 211> 21
 < 212> DNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> Akt 1 6B (Fig. 7A)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(19)
 < 223> RNA

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (20)..(21)
 < 223> DNA

<400> 48
 ggaggggagu acaucaagut t 21

<210> 49
 < 211> 21

< 212> DNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> Akt1 7A (Fig. 7A)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(19)
 < 223> RNA

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (20)..(21)
 < 223> DNA

<400> 49
 aguugaugua cuccccugct t 21

<210> 50
 < 211> 21
 < 212> DNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> Akt1 7B (Fig. 7A)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(19)
 < 223> RNA

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (20)..(21)
 < 223> DNA

<400> 50
gcaggggagu acaucaacut t 21

<210> 51
< 211> 23
< 212> DNA
< 213> Künstliche Sequenz

<220>
< 223> RNAi

<220>
< 221> versch_Merkmal
< 223> PTEN 1A (Fig. 7A)

<220>
< 221> versch_Merkmal
< 222> (1)..(21)
< 223> RNA

<220>
< 221> versch_Merkmal
< 222> (22)..(23)
< 223> DNA

<400> 51
cuccuuuugu uucugcuaac gtt 23

<210> 52
< 211> 23
< 212> DNA
< 213> Künstliche Sequenz

<220>
< 223> RNAi

<220>
< 221> versch_Merkmal
< 223> PTEN 1 B (Fig. 7A)

<220>
< 221> versch_Merkmal
< 222> (1)..(21)
< 223> RNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (22)..(23)

< 223> DNA

<400> 52

cguuagcaga aacaaaagga gtt 23

<210> 53

< 211> 19

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> PTENA (Fig. 7B)

<400> 53

uccuuuuguu ucugcuaac 19

<210> 54

< 211> 19

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> PTENB (Fig. 7B)

<400> 54

guuagcagaa acaaaagga 19

<210> 55

< 211> 19

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> PTENMM1 (Fig. 7B)

<400> 55

uccuuuucuu ucugcuaac 19

<210> 56

< 211> 19

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> PTENMM1 (Komplementäre Sequenz, Fig. 7B)

<400> 56

guuagcagaa agaaaagga 19

<210> 57

< 211> 19

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> PTENMM2 (Fig. 7B)

<400> 57

uccuuuucuu ugugcuaac 19

<210> 58

< 211> 19

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> PTENMM2 (Komplementäre SequenzKomplementäre Sequenz Fig. 7B)

<400> 58

guuagcacia agaaaagga 19

<210> 59

< 211> 19

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> PTENMM3 (Fig. 7B)

<400> 59

uccuuuucuu ugugguaac 19

<210> 60

< 211> 19

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> PTENMM3 (Komplementäre Sequenz, Fig. 7B)

<400> 60

guuaccacia agaaaagga 19

<210> 61

< 211> 19

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> PTENMM4 (Fig. 7B)

<400> 61

uccuauucuu ugugguaac 19

<210> 62

< 211> 19

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> PTENMM4 (Komplementäre Sequenz; Fig. 7B)

<400> 62

guuaccacaa agaauagga 19

<210> 63

< 211> 23

< 212> DNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 24A (Fig. 8B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(21)

< 223> RNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (22)..(23)

< 223> DNA

<400> 63

cuccuuuuugu uucugcuaac gtt 23

<210> 64

< 211> 23

< 212> DNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 24B (Fig. 8B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(1)

< 223>angehängt an invertierter abasic

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1) .. (21)

< 223> RNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (22)..(23)

< 223> DNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (23).. (23)

< 223>angehängt an invertierter abasic

<400> 64 23

cguuagcaga aacaaaagga gtt 23

<210> 65

< 211> 23

< 212> DNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 26A (Fig. 8B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1) .. (1)
 < 223> NH2-modifiziert

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(21)
 < 223> RNA

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (22)..(23)
 < 223> DNA

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (23)..(23)
 < 223> NH2-modifiziert

<400> 65
 cuccuuuugu uucugcuaac gtt 23

<210> 66
 < 211> 23
 < 212> DNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 26B (Fig. 8B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(1)
 < 223> NH2-modifiziert

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(21)
 < 223> RNA

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (22)..(23)
 < 223> DNA

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (23)..(23)
 < 223> NH2-modifiziert

<400> 66
 cguuagcaga aacaaaagga gtt 23

<210> 67
 < 211> 23
 < 212> DNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 79A (Fig. 8B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(21)
 < 223> 2'-O-methyl modifiziert RNA

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (22)..(23)
 < 223> DNA

<400> 67
 cuccuuuugu uucugcuaac gtt 3

<210> 68
 < 211> 23
 < 212> DNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAI

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 79B (Fig. 8B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(21)
 < 223> 2'-O-methyl modifiziert RNA

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (22)..(23)
 < 223> DNA

<400> 68
 cguuagcaga aacaaaagga gtt 23

<210> 69
 < 211> 23
 < 212> DNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 30B (Fig. 8B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(2)
 < 223> DNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (3)..(23)

< 223> RNA

<400> 69

ttcguuagca gaaacaaaag gag 23

<210> 70

< 211> 23

< 212> DNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 3A (Fig. 8B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(21)

< 223> RNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (22)..(23)

< 223> DNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (23)..(23)

< 223> NH2-modifiziert

<400> 70

cuccuuuugu uucugcuaac gtt 23

<210> 71

< 211> 23

< 212> DNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 3B (Fig. 8B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(21)

< 223> RNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (22)..(23)

< 223> DNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (23).. (23)

< 223> NH2-modifiziert

<400> 71

cguuagcaga aacaaaagga gtt 23

<210> 72

< 211> 23

< 212> DNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 26A (Fig. 9B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(1)

< 223> NH2-modifiziert

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(21)

< 223> RNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (22)..(23)

< 223> DNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (23)..(23)

< 223> NH2-modifiziert

<400> 72

cuccuuuugu uucugcuaac gtt 23

<210> 73

< 211> 23

< 212> DNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 24A (Fig. 9B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(1)

< 223>angehängt an invertierter abasic

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(21)

< 223> RNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (22)..(23)

< 223> DNA

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (23)..(23)
 < 223>angehängt an invertierter abasic

<400> 73
 cuccuuuugu uucugcuaac gtt 23

<210> 74
 < 211> 23
 < 212> DNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 22A (Fig. 9B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(21)
 < 223> RNA

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (22)..(23)
 < 223> DNA

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (23)..(23)
 < 223>angehängt an invertierter abasic

<400> 74
 cuccuuuugu uucugcuaac gtt 23

<210> 75
 < 211> 23
 < 212> DNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 20A (Fig. 9B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(21)

< 223> RNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (22)..(23)

< 223> DNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (23)..(23)

< 223> NH2-modifiziert

<400> 75

cuccuuuuugu uucugcuaac gtt

23

<210> 76

< 211> 23

< 212> DNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 30A (Fig. 9B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(2)

< 223> DNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (3)..(23)

< 223> RNA

<400> 76

ttcuccuuuu guuucugcua acg 23

<210> 77

< 211> 23

< 212> DNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 26B (Fig. 9B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(1)

< 223> NH2-modifiziert

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(21)

< 223> RNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (22)..(23)

< 223> DNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (23)..(23)

< 223> NH2-modifiziert

<400> 77

cguuagcaga aacaaaagga gtt 23

<210> 78

< 211> 23

< 212> DNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 18A (Fig. 9B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(21)
 < 223> RNA

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (22)..(23)
 < 223> DNA

<400> 78
 cuccuuuugu uucugcuaac gtt 23

<210> 79
 < 211> 23
 < 212> DNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 18B (Fig. 9B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(21)
 < 223> RNA

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (22)..(23)
 < 223> DNA

<400> 79
cguuagcaga aacaaaagga gtt 23

<210> 80
< 211> 21
< 212> RNA
< 213> Künstliche Sequenz

<220>
< 223> RNAi

<220>
< 221> versch_Merkmal
< 223> 28A (Fig. 9B)

<400> 80
cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 81
< 211> 21
< 212> RNA
< 213> Künstliche Sequenz

<220>
< 223> RNAi

<220>
< 221> versch_Merkmal
< 223> 29A (Fig. 10C)

<400> 81
cuccuuuucu uugugcuaac g 21

<210> 82
< 211> 21
< 212> RNA
< 213> Künstliche Sequenz

<220>
< 223> RNAi

<220>
< 221> versch_Merkmal
< 223> 29B (Fig. 10C)

<400> 82
cguuagcaca aacaaaagga g 21

<210> 83
< 211> 21
< 212> RNA
< 213> Künstliche Sequenz

<220>
< 223> RNAi

<220>
< 221> versch_Merkmal
< 223> 73A (Fig. 10C)

<220>
< 221> versch_Merkmal
< 222> (3)..(19)
< 223> 2'-O-methyl modifiziert

<400> 83
cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 84
< 211> 21
< 212> RNA
< 213> Künstliche Sequenz

<220>
< 223> RNAi

<220>
< 221> versch_Merkmal
< 223> 73B (Fig. 10C)

<220>
< 221> versch_Merkmal
< 222> (3)..(19)
< 223> 2'-O-methyl modifiziert

<400> 84
cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 85
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 74A (Fig. 10C)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (5)..(17)
 < 223> 2'-O-methyl modifiziert

<400> 85
 cuccuuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 86
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 74B (Fig. 10C)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (5) .. (17)
 < 223> 2'-O-methyl modifiziert

<400> 86
 cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 87
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 75A (Fig. 10C)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (7)..(15)

< 223> 2'-O-methyl modifiziert

<400> 87

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 88

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 75B (Fig. 10C)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (7)..(15)

< 223> 2'-O-methyl modifiziert

<400> 88

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 89

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 79A (Fig. 10C)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(21)

< 223> 2'-O-methyl modifiziert

<400> 89

cuccuuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 90

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 79B (Fig. 10C, 11C)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(21)

< 223> 2'-O-methyl modifiziert

<400> 90

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 91

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 80A (Fig. 11C)

<400> 91
 cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 92
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 80B (Fig. 11C)

<400> 92
 cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 93
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 81A (Fig. 11C)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(11)
 < 223> 2'-O-methyl modifiziert

<400> 93
 cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 94
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 81B (Fig. 11C)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(11)

< 223> 2'-O-methyl modifiziert

<400> 94

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 95

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 82A (Fig. 11C)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (11)..(21)

< 223> 2'-O-methyl modifiziert

<400> 95

cuccuuuugu uucugcuaac g 1

<210> 96

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 828 (Fig. 11C)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (11)..(21)

< 223> 2'-O-methyl modifiziert

<400> 96

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 97

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 83A (Fig. 11C)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (8)..(13)

< 223> 2'-O-methyl modifiziert

<400> 97

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 98

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 86A (Fig. 11C)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (6)..(10)
 < 223> 2'-O-methyl modifiziert

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (16)..(21)
 < 223> 2'-O-methyl modifiziert

<400> 98
 cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 99
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 86B (Fig. 11C)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (7)..(11)
 < 223> 2'-O-methyl modifiziert

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (17) .. (21)
 < 223> 2'-O-methyl modifiziert

<400> 99
 cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 100
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 75A (Fig. 11C)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (7) .. (15)

< 223> 2'-O-methyl modifiziert

<400> 100

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 101

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 28A (Fig. 12B)

<400> 101

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 102

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 28B (Fig. 12B)

<400> 102

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 103
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 79A (Fig. 12B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(21)
 < 223> 2'-O-methyl modifiziert

<400> 103
 cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 104
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 79B (Fig. 12B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(21)
 < 223> 2'-O-methyl modifiziert

<400> 104
 cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 105
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> misc-feature

< 223> 81A (Fig. 12B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(11)

< 223> 2'-O-methyl modifiziert

<400> 105

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 106

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 81B (Fig. 12B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1).. (11)

< 223> 2'-O-methyl modifiziert

<400> 106

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 107

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 82A (Fig. 12B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (11)..(21)

< 223> 2'-O-methyl modifiziert

<400> 107

cuccuuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 108

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 82B (Fig. 12B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (11)..(21)

< 223> 2'-O-methyl modifiziert

<400> 108

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 109

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 86A (Fig. 12B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (5).. (10)
 < 223> 2'-O-methyl modifiziert

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (16) .. (21)
 < 223> 2'-O-methyl modifiziert

<400> 109
 cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 110
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 86B (Fig. 12B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (7)..(11)
 < 223> 2'-O-methyl modifiziert

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (18)..(21)
 < 223> 2'-O-methyl modifiziert

<400> 110
 cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 111
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 94A1 (Fig. 12B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Nukleotide auf Positionen 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 und und 20 sind 2'-O methyl Ribonucleotide

<400> 111

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 112

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 94B1 (Fig. 12B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Nukleotide auf Positionen 2, 4, 6,8, 10, 12, 14, 16, 18 und und 20 sind 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 112

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 113

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 94A1 (Fig. 12B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Nukleotide auf Positionen 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 und 20 sind 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 113

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 114

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 94B2 (Fig. 12B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Nukleotide auf Positionen 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 und und 21 sind 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 114

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 115

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 94A2 (Fig. 12B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Nukleotide auf Positionen 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 und 21 sind 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 115

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 116

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 94B1 (Fig. 12B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Nukleotide auf Positionen 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 und 20 are 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 116

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 117

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> 94A2 (Fig. 12B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Nukleotide auf Positionen 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 und 21 sind 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 117

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 118
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> 94B2 (Fig. 12B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> Nukleotide auf Positionen 1, 3, 5,7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 und 21 sind 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 118
 cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 119
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> PTENA (Fig. 15A,B)

<400> 119
 cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 120
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> PTENB (Fig. 15A,B)

<400> 120
 cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 121
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> PTENAMM (Fig. 15A)

<400> 121
 cucauuuucu uugugcucac g 21

<210> 122
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> PTENBMM (Fig. 15A)

<400> 122
 cgugagcaca aagaaaauga g 21

<210> 123
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> PTENA V1 (Fig. 15A,B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(21)
 < 223> 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 123
 cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 124
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> PTENB V1 (Fig. 15A,B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(21)
 < 223> 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 124
 cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 125
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> PTENA V2 (Fig. 15A)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (3) .. (19)
 < 223> 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 125
 cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 126
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> PTENB V2 (Fig. 15A)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (3)..(19)
 < 223> 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 126
 cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 127
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> PTENA V3 (Fig. 15A)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (5)..(17)
 < 223> 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 127
 cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 128
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> PTENB V3 (Fig. 15A)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (5)..(17)
 < 223> 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 128
 cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 129
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> PTENA V4 (Fig. 15A)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (7)..(15)
 < 223> 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 129
 cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 130
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> PTENB V4 (Fig. 15A)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (7)..(15)
 < 223> 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 130
 cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 131
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> PTENA V5 (Fig. 15A)

<400> 131
 cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 132
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> PTENB V5 (Fig. 15A)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(21)
 < 223> 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 132
 cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 133
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> PTENA V6 (Fig. 15A)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(21)
 < 223> 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 133
 cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 134
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> PTENB V6 (Fig. 15A)

<400> 134
 cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 135
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> PTENA V7 (Fig. 15A,B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(11)
 < 223> 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 135
 cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 136
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> PTENB V7 (Fig. 15A,B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(11)
 < 223> 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 136
 cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 137
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> PTENA V8 (Fig. 15A,B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (11)..(21)
 < 223> 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 137
 cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 138
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> PTENB V8 (Fig. 15A,B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (11) (21)
 < 223> 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 138
 cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 139
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> PTENA V9 (Fig. 15A)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (8)..(13)

< 223> 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 139

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 140

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> PTENB V9 (Fig. 15A)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(21)

< 223> 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 140

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 141

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> PTENA V10 (Fig. 15A,B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (6)..(10)
 < 223> 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (16)..(21)
 < 223> 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 141
 cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 142
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> PTENB V10 (Fig. 15A,B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (7)..(12)
 < 223> 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (17) (21)
 < 223> 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 142
 cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 143
 < 211> 21

< 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> PTENA V11 (Fig. 15A)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (7)..(15)
 < 223> 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 143
 cuccuuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 144
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> PTENB V11 (Fig. 15A)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 222> (1)..(21)
 < 223> PTENB V11 (Fig. 15)

<400> 144
 cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 145
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> PTENA V12 (Fig. 15A,B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Nukleotide auf Positionen 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 und 21 sind 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 145

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 146

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> PTENB V12 (Fig. 15A,B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Nukleotide auf Positionen 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 und 21 sind 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 146

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 147

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> PTENA V13 (Fig. 15B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Nukleotide auf Positionen 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 und 20 sind 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 147

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 148

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> PTENB V13 (Fig. 15B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Nukleotide auf Positionen 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 und 20 sind 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 148

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 149

< 211> 21

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> PTENA V14 (Fig. 15B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Nukleotide auf Positionen 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 und 20 sind 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 149

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 150
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> PTENB V14 (Fig. 15B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> Nukleotide auf Positionen 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 und 21 sind 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 150
 cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 151
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> PTENA V15 (Fig. 15B)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> Nukleotide auf Positionen 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 und 21 sind 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 151
 cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 152
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> PTENB V15 (Fig. 15B)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Nukleotide auf Positionen 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 und 20 sind 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 152

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 153

< 211> 21

< 212> DNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Akt1A V1 (Fig. 16A)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(19)

< 223> RNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (20)..(21)

< 223> DNA

<400> 153

ucuugaugua cucccccucgt t 21

<210> 154

< 211> 21

< 212> DNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Akt1B V1 (Fig. 16A)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (1)..(19)

< 223> RNA

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 222> (20)..(21)

< 223> DNA

<400> 154

cgaggggagu acaucaagatt t 21

<210> 155

< 211> 19

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Akt1A V2 (Fig. 16A)

<400> 155

ucuugaugua cucccccug 19

<210> 156

< 211> 19

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> Akt1B V2 (Fig. 16A)

<400> 156
 cgaggggagu acaucaaga 19

<210> 157
 < 211> 19
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> Akt1A V3 (Fig. 16A)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> Nukleotide auf Positionen 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 und 20 sind 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 157
 ucuugaugua cucccccug 19

<210> 158
 < 211> 19
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> Akt1B V3 (Fig. 16A)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> Nukleotide auf Positionen 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 und 20 sind 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 158
 cgaggggagu acaucaaga 19

<210> 159
 < 211> 19
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> AKt1A V4 (Fig. 16A)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> Nukleotide auf Positionen 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 und 20 sind 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 159
 ucuugaugua cucccccug 19

<210> 160
 < 211> 19
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> Akt1B V4 (Fig. 16A)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> Nukleotide auf Positionen 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 und 21 sind 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 160
 cgaggggagu acaucaaga 19

<210> 161
 < 211> 19
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Akt1A V5 (Fig. 16A)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Nukleotide auf Positionen 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 und 21 sind 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 161

ucuugaugua cuccccucg 19

<210> 162

< 211> 19

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Akt1B V5 (Fig. 16A)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Nukleotide auf Positionen 2, 4, 6,8, 10, 12, 14, 16, 18 und 20 sind 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 162

cgaggggagu acaucaaga 19

<210> 163

< 211> 19

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Akt1A V6 (Fig. 16A)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Nukleotide auf Positionen 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 und 21 sind 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 163

ucuugaugua cuccccucg 19

<210> 164

< 211> 19

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Akt1B V6 (Fig. 16A)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Nukleotide auf Positionen 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 und 21 sind 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 164

cgaggggagu acaucaaga 19

<210> 165

< 211> 19

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> P110b V2 (Fig. 16C)

<400> 165

aaauccagug guucauucc 19

<210> 166

< 211> 19

< 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> P110b V2 (Komplementäre Sequenz, Fig. 16C)

<400> 166
 ggaaugaacc acuggaauu 19

<210> 167
 < 211> 19
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> P110b V3 (Fig. 16C)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> Nukleotide auf Positionen 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 und 18 sind 2' -O Methyl-Ribonucleotide

<400> 167
 aaauccagug guucauucc 19

<210> 168
 < 211> 19
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> P110b V3 (Komplementäre Sequenz, Fig. 16C)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Nukleotide auf Positionen 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 und 18 sind 2' -O Methyl-Ribonucleotide

<400> 168

ggaaugaacc acuggaauu 19

<210> 169

< 211> 19

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> P110b V4 (Fig. 16C)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Nukleotide auf Positionen 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 und 18 sind 2' -O Methyl-Ribonucleotide

<400> 169

aaauccagug guucauucc 19

<210> 170

< 211> 19

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> P110b V4 (Komplementäre Sequenz, Fig. 16C)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Nukleotide auf Positionen 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 18 und 21 sind 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 170

ggaaugaacc acuggaauu 19

<210> 171
 < 211> 19
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> P110b V5 (Fig. 16C)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> Nukleotide auf Positionen 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 und 19 sind 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 171
 aaauccagug guucauucc 19

<210> 172
 < 211> 19
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>
 < 223> RNAi

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> P110b V5 (Komplementäre Sequenz, Fig. 16C)

<220>
 < 221> versch_Merkmal
 < 223> Nukleotide auf Positionen 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 und 18 sind 2' -O Methyl-Ribonucleotide

<400> 172
 ggaaugaacc acuggaauu 19

<210> 173
 < 211> 19
 < 212> RNA
 < 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> P110b V6 (Fig. 16C)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Nukleotide auf Positionen 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 und 19 sind 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 173

aaauccagug guucauucc 19

<210> 174

< 211> 19

< 212> RNA

< 213> Künstliche Sequenz

<220>

< 223> RNAi

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> P110b V6 (Komplementäre Sequenz, Fig. 16C)

<220>

< 221> versch_Merkmal

< 223> Nukleotide auf Positionen 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 und 19 sind 2'-O Methyl-Ribonucleotide

<400> 174

ggaaugaacc acuggaauu 19

Patentansprüche

1. Eine Ribonukleinsäure bestehend aus einer doppelsträngigen Struktur, wobei die doppelsträngige Struktur einen ersten Strang und einen zweiten Strang aufweist, wobei der erste Strang aus einem ersten Abschnitt zusammenhängender Nukleotide besteht und wobei der erste Abschnitt vollständig komplementär zu einer Ziel-Nukleinsäure ist, und der zweite Strang aus einem zweiten Abschnitt zusammenhängender Nukleotide besteht und wobei der zweite Abschnitt vollkommen identisch mit der Ziel-Nukleinsäure ist,

dadurch gekennzeichnet, dass

der besagte erste Strang und der besagte zweite Strang aus einem Muster einer Vielzahl von flankierenden Nukleotid-Gruppen bestehen, und eine Vielzahl von modifizierten Nukleotid-Gruppen dabei eine Veränderung an der 2'-Position haben, wobei innerhalb des Strangs jede modifizierte Nukleotid-Gruppe auf einer oder beiden Seiten von einer flankierenden Nukleotid-Gruppe flankiert wird,

wobei die flankierenden Nukleotide, die die flankierende Nukleotid-Gruppe bilden, unveränderte Nukleotide sind,

wobei jede Gruppe der modifizierten Nukleotide aus einem Nukleotid besteht und wobei jede flankierende Nukleotid-Gruppe aus einem Nukleotid besteht,

jede Gruppe der modifizierten Nukleotide des ersten Strangs ist dabei an einer flankierenden Nukleotid-Gruppe am zweiten Strang ausgerichtet, wobei das endständige 5'-Nukleotid des ersten Strangs ein Nukleotid der Gruppe der modifizierten Nukleotide ist und das endständige 3'-Nukleotid des zweiten Strangs ein Nukleotid der flankierenden Nukleotid-Gruppe ist,

wobei der erste Strang acht bis zwölf, vorzugsweise neun bis elf, Gruppen modifizierter Nukleotide aufweist und wobei der zweite Strang sieben bis elf, vorzugsweise acht bis zehn, Gruppen modifizierter Nukleotide aufweist, und wobei die Länge des ersten Strangs und des zweiten Strangs 15 bis 23 Basen ist und wobei die Modifikation 2'-O-Methyl ist,

wobei die Ribonukleinsäure auf beiden Seiten stumpf ist, und

wobei die Ribonukleinsäure RNA-Interferenz vermittelt.

2. Die Ribonukleinsäure gemäß Anspruch 1, wobei die doppelsträngige Struktur eine Länge von 18 oder 19 Basen hat.

3. Die Ribonukleinsäure gemäß Anspruch 2, wobei die Länge des besagten ersten Strangs und die Länge des zweiten Strangs 18 oder 19 Basen beträgt.

4. Die Ribonukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Targetgen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Strukturgenen, Haushaltsgenen, Transkriptionsfaktoren, Motilitätsfaktoren, Zellzyklusfaktoren, Zellzyklusinhibitoren, Enzymen, Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Tumorsuppressoren.
5. Verwendung einer Ribonukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 für die Targetvalidierung.
6. Verwendung einer Ribonukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 für die Herstellung eines Medikaments.
7. Die Verwendung gemäß Anspruch 6, wobei das Medikament für die Behandlung einer Krankheit oder eines Zustands dient, der ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Glioblastom, Prostatakrebs, Brustkrebs, Lungenkrebs, Leberkrebs, Kolonkrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs und Leukämie, Diabetes, Adipositas, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Stoffwechselkrankheiten.
8. Eine Zelle, vorzugsweise eine Knockdown-Zelle, die eine Ribonukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 enthält, wobei die Zelle, wenn es eine menschliche Zelle ist, eine isolierte menschliche Zelle ist.
9. Ein Organismus, vorzugsweise ein Knockdown-Organismus, der eine Ribonukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 enthält, wobei der Organismus kein menschliches Wesen ist.
10. Eine Zusammensetzung, die eine Ribonukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 enthält.
11. Eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine Ribonukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 enthält und ein pharmazeutisch annehmbarer Träger.
12. Ein In-Vitro-Verfahren für die Hemmung der Expression eines Targetgens in einer Zelle oder eines Derivats davon, das die Einführung einer Ribonukleinsäure gemäß einem der

Ansprüche 1 bis 4 in die Zelle aufweist, in einer Menge, die ausreicht, um die Expression des Targetgens zu hemmen, wobei das Targetgen das Targetgen der Ribonukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 ist.

Fig. 1

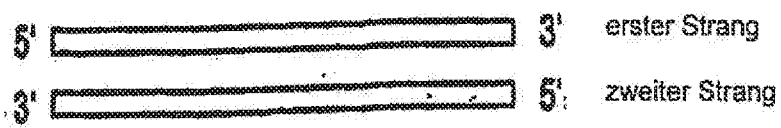


Fig. 2

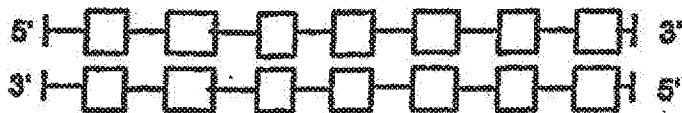
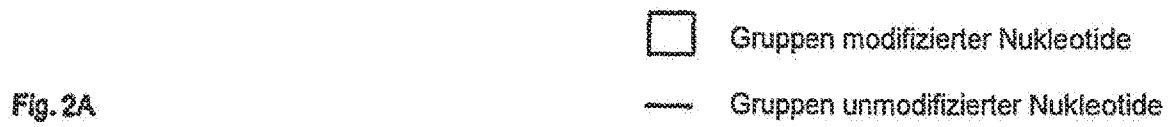


Fig. 2B

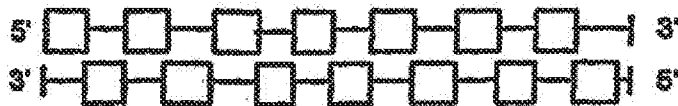


Fig. 2C



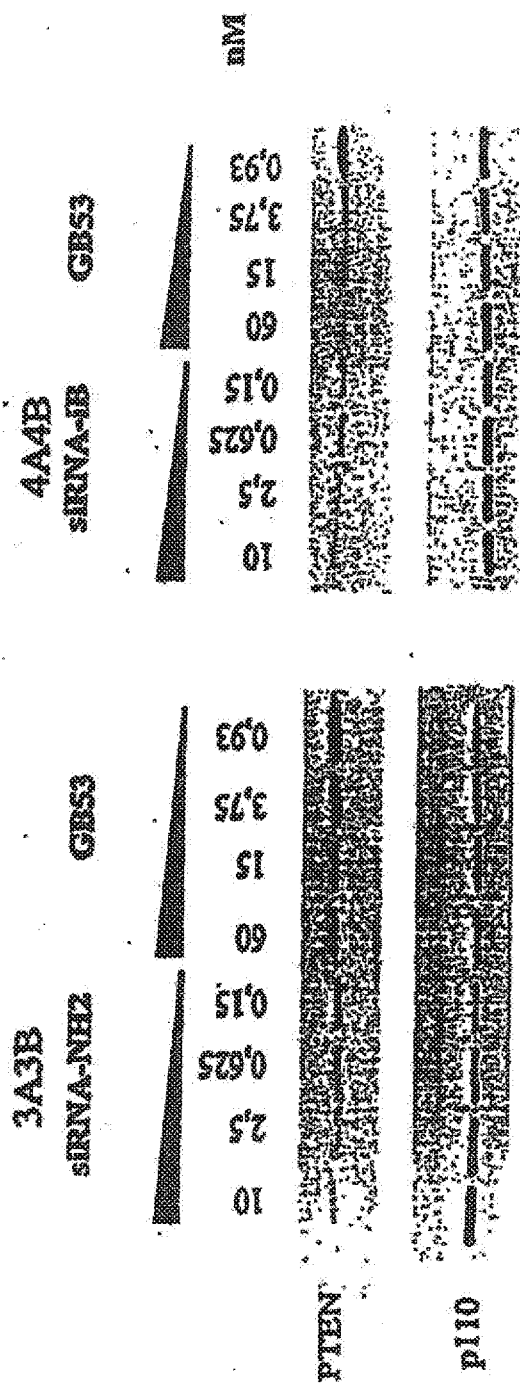


Fig. 3C

4B

19A	5'-	cuccuuuuguuucuguaacg-tt
19B	3'-tt-	-gaggaaaacaaagacgaugc
19A (NM)	5'-	cucauuuucuuuugucucacg-tt
19B (NM)	3'-tt-	-gaguaaaaagaaaacacgagugc
28A	5'-	cuccuuuuguuucuguaacg-
28B	3'-	-gaggaaaacaaagacgaugc-
29A (NM)	5'-	cucauuuucuuuugucucacg-
29B (NM)	3'-	-gaguaaaaagaaaacacgagugc
30A	5'-tt-	-cuccuuuuguuuucuguaacg-
30B	3'	-gaggaaaacaaagacgaugc-tt
31A (NM)	5'-tt-	-cucauuuucuuuugucucacg-
31B (NM)	3'	-gaguaaaaagaaaacacgagugc-tt

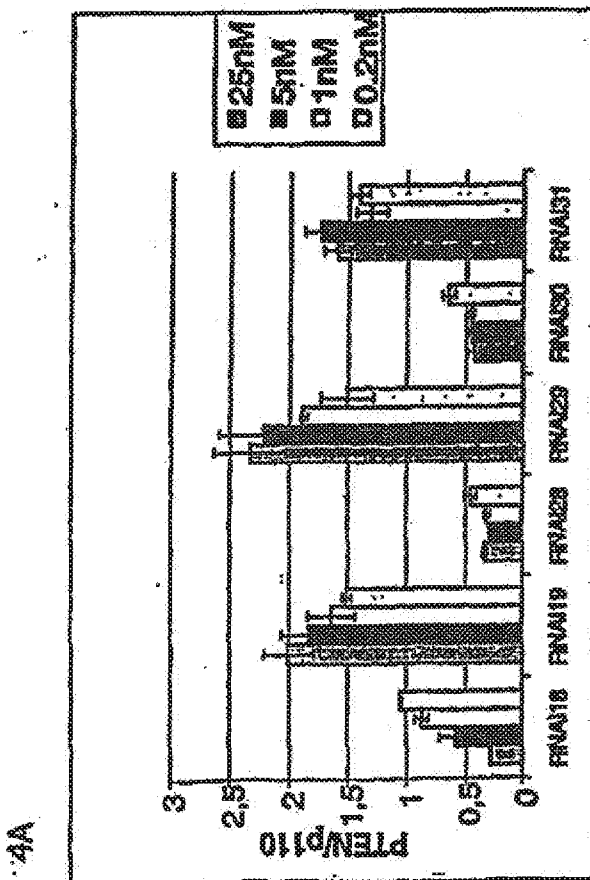
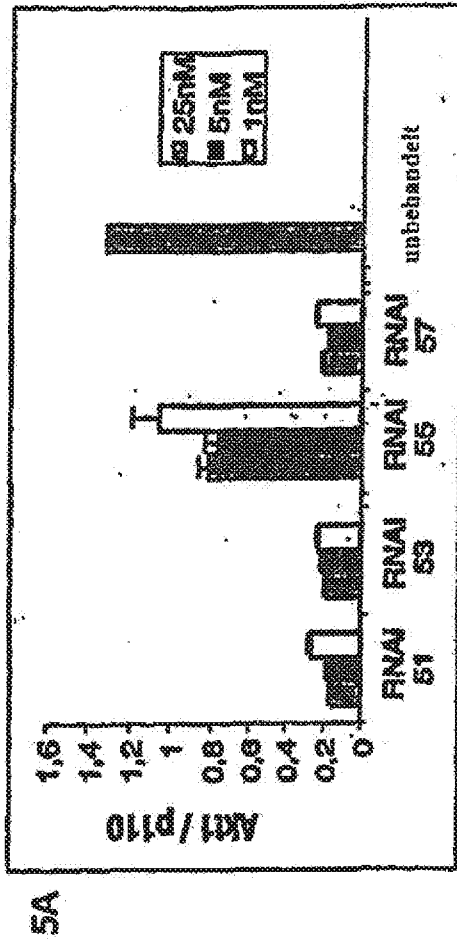


Fig. 4

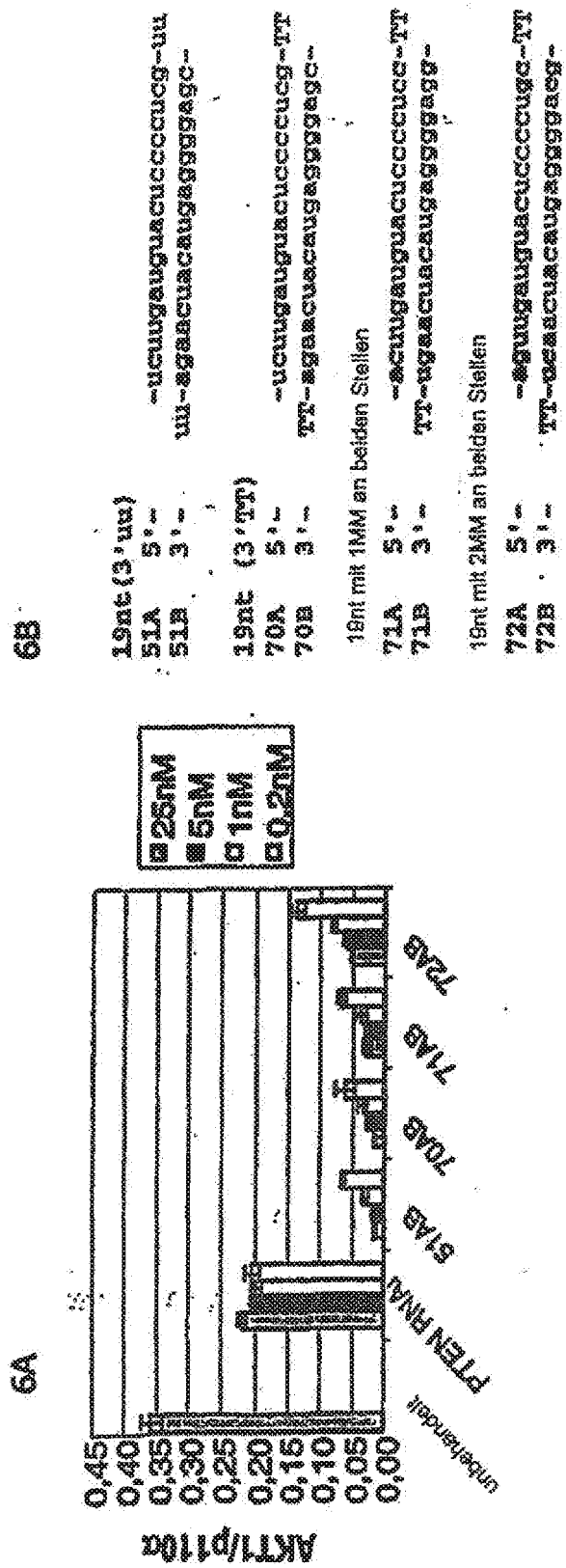
Fig. 5



5B

51A	5'-	-ucuuugaugacucccucg-uu	19nt 3'uu
51B	3'-	uu-agaacuaucagggggagc-	
53A	5'-	-ucuuugaugacucccucg-uu	19nt 3'Seq.-spezifische RNA
53B	3'-	cc-agaacuaucagggggagc-	
55A	5'-	-cuuugaugacucccucg-gu	17nt 3'Seq.-spezifische RNA
55B	3'-	ca-gaacuaucagggggag-	
57A	5'-	-ucuuugaugacucccucg-uu	18nt 3'Seq.-spezifische DNA
57B	3'-	cc-agaacuaucagggggagc-	

Fig. 6



A

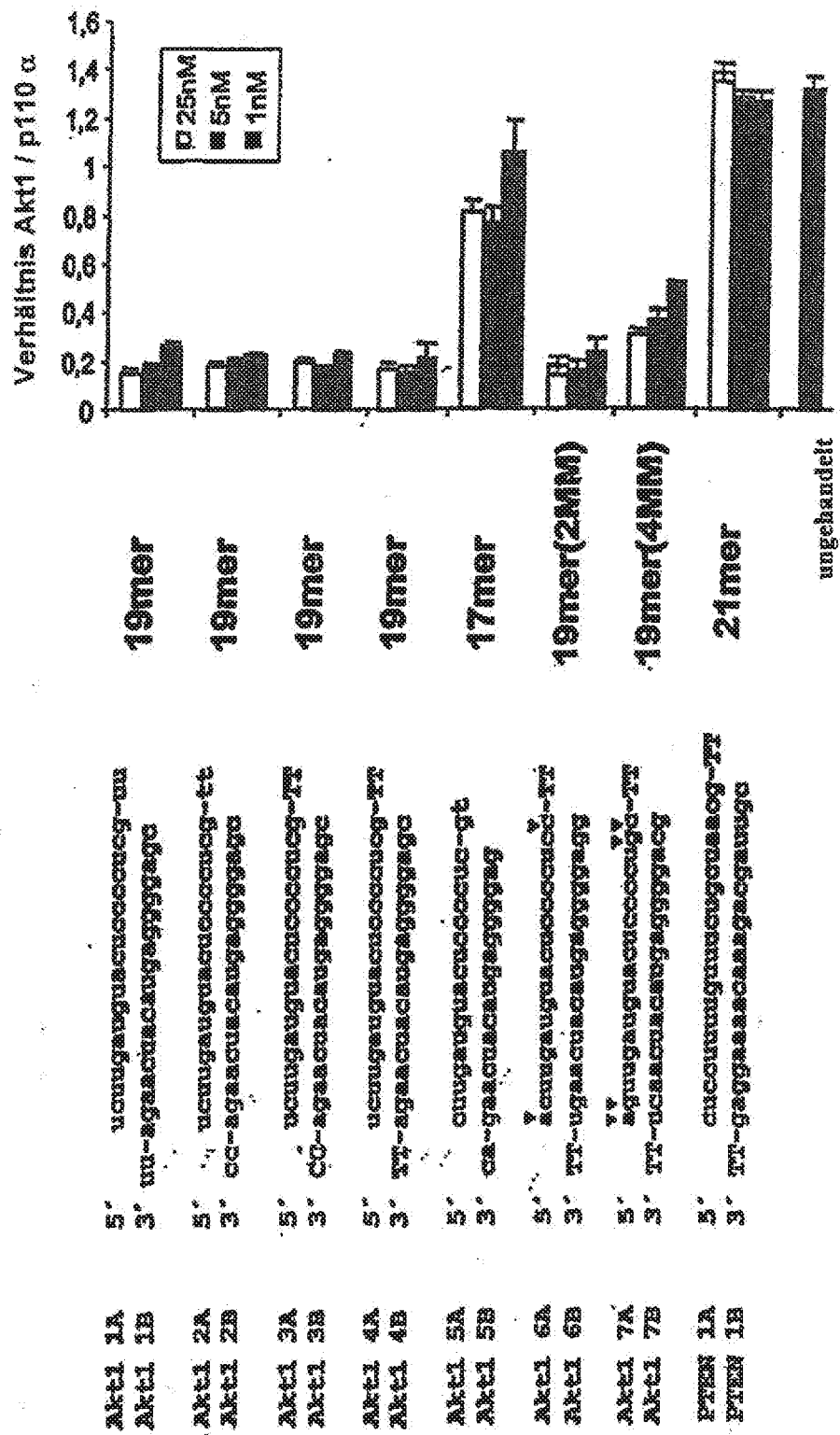
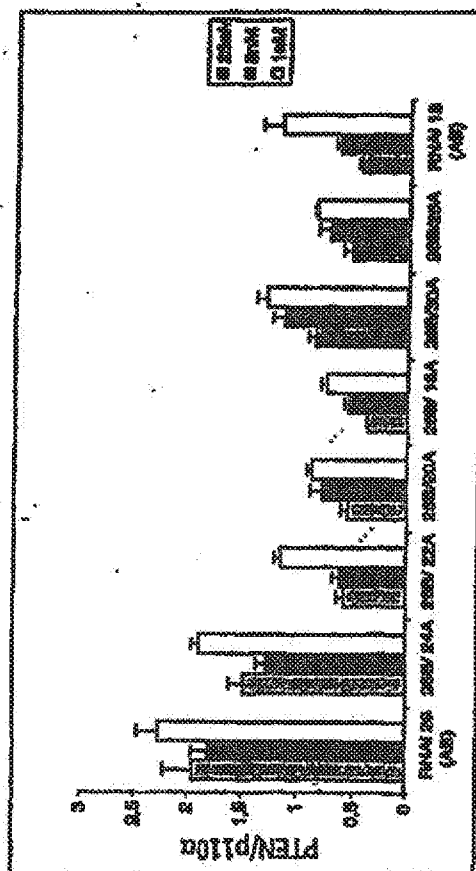


Fig. 7

94

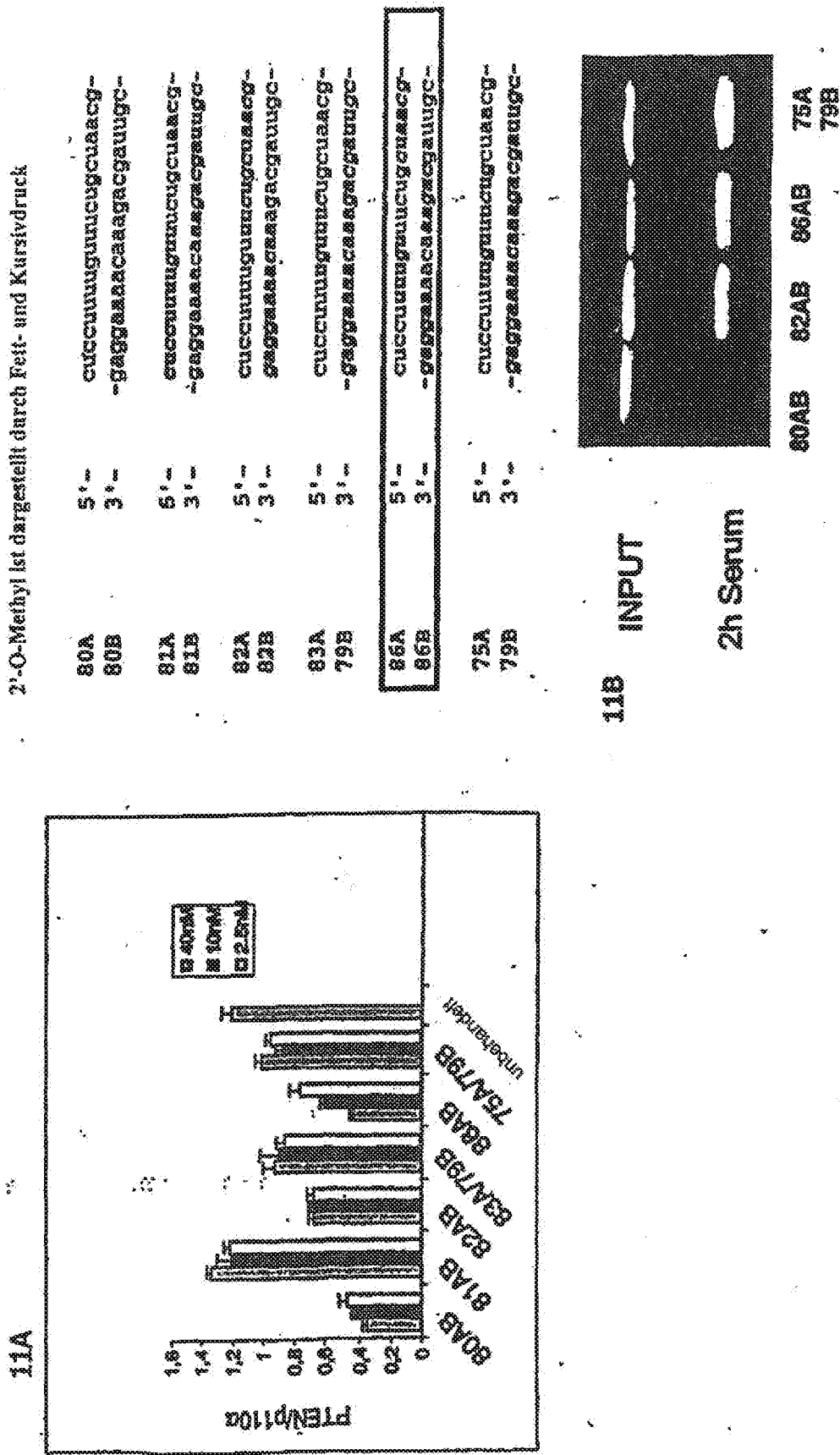
[illegible]

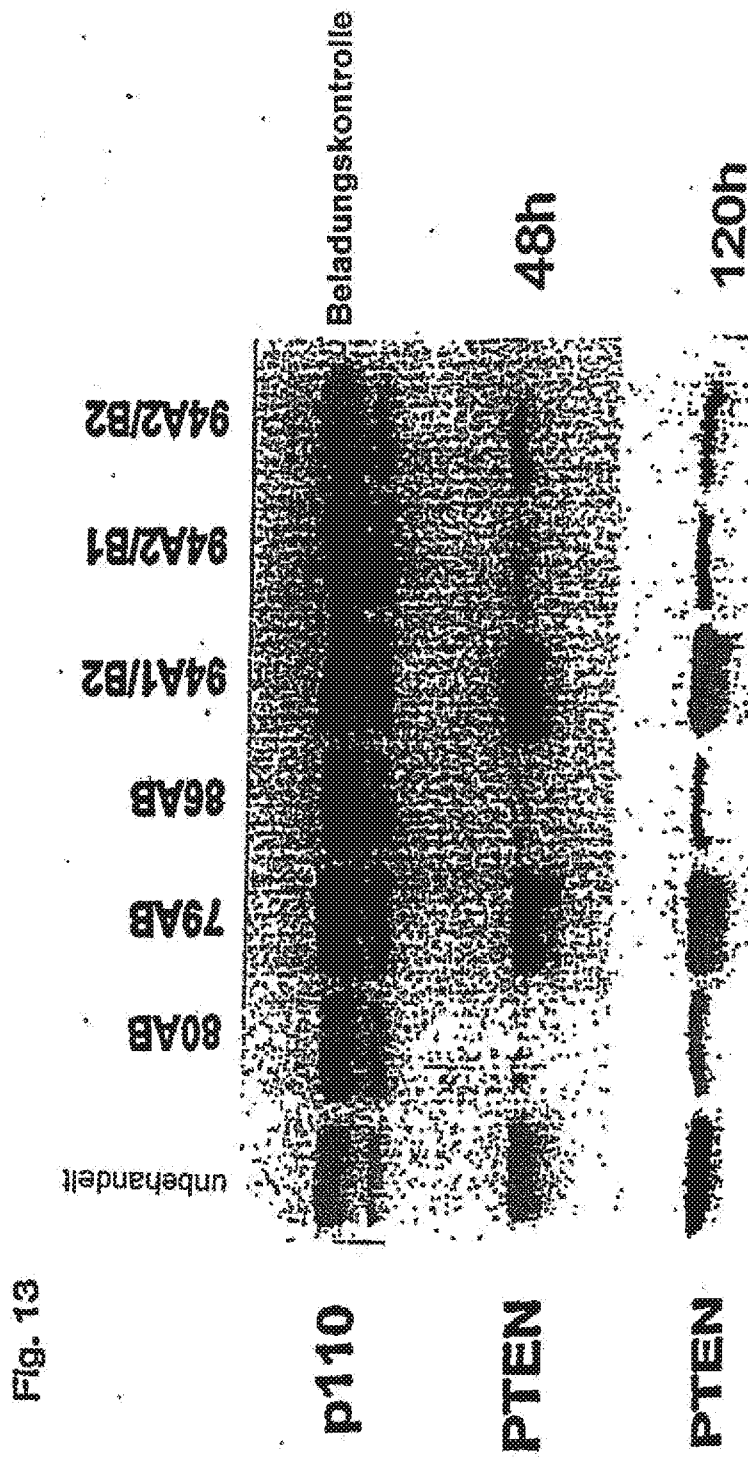
5

26A	5'-	NH2-cuccuunuguuucgcuacg	-TT-NH2
26B	3'-	NH3-TT-gaggaaacacaaagcagauugc	-NH2
24A	5'-	1B-cuccuunuguuucgcuacg	-TT-1B
26B	3'-	NH3-TT-gaggaaacacaaagcagauugc	-NH2
22A	5'-	cuccuunuguuucgcuacg	-TT-1B
26B	3'-	NH3-TT-gaggaaacacaaagcagauugc	-NH2
20A	5'-	cuccuunuguuucgcuacg	-TT-NH2
26B	3'-	NH2-TT-gaggaaacacaaagcagauugc	-NH2
18A	5'-	cuccuunuguuucgcuacg	-TT
26B	3'-	NH2-TT-gaggaaacacaaagcagauugc	-NH2
30A	5'-	TT-cuccuunuguuucgcuacg	-
26B	3'-	NH3-TT-gaggaaacacaaagcagauugc	-NH2
28A	5'-	cuccuunuguuucgcuacg	-
26B	3'-	NH2-TT-gaggaaacacaaagcagauugc	-NH2
18A	5'-	cuccuunuguuucgcuacg	-TT
18B	3'-	TT-gaggaaacacaaagcagauugc	



Fig. 11





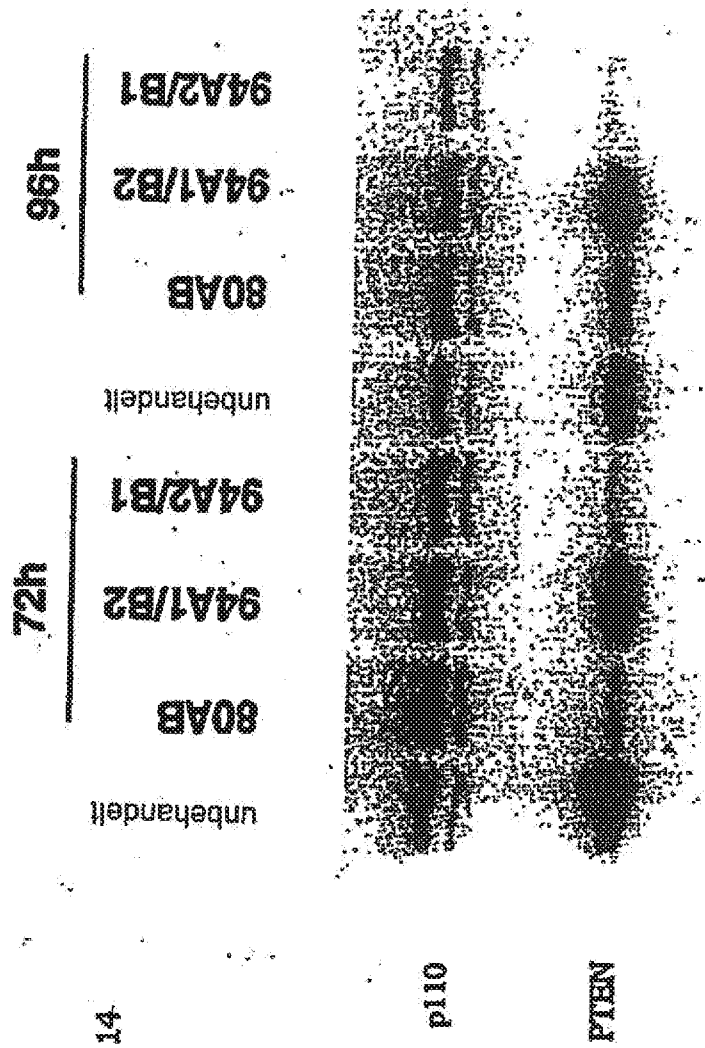


Fig. 14

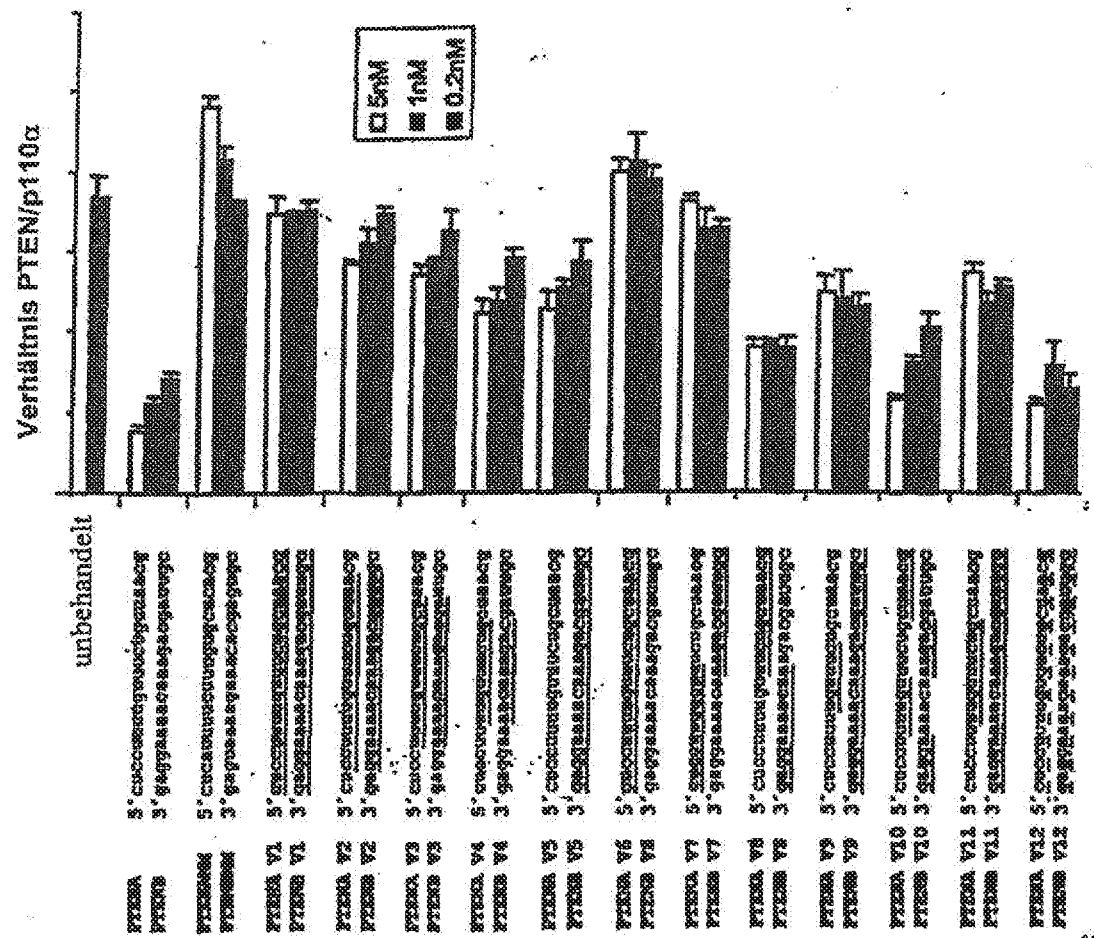


Fig. 15

C

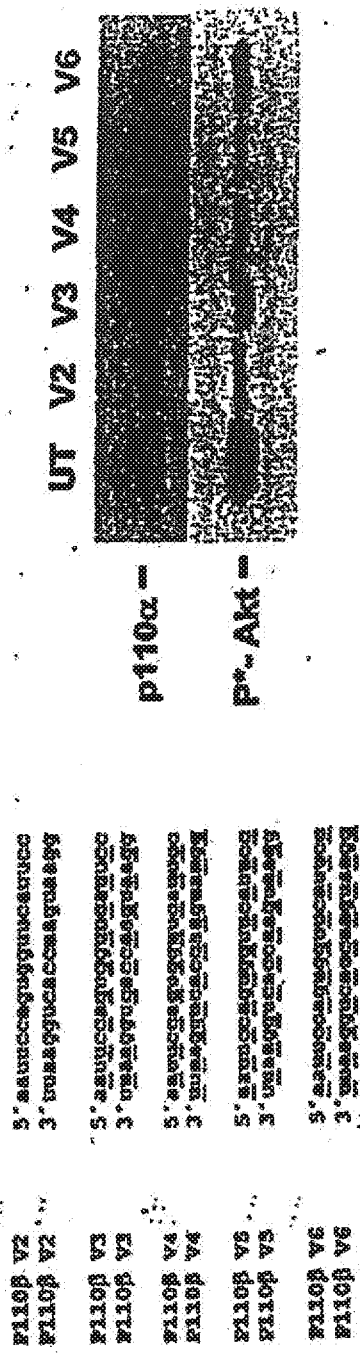
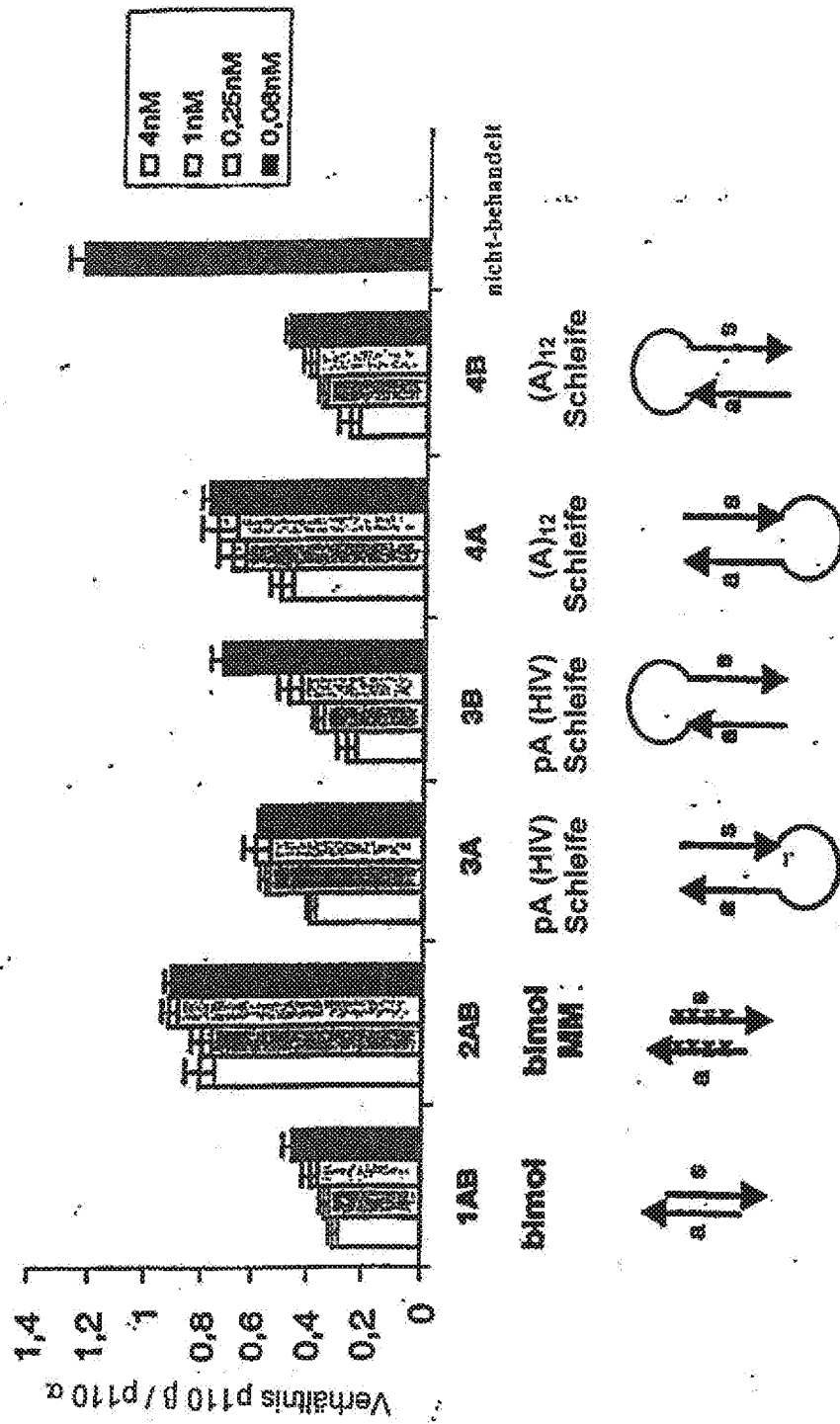


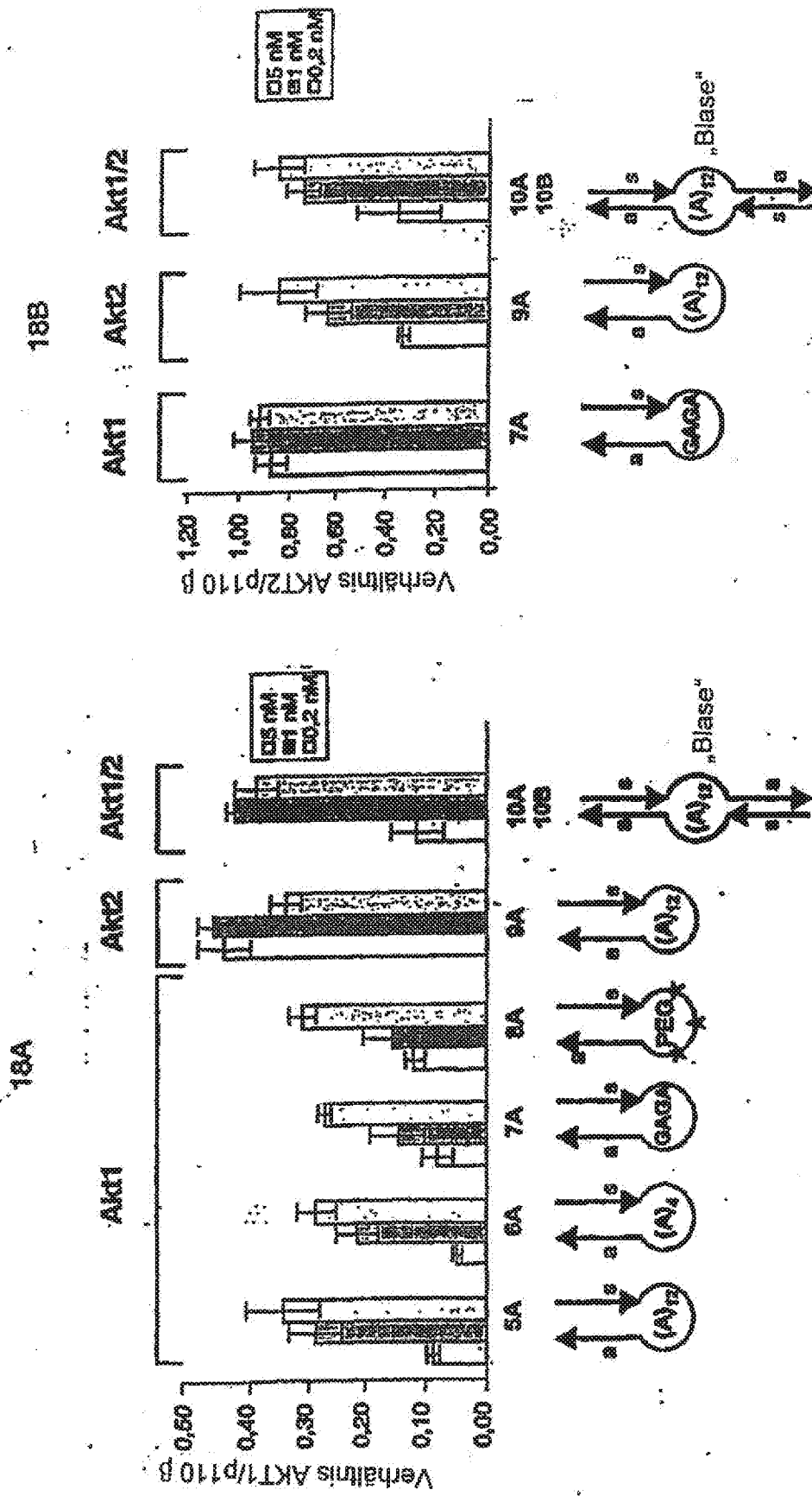
Fig. 16

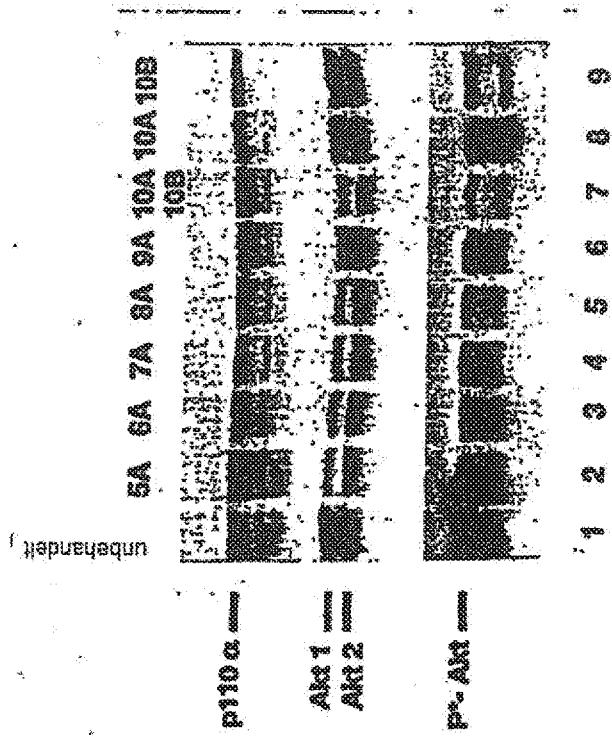
Fig.17



17B

Fig. 18





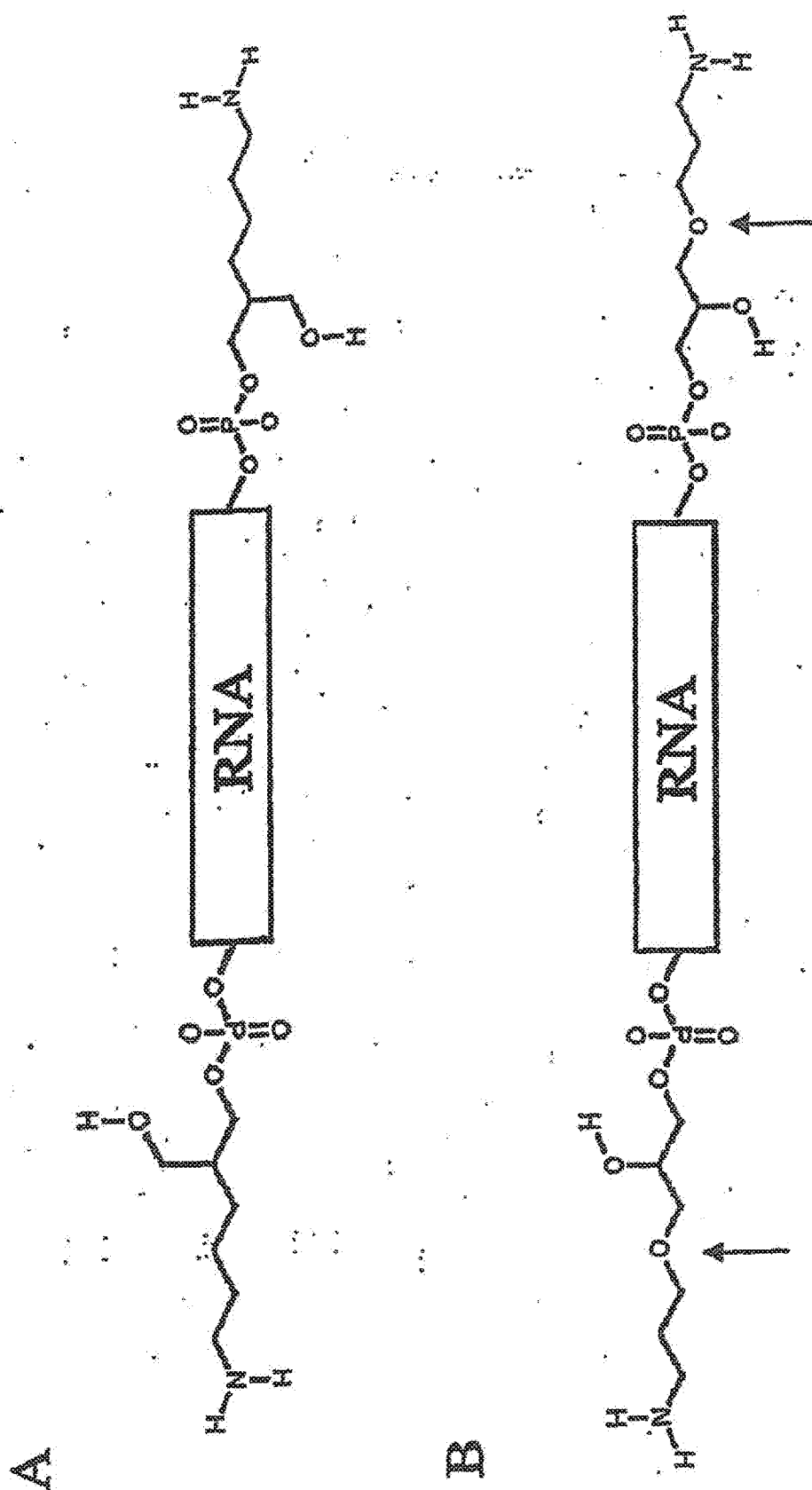


Fig. 19