



(19)
 Bundesrepublik Deutschland
 Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 103 46 487 A1** 2005.05.12

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **103 46 487.5**
 (22) Anmeldetag: **02.10.2003**
 (43) Offenlegungstag: **12.05.2005**

(51) Int Cl.7: **C12N 9/16**
A61K 31/713, A61K 48/00

(71) Anmelder:
**TransMIT Gesellschaft für Technologietransfer
 mbH, 35394 Gießen, DE**

(72) Erfinder:
**Sel, Serdar, Dr., 35043 Marburg, DE; Renz, Harald,
 Prof. Dr., 35043 Marburg, DE**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht zu
 ziehende Druckschriften:

WO 99/50 452 A1
WO 01/11 023 A1

**FINOTTO, Susetta, et.al.: Treatment of Allergic
 Airway Inflammation and Hyperresponsiveness
 by
 Antisense-induced Local Blockade of GATA-3
 Expression. In: J. Exp. Med., Vol.193 (11),
 S.1247-1260;;**

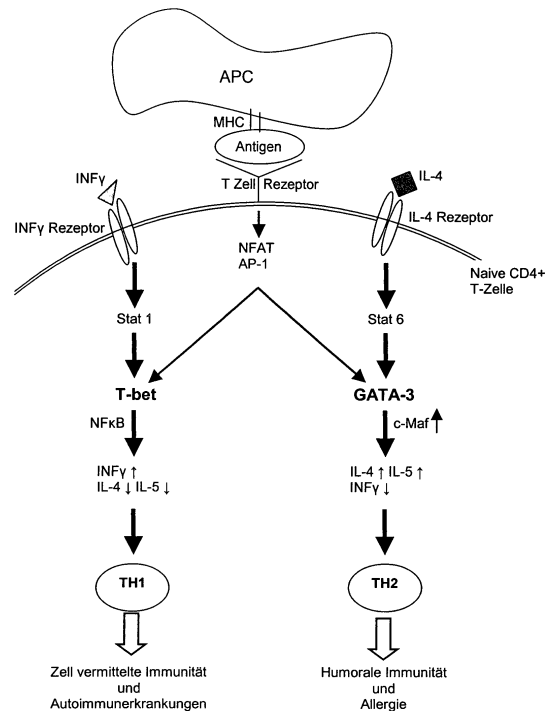
Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Rechercheantrag gemäß § 43 Abs. 1 Satz 1 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Herstellung eines Zell- und/oder Gewebe- und/oder Krankheitsphasen-spezifischen Arzneimittels**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Zell- und/oder Gewebe- und/oder Krankheitsphasen-spezifischen Arzneimittels gegen chronische Entzündungserkrankungen.

Dabei werden Krankheits-, Zelltyp-, Gewebe- und/oder stadienspezifische Proteine und Nukleinsäuren hinsichtlich ihres geänderten Expressionsmusters identifiziert und die entsprechenden Nukleinsäuren als mögliche Angriffsziele für DNAzyme oder siRNA analysiert. Es folgt ein Design von aktiven spezifischen DNAzymen und siRNA, die an die Zielsequenz binden und diese spalten, so dass ein Arzneimittel gegen chronische Entzündungserkrankungen und Autoimmunerkrankungen zur Verfügung steht.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Zell- und/oder Gewebe- und/oder Krankheitsphasen-spezifischen Arzneimittels, das zur Behandlung von chronischen Entzündungen geeignet ist.

Stand der Technik

Hintergrund der Erfindung

[0002] Chronische Entzündungen stellen einen zunehmend großen medizinischen Problemkreis mit hohem sozio-ökonomischen Impact dar. Hierzu zählen insbesondere folgende Erkrankungsgruppen:

- Autoimmunerkrankungen und Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises (Manifestationen an u.a. Haut, Lunge, Niere, Gefäßsystem, Nervensystem, Bindegewebe, Bewegungsapparat, endokrinem System)
- Allergische Soforttypreaktionen und Asthma
- Chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen (COPD)
- Arteriosklerose
- Psoriasis und Kontaktekzem
- Chronische Abstoßungsreaktionen nach Organ-, Knochenmarkstransplantation

[0003] Viele dieser Erkrankungen zeigen in den letzten Dekaden eine ansteigende Prävalenz nicht nur in den Industrienationen, sondern zum Teil weltweit. So leiden in Europa, Nordamerika, Japan und Australien mittlerweile über 20% der Bevölkerung an allergischen Erkrankungen und Asthma. Chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen sind zurzeit die fünft-häufigste Todesursache weltweit und werden nach Berechnungen der WHO im Jahre 2020 die dritt-häufigste Todesursache darstellen. Arteriosklerose mit den Folgeerkrankungen Herzinfarkt, Schlaganfall und peripherer arterielle Verschlusskrankheit nehmen in der Morbiditäts- und Mortalitätsstatistik weltweit eine führende Position ein. Psoriasis und Kontaktekzem sind zusammen mit der Neurodermitis die häufigsten chronischen Entzündungserkrankungen an der Haut überhaupt.

[0004] Aufgrund von bis heute nur unzureichend verstandenen Wechselwirkungen zwischen Umweltfaktoren und einer genetischen Disposition kommt es zu nachhaltigen Fehlregulationen des Immunsystems. Hierbei lassen sich für diese unterschiedlichen Erkrankungen folgende gemeinsame Prinzipien feststellen:

(A) Es kommt zur Entwicklung einer überschießenden Immunantwort gegen normalerweise für den Menschen harmlose Antigene. Diese Antigene können Bestandteile der Umwelt sein (z. B. Allergene, wie Pollen, Tierhaare, Nahrungsmittel, Milben, chemische Substanzen wie Konservierungsstoffe, Farbstoffe, Reinigungsmittel). In diesen Fällen entwickelt sich bei den Patienten eine allergische Reaktion. Im Falle von z.B. Aktiv- und Passiv- Zigarettenrauchern kommt es zu chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen (COPD). Andererseits kann das Immunsystem aber auch gegen Komponenten des eigenen Organismus reagieren, diese als fremd erkennen und eine Entzündungsreaktion dagegen in Gang setzen. In diesen Fällen entwickelt sich eine Autoimmunerkrankung. In jedem Falle werden harmlose, nicht-toxische Antigene fälschlicherweise als fremd bzw. gefährlich erkannt und eine unangemessene Entzündungsreaktion in Gang gesetzt.

(B) Die Erkrankungen verlaufen in Phasen zu denen die Initiation, Progression, also Fortschreiten der Entzündungsreaktion, und die damit assoziierte Destruktion und der Umbau mit Verlust von Organ-Funktionalität (sogenanntes Remodeling) zählen.

(C) Die Erkrankungen zeigen Patienten-spezifische sub-phänotypische Ausprägungsmerkmale.

(D) An der Initiation, Aufrechterhaltung und den Destruktions- und Umbauprozessen sind Komponenten der angeborenen und erworbenen Immunität nachhaltig beteiligt. Unter dem Einfluss der angeborenen Immunität (wichtige Komponenten: Antigen-präsentierende-Zellen mit ihren diversen Populationen und das Komplementsystem) kommt es zu Aktivierung und Differenzierung der Zellen des adaptiven Immunsystems (wichtige Komponenten: T- und B-Lymphozyten). Die T-Zellen übernehmen zentrale Funktionen im weiteren Verlauf indem sie in hoch-spezialisierte Effektoren differenzieren. Hierbei aktivieren und erwerben sie bestimmte Effektormechanismen, zu denen insbesondere folgende Funktionen zählen: Antikörperproduktion, Kontrolle der Funktionalität von Effektorzellen des Immunsystems (wie z. B. neutrophile-, basophile-, eosinophile Granulozyten), Rückkopplung auf Funktionen des angeborenen Immunsystems, Beeinflussung der Funktionalität von nicht-hämatopoetischen Zellen wie z. B. Epithel, Endothel, Bindegewebe, Knochen und Knorpel und vor allem neuronale Zellen. Hier kommt es zu einer besonderen Wechselwirkung zwischen Immun- und Nervensystem, aus dem sich das Konzept der Neuro-immunologischen Interaktion bei chronischen Entzündungen entwickelt hat.

[0005] Aufgrund der Komplexität und Vielschichtigkeit der Krankheitsbilder, die mit chronischen Entzündungen einhergehen, müssen an ein optimales Arzneimittel zur Behandlung der Krankheiten folgende Anforderungen gestellt werden:

- (1) Erkrankungen manifestieren sich in Patienten-spezifischen (Sub)-Phänotypen. Arzneimittel müssen daher eine hohe Patienten- bzw. Fallspezifität aufweisen.
- (2) Erkrankungen verlaufen in Stadien und Phasen. Arzneimittel müssen daher eine Stadien- bzw. Phasenspezifität besitzen.
- (3) Die Erkrankungen werden von unterschiedlich spezialisierten Zellen reguliert. Die Arzneimittel müssen daher eine Zell-spezifische Intervention bewirken.
- (4) Die Erkrankungen manifestieren sich an unterschiedlichen Organen und Kompartimenten. Die Arzneimittel müssen daher eine Kompartiment- bzw. Organ-Spezifität besitzen.
- (5) Arzneimittel müssen für eine Langzeittherapie geeignet sein. So müssen Reaktionen des Immunsystems gegen die Arzneimittel verhindert werden.
- (6) Das Nebenwirkungsprofil der Arzneimittel muss in medizinischer und ethischer Relation zu Schweregrad, Prognose und Verlauf der Erkrankungen in einem akzeptablen Verhältnis stehen.

[0006] Keine der heute verfügbaren, etablierten Therapien gegen chronische Entzündungen erfüllt diese Kriterien optimal. Bekannt sind aus der DE 695 11 245 T2 die Behandlung mit Immunglobulin A und aus der DE 695 18 667 T2 die Hemmung der Phospholipase A₂ (PLA₂) und/oder Coenzym-A-unabhängigen Transacylase (CoA-IT). Im Mittelpunkt der heute etablierten Therapiekonzepte stehen für diese Erkrankung die unspezifische anti-inflammatorische Therapie, sowie die Immunsuppression. So sind viele der eingesetzten unspezifischen anti-inflammatorisch wirkenden Substanzen wie Ibuprofen, Acetylsalicylsäure und Paracetamol entweder nicht wirksam genug oder mit einer hohen Rate unerwünschter Nebenwirkungen behaftet. Steroide haben dagegen zwar eine höhere Wirkungspotenz, sind aber ihrerseits mit schwerwiegenden Nebenwirkungen wie Hypertonus, Diabetes und Osteoporose behaftet. Immunsuppressive Medikamente der neueren Generation wie z. B. Cyclosporin und Tacrolimus zeigen Hepato- und Nephrotoxizität.

[0007] Diese Situation hat zur Suche und klinischen Erprobung einer Vielzahl von neueren Molekülen geführt, die spezifischer in die immunologischen und zellbiologischen Fehlregulationen eingreifen sollen. Hierzu zählen Zytokine, Zytokin-Rezeptoren und Anti-Zytokine. Probleme, die mit diesen neueren therapeutischen Einsätzen verbunden sind, schließen mangelnde Zell- und Organ-Spezifität, Entwicklung von unerwünschten Immunreaktionen gegen diese Moleküle, sowie eine mangelnde Wirksamkeit bei verschiedenen Phänotypen ein.

[0008] Es wird in neuerer Zeit versucht, eine neue Klasse katalytischer Moleküle, die sogenannten "DNAzyme" (Santoro, 1997) als therapeutische Agenzien zur Inaktivierung von Genen einzusetzen, deren Expression Krankheiten verursacht. DNAzyme sind Einzelstrang-Moleküle, die prinzipiell an komplementäre Bereiche der RNA binden können und diese durch Spaltung inaktivieren. Der spezifische Einsatz von DNAzymen als therapeutische Agenzien setzt allerdings voraus, dass die krankheitsverursachenden Gene und deren mRNA genauestens bekannt sind. Dies ist bislang nur bei wenigen Erkrankungen der Fall.

[0009] Das in der WO 01/11023A1 beschriebene DNAzym bindet RelA (p65) mRNA und ist damit gegen den Transkriptionsfaktor NF-κB gerichtet, in der WO 00/42173 ist ein EGR-1 mRNA bindendes DNAzym offenbart. Die W099/50452 offenbart ein 10-23 DNAzym, das in einem diagnostischen Verfahren zum Auffinden von Nukleinsäure-Mutationen verwendet werden kann.

[0010] Keine der derzeit bekannten Antisense-Moleküle und DNAzyme können zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von chronischen Entzündungen in Patienten verwendet werden.

Aufgabenstellung

Aufgabe der Erfindung

[0011] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Zell- und/oder Gewebe- und/oder Krankheitsphasen-spezifische Arzneimittel bereitzustellen, die zur funktionellen Inaktivierung von Ribonukleinsäure-Molekülen von Transkriptionsfaktoren und Faktoren der Signaltransduktionswege, deren Expression an der Entstehung von chronischen Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen beteiligt ist, führen und die zur Behandlung von chronischen Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen geeignet sind, wobei die geschilderten Nachteile im Stand der Technik beseitigt werden.

[0012] Darüber hinaus ist es Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zur Herstellung Zell- und/oder Gewebe-

und/oder Krankheitsphasen-spezifischer Arzneimittel bereitzustellen, das Ribonukleinsäure-Moleküle von Transkriptionsfaktoren und von Faktoren der Signaltransduktionswege, deren Expression an der Entstehung von chronischen Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen beteiligt ist, identifiziert und sie in Zielzellen funktionell inaktiviert.

[0013] Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren gemäß Anspruch 1 und einem Arzneimittel gemäß den Ansprüchen 16 bis 18 unter Einsatz spezifischer DNAzyme gemäß den Ansprüchen 10 bis 15 gelöst.

[0014] Der Vorteil der Erfindung besteht in einer funktionellen Inaktivierung von Ribonukleinsäure-Molekülen von Transkriptionsfaktoren und Faktoren der Signaltransduktionswege zur Differenzierung und/oder Expression von Zytokinen, die an der Entstehung der chronischen Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen beteiligt sind, mittels spezifischer DNAzyme und/oder siRNA. Diese Strategie zeichnet sich gegenüber konventionellen, aber auch gentherapeutischen Ansätzen durch höchste Zell- und/oder Gewebe- und/oder Krankheitsphasen-Spezifität und -Selektivität, hohe Stabilität der Moleküle und eine vernachlässigbare Antigenität aus. Es werden optimale Voraussetzungen für eine maßgeschneiderte Langzeittherapie bei Patienten mit chronischen Entzündungserkrankungen geschaffen.

[0015] Weitere Details und Vorzüge der vorliegenden Erfindung werden aus der folgenden Figur und der Beschreibung ersichtlich. Dabei zeigt:

[0016] **Fig. 1:** schematische Darstellung der Signaltransduktion bei der Differenzierung von CD4⁺ Zellen zu TH1- bzw. TH2-Zell (modifiziert nach Ho I.C. und Glimcher L.H., Cell 2002; 109: S109-S120).

[0017] **Fig. 2:** Nukleotidsequenz der katalytischen Domäne des 10-23 DNAzym und Bindung an eine Ziel RNA mittels Watson-Crick Paarung. (R = A oder G; Y = U oder C, N = A, G, U oder G). Der Pfeil zeigt die Spaltstelle in der Ziel mRNA.

[0018] **Fig. 3:** Pool an spezifischen Ribonukleinsäure Molekülen nach Schritt b) im besonderen die DNAzyme hgd 1 bis hgd 70 gegen GATA-3 und ihre Nucleotidsequenzen (A=Adenin, G=Guanin, C=Cytosin, T=Thymin). Großgeschriebene Nukleotide markieren eine rechte und linke Substratbindungsdomäne, kleingeschriebene Nukleotide markieren die zentrale katalytische Domäne des 10-23 DNAzym.

[0019] **Fig. 4:** Nukleotidsequenzen humaner GATA-3-Gene im Alignment

Sequenz 1: Humanes GATA-3 aus Datenbank Nr.: XM_043124.

Sequenz 2: Humanes GATA-3 aus Datenbank Nr.: X58072.

Sequenz 3: Humanes GATA-3 (sequenziert aus Plasmid pCR2.1).

[0020] Divergente Basen sind grau unterlegt, Primerlokalisationen für die Klonierung von GATA-3 sind unterstrichen. Die Lokalisation des DNAzymes hgd40 ist mit fett geschriebenen Buchstaben, die gleichzeitig grau unterlegt und unterstrichen sind, verdeutlicht.

(A=Adenin, G=Guanin, C=Cytosin, T=Thymin)

[0021] **Fig. 4A:** Nukleotidsequenz 3 des humanen GATA-3-Gen aus **Fig. 4**, darin eingezeichnet (grau hinterlegt) jeweils die Nukleotidpaare GT und AT, zwischen denen weitere DNAzyme-Schnittstellen liegen.

[0022] **Fig. 5:** Gelelektrophorese zeigt die Spaltung einer Ziel-mRNA (hier GATA-3 mRNA) mit spezifischen Ribonukleinsäure Molekülen nach Schritt b), hier nicht modifizierte DNAzyme [hgd11 (Spur 2), hgd13 (Spur 4), hgd17 (Spur 6), hgd40 (Spur 8)] und modifizierten DNAzymen [hgd11-M (Spur 3), hgd13-M (Spur 5), hgd17-M (Spur 7), hgd40-M (Spur 9)]. M bezeichnet die modifizierten DNAzyme. Nicht modifizierte (0,25 µM) oder modifizierte DNAzyme (0,25 µM) werden eine Stunde bei 37°C mit in vitro transkribierter GATA-3 mRNA (0,025 µM) in einem Volumen von 10 µl mit folgender Reaktionszusammensetzung inkubiert: 50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂. Anschließend werden die Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt. Spur 1 enthält als Kontrolle mRNA ohne DNAzyme-Zugabe. Mitgeführter Längenstandard (nicht dargestellt) zeigt Bandengrößen von 1000 bp, 2000 bp und 3000 bp. Pfeile zeigen auf S, die Bande mit dem Substrat (hier GATA-3-mRNA) und die Spaltprodukte P1 und P2.

[0023] **Fig. 6:** Immunblot mit der Reaktion von spezifischen Ribonukleinsäure Molekülen in Zellen. Jurkat E6.1 Zellen werden mittels Lipofektion mit spezifischen Ribonukleinsäure Molekülen, hier DNAzyme [hgd11-M (Spur 4), hgd13-M (Spur 5), hgd17-M (Spur 6), hgd40-M (Spur 7)] transfiziert. Als Kontrollen werden nicht be-

handelte Zellen (Spur 1), nur mit Transfektionsmedium (Spur 2) behandelte Zellen, beziehungsweise mit DNAzymen (hgd11-M) ohne Transfektionsmedium (Spur 3) behandelte Zellen eingesetzt. Nach 48h Inkubation werden die solubilisierten Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und GATA-3 (A) durch Immunblot mit spezifischen Antikörpern detektiert. (Spur 4 enthält Zellen mit hgd11-M, Spur 5 enthält Zellen mit hgd13-M, Spur 6 enthält Zellen mit hgd17-M, Spur 7 enthält Zellen mit hgd40-M.) Zur Kontrolle auf gleiche Proteinmengen pro Spur wird auf der gleichen Blot-Membran eine Immunfärbung mit β -Aktin (B) durchgeführt. Mitgeführter Längenstandard (nicht dargestellt) zeigt Bandengrößen von 63,8 kDa, 49,5 kDa und 37,4 kDa.

[0024] Fig. 7: Pool an spezifischen Ribonukleinsäure Molekülen nach Schritt b) im besonderen die DNAzyme td 1 bis td 70 gegen T-bet und ihre Nukleotidsequenzen (A=Adenin, G=Guanin, C=Cytosin, T=Thymin)

[0025] Fig. 8: Nukleotidsequenzen humaner T-bet-Gene im Alignment

Sequenz 1: Humanes T-bet aus Datenbank Nr.: NM 013351.

Sequenz 2: Humanes T-bet (sequenziert aus pBluescript-SK).

[0026] Divergente Basen sind grau unterlegt, Primerlokalisationen für die Klonierung von T-bet sind unterstrichen. Die Primerlokalisationen für die relative Quantifizierung im LightCycler sind umrandet. Die Lokalisation der DNAzyme td54 und td69 ist gleichzeitig grau unterlegt und unterstrichen, td70 ist zudem in fettgeschriebenen Buchstaben hervorgehoben.

(A=Adenin, G=Guanin, C=Cytosin, T=Thymin)

[0027] Fig. 8A: Nukleotidsequenz 1 des humanen T-bet-Gen aus [Fig. 8](#), darin als graue Hinterlegung eingezeichnet jeweils die Nukleotidpaare GT und AT, zwischen denen weitere DNAzyme-Schnittstellen liegen.

[0028] Fig. 9: Gelelektrophorese zeigt die Spaltung einer Ziel-mRNA (hier T-bet mRNA) mit spezifischen Ribonukleinsäure Molekülen nach Schritt b), hier modifizierte DNAzyme [(td54m (Spur 3), td69m (Spur 4) und td70m (Spur 5)]. Die modifizierten DNAzyme (0,25 μ M) werden 30 min bei 37°C mit in vitro transkribierter T-bet mRNA (0,025 μ M) in einem Volumen von 10 μ l mit folgender Reaktionszusammensetzung inkubiert: 50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$. Anschließend werden die Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt. Spur M enthält mitgeführten Längenstandard 3000 Basen und 2000 Basen, Spur 2 enthält als Kontrolle mRNA ohne DNAzym-Zugabe. Pfeil A zeigt auf die Bande mit Substrat (hier T-bet-mRNA), Pfeil B auf das größere Spaltprodukt. Das zweite Spaltprodukt ist kleiner und in dieser Abbildung nicht mehr sichtbar.

[0029] Fig. 10: Quantifizierung von T-bet- und GAPDH-mRNA Mengen im LightCycler aus, mit DNAzymen td54 (A), td69 (B) und td70 (C) behandelten Zellen. Jurkat E6.1 Zellen werden zweimal in 24h Abstand entweder mit den T-bet-spezifischen DNAzymen td54 (A), td69 (B) und td70 (C) oder mit Nonsense-DNAzym als Kontrolle (nicht dargestellt) transfiziert. Anschließend wird RNA gereinigt, eine reverse Transkription durchgeführt und die gewonnene DNA im LightCycler eingesetzt. Als interner Standard dient GAPDH (gestrichelte Kurven). Gezeigt sind jeweils 4-fach Bestimmungen von mit T-bet-spezifischen DNAzymen oder Nonsense-DNAzym behandelten Zellen. Durchgezogene Kurven zeigen die Menge an T-bet in den mit T-bet-spezifischen DNAzymen behandelten Zellen, gepunktete Linien zeigen die Menge an T-bet in den mit Nonsense-DNAzyme behandelten Zellen.

[0030] Fig. 11: Diagramm der relativen Quantifizierung von T-bet-mRNA in Jurkat E6.1 Zellen.

[0031] Jurkat E6.1 Zellen werden mit den T-bet-spezifischen DNAzymen td54, td69 und td70 zwei mal transfiziert und nach 48h wird RNA isoliert. Nach einer reversen Transkription wird die mRNA-Menge mittels LightCycler bestimmt. Als Kontrolle dient Nonsense-DNAzym. Die relative Quantifizierung von T-bet- und GAPDH-mRNA erfolgt nach Anleitung [beschrieben im User Bulletin #2 (ABI Prism 7700 Sequence detection System User Bulletin #2 (2001). Relative quantification of gene expression. <http://docs.appliedbiosystems.com/pebi docs/04303859.pdf>]. Dabei werden die Menge an T-bet-mRNA aus dem Kontrollversuch mit Nonsense-DNAzym gleich 100% gesetzt.

[0032] Fig. 1 zeigt in einer nach Ho I.C. und Glimcher L.H. (Cell 2002; 109: S109-S120) modifizierten schematischen Darstellung die Zusammenhänge der Signaltransduktion bei der Differenzierung von $CD4^+$ Zellen zu TH1- bzw. TH2-Zell.

[0033] Die Stimulation über den T-Zellrezeptor durch den entsprechenden Peptid-MHC-Komplex induziert die klonale Expansion und programmierte Differenzierung von $CD4^+$ T-Lymphozyten zu T-Helfer (TH)1- oder TH2-Zellen. Die Unterscheidung dieser beiden Subtypen erfolgt aufgrund ihrer Zytokin-Profile. TH1-Zellen pro-

duzieren Interferon- γ (INF γ), Interleukin 2 (IL-2) und Tumor-Nekrose-Faktor- β , wohingegen TH2-Zellen IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 sezernieren. Bakterielle und virale Infektionen induzieren eine Immunantwort, die von TH1-Zellen dominiert wird. Auf der anderen Seite regulieren TH2-Zellen die IgE Produktion gegen Parasiten. Dabei besteht zwischen TH1- und TH2-Zellen ein Gleichgewicht. Die Zerstörung dieses Gleichgewichtes verursacht Krankheiten, so ist eine überschießende TH1-Zellenantwort assoziiert mit Autoimmunerkrankungen, während allergischen Erkrankungen eine verstärkte TH2-Zellantwort zugrunde liegt.

[0034] Es ist bekannt, dass TH1-Zytokine in die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie z.B. Autoimmunuveitis, experimentelle allergische Enzephalomyelitis, Typ 1 Diabetes mellitus oder Morbus Crohn involviert sind, während TH2-Zytokine (IL-4, IL-5, IL-13 bzw. IL-9) an der Entstehung von chronisch entzündlichen Atemwegserkrankungen wie z.B. Atemwegseosinophilie, Mukus-Hypersekretion und Atemwegs-Hyperreagibilität beteiligt sind. Grundlage dieser Erkrankungen sind pathophysiologische Veränderungen während der Produktion von charakteristischen Zytokinen durch antigenspezifische TH-Zellen. So zeigen transgene Mäuse, die in den Atemwegsepithelien die TH2-Zytokine IL-4, IL-5, IL-13 bzw. IL-9 konstitutiv überexprimieren, typische allergische Entzündungsreaktionen. TH2-Zell-Subpopulationen in der Lunge und den Atemwegen rufen in TH2-Zellen im Tiermodell die charakteristischen Symptome des Asthma bronchiale hervor.

[0035] Überraschenderweise wurde gefunden, dass zur Zell- und/oder Gewebespezifischen Behandlung von chronischen Entzündungen und/oder Autoimmunerkrankungen Transkriptionsfaktoren und Faktoren der Signaltransduktionswege zur Differenzierung und/oder Expression von Zytokinen, die an der Entstehung der chronischen Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen beteiligt sind wie z.B.: der TH1-Zell-spezifische Transkriptionsfaktor T-bet und der TH2-Zell-spezifische Transkriptionsfaktor GATA-3 in idealer Weise geeignet sind.

[0036] Der TH1-Zell-spezifische Transkriptionsfaktor T-bet ist vor allem für die Differenzierung von naiven CD⁺ T-Zellen zu TH1-Zellen verantwortlich. Seine Expression wird über die Signaltransduktionswege des T-Zell Rezeptors (TZR) und über INF γ -Rezeptor/STAT1 kontrolliert. T-bet transaktiviert das endogene INF γ -Gen und induziert die INF γ Produktion. Darüber hinaus induziert er die Hochregulation der Protein-Expression von IL-12R β 2 Ketten und führt zum Chromatin-Remodeling von individuellen INF γ Allelen. Die in vivo Funktion von T-bet wird in Knock-Out-Mäusen (T-bet^{-/-}) bestätigt. Obwohl T-bet defiziente Mäuse eine normale Lymphozyten Entwicklung aufweisen, produzieren CD4⁺ T-Zellen aus diesen Mäusen kein INF γ , weder auf die Stimulation mit anti-CD3/CD28 noch mit PMA/Ionomycin. T-bet defiziente Mäuse zeigen keine Immunantwort auf eine L. major Infektion, die Menge an TN2-Zytokinen ist erhöht.

[0037] Bekannt ist die Funktion von T-bet in mucosalen T-Zellen bei der Entstehung von entzündlichen Darmerkrankungen. Untersuchungen im Tiermodell zeigen eine Verschlimmerung der Colitis in rekonstituierten SCID (Severe Combined Immunodeficiency) Mäusen nach retroviraler Transduktion von T-bet in CD4⁺CD26L⁺ T-Zellen, umgekehrt führt der Transfer von T-bet defizienten T-Zellen zu keiner Colitis -Induktion.

[0038] Der Transkriptionsfaktor T-bet induziert spezifisch die Entwicklung von TH1-Zellen und kontrolliert die INF γ -Produktion in diesen Zellen. Durch die Inhibition von T-bet wird die Balance zwischen TH1- und TH2-Zellen zugunsten von TH2-Zellen verschoben.

[0039] Der TH2-Zell-spezifische Transkriptionsfaktor GATA-3 ist vor allem für die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu TH2-Zellen verantwortlich.

[0040] Die TH2-Zelldifferenzierung wird dabei hauptsächlich durch zwei Signalübertragungswege, den T-Zell Rezeptor- (TZR) und den IL-4 Rezeptor-Weg, gesteuert. Vom TZR weitergeleitete Signale aktivieren sowohl die TH2 zellspezifischen Transkriptionsfaktoren c-Maf und GATA-3 als auch die Transkriptionsfaktoren NFAT und AP-1. Die Aktivierung des IL-4 Rezeptors führt zur Bindung von STAT6 an die zytoplasmatische Domäne des IL-4 Rezeptors, wo er von Jak1- und Jak3-Kinasen phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung ihrerseits führt zur Dimerisierung und Translokation von STAT6 in den Nukleus, wo STAT6 die Transkription von GATA-3 und anderen Genen aktiviert.

[0041] GATA-3 ist ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der nach „Representational-Difference-Analysis“ (RDA) und Studien an transkriptioneller Regulation von IL-5 ausschließlich in maturen TH2-Zellen exprimiert wird, nicht in TH1-Zellen.

[0042] Weitere Transkriptionsfaktoren, die eine Rolle bei der Differenzierung zu TH1- beziehungsweise TH2-Zellen spielen und an der Entstehung der chronischen Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen

kungen beteiligt sind weisen eine Expression auf, die sich in einer Zielzelle im Vergleich zur Expression einer Kontrollzelle unterscheidet und werden erfindungsgemäß ebenfalls zum Design von spezifischen DNAzymen und/oder siRNA für den therapeutischen Einsatz bei chronisch entzündlichen Erkrankungen eingesetzt:

- STAT4, STAT5a and STAT1 (signal transducer and activator of transcription)
- c-Rel
- CREB2 (cAMP response element-binding protein 2)
- ATF-2, ATF-2
- Hlx
- IRF-1 (interferon regulatory factor-1)
- c-Maf
- NFAT (Nuclear factor of activated T cells)
- NIP45 (NF-AT interacting protein 45)
- AP1 (Activator Protein 1)
- MeI-18
- SKAT-2 (SCAN box, KRAB domain associated with a Th2 phenotype)
- CTLA-4 (Cytolytic T lymphocyte-associated antigen 4)

[0043] Weitere Faktoren der Signaltransduktionswege, die zur Differenzierung und/oder Expression von Zytokinen verantwortlich sind und an der Entstehung der chronischen Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen beteiligt sind, weisen eine Expression auf, die sich in einer Zielzelle im Vergleich zur Expression einer Kontrollzelle unterscheidet und werden erfindungsgemäß ebenfalls zum Design von spezifischen DNAzymen und/oder siRNA für den therapeutischen Einsatz bei chronisch entzündlichen Erkrankungen eingesetzt:

- Src kinase
- Tec kinase
- Rlk (Txk im Menschen)
- Itk
- Tec
- RIBP (Rlk/Itk-binding protein)
- PLC γ (Phospholipase C γ 1)
- MAP kinase (Mitogen-activated protein kinase)
- ERK
- JNK
- P38
- MKK (MAP kinase kinase)
- MKK1
- MKK2
- MKK3
- MKK4
- MKK6
- MKK7
- Rac2
- GADD45 (Growth arrest and DNA damage gene 45)
- GADD45 β
- GADD45 γ
- SOCS (Suppressors of cytokine signalling)
- CIS (Cytokine-induced SH2 protein)
- SOCS1
- SOCS2
- SOCS3
- JAK (Janus kinase)
- JAK1
- JAK3
- NIP45 (NF-AT interacting protein)

[0044] Erfindungsgemäß wird ein Zell- und/oder Gewebe- und/oder Krankheitsphasenspezifisches Arzneimittel bereitgestellt, das zur Behandlung von chronischen Entzündungen geeignet ist.

[0045] Das Arzneimittel greift bevorzugt an den Interventionspunkten der den chronischen Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen zugrunde liegenden komplexen Kaskade der immunologischen und zellbiologischen Fehlregulationen an. Besonders bevorzugt sind dies Interventionspunkte der Regulation der Dif-

ferenzierung der beteiligten Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise der TH2-Zellspezifische Transkriptionsfaktor GATA-3 oder der TH1-Zell-spezifische Transkriptionsfaktor T-bet. Der erzielte therapeutische Effekt besteht in einer funktionellen Inaktivierung von mRNA-Molekülen mittels spezifischer DNAzyme und/oder siRNA. Diese Strategie bietet eine Reihe von Vorteilen gegenüber konventionellen, aber auch gentherapeutischen Ansätzen: höchste Spezifität und Selektivität, hohe Stabilität der Moleküle und eine vernachlässigbare Antigenität. Es werden optimale Voraussetzungen geschaffen für eine maßgeschneiderte Langzeittherapie bei Patienten mit chronischen Entzündungserkrankungen.

[0046] Erfindungsgemäß wird ein Verfahren zur Herstellung eines Zell- und/oder Gewebe- und/oder Krankheitsphasen-spezifischen Arzneimittels bereitgestellt, dass folgende Schritte umfasst:

- a) Identifikation von Ribonukleinsäure-Molekülen, deren Expression sich in einer Zielzelle im Vergleich zur Expression einer Kontrollzelle unterscheidet
- b) Design von spezifischen Ribonukleinsäure-Molekülen, die an Ribonukleinsäure-Moleküle aus Schritt a) binden und sie funktionell inaktivieren
- c) Einbringen der spezifischen Ribonukleinsäure-Moleküle aus Schritt b) in Zielzellen
- d) Formulierung der spezifischen Ribonukleinsäure-Molekülen aus Schritt b) und/oder einer Zielzelle aus Schritt c) in einem Arzneimittel

[0047] Der Begriff „Zell- und/oder Gewebe- und/oder Krankheitsphasen-spezifisch“ bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung, dass das mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens hergestellte Arzneimittel im wesentlichen nur bei einer bestimmten Art von Zellen (Zielzelle) und/oder in bestimmten Geweben oder Organen und/oder in bestimmten Phasen der Erkrankung wirksam ist, und einen vernachlässigbaren Einfluss auf andere Zellen (Kontrollzellen), Gewebe oder Organe besitzt. Vorzugsweise ist das Arzneimittel bei mindestens 2/3 der Zielzellen wirksam. Stärker bevorzugt bei mindestens 80% und am meisten bevorzugt bei mindestens 98% der Zielzellen. Es ist außerdem bevorzugt, dass das Arzneimittel bei höchstens 10% der Kontrollzellen wirksam ist, stärker bevorzugt bei höchstens 5% und am meisten bevorzugt bei < 1 % der Kontrollzellen.

[0048] Der Begriff „Identifikation von Ribonukleinsäure-Molekülen, deren Expression sich in einer Zielzelle im Vergleich zur Expression einer Kontrollzelle unterscheidet“ umfasst in der vorliegenden Erfindung folgende Punkte:

[0049] i) Zielzellen sind Zellen in Geweben und Organen, die bekannterweise zur Entstehung einer Krankheit führen, dazu beitragen oder diese verstärken, die die Krankheit aufrecht erhaltenden Prozesse unterhalten, zu ihnen beitragen oder diese verstärken, beziehungsweise die zu Spätfolgen einer Krankheit führen, beitragen oder sie verstärken. Dazu zählen beispielsweise Zellen, die bestimmte Transkriptionsfaktoren aufweisen, spezifische Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren sezernieren, oder Zellen mit typischen Oberflächenrezeptoren.

[0050] ii) Die Zielzellen können zum Beispiel mittels Technologien isoliert werden, die auf der Bindung spezifischer Antikörper basieren. Hier werden Magnetic Beads, erhältlich von den Firmen Miltenyi (Macs-System), Dynal (DynaBeads) oder BD-Bioscience (iMAG) angewendet. Alternativ erfolgt dies über eine Zellreinigung mittels Fluoreszenz-markierter Antikörper an Zellsortern beispielsweise der Firma Cytomation (MOFLO) oder BD-Bioscience (FACS-Vantage). Die Reinheit der Zielzellen ist bevorzugt bei mindestens 80%, stärker bevorzugt bei mindestens 95% und am meisten bevorzugt bei mindestens 99%.

[0051] iii) Verfahren zur Isolierung der RNA sind z.B. in Sambrook and Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory (2001), New York und Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1998), New York, beschrieben. Außerdem ist es dem Durchschnittsfachmann möglich, kommerziell verfügbare Kits (Silika-Technologie) z.B. das RNeasy Kit von der Firma Qiagen, zur RNA Isolierung zu verwenden. Weiterhin ist es bevorzugt, direkt mRNA aus den Zielzellen durch Verwendung kommerzieller Kits beispielsweise der Firmen Qiagen (Oligotex mRNA Kit), Promega (PolyAtract mRNA Isolation System) oder Miltenyi (mRNAdirect) zu reinigen.

[0052] iv) Die Identifizierung von mRNAs, die differentiell unterschiedlich sind, d.h. mRNAs, deren Expression in der Zielzelle gegenüber der Kontrollzelle erhöht ist, erfolgt beispielsweise mit kommerziell erworbenen Genchips (z.B. MWG, CLONTECH) oder mit einem Filter-Hybridisierungsverfahren (z. Bsp. Unigene) nach Herstellerangaben. Alternativ werden differentielle mRNAs durch subtraktive Hybridisierung von cDNA, die zuvor aus der mRNA durch RT-Reaktion entstanden sind, hergestellt. Zu diesen dem Fachmann bekannten Verfahren, zählen beispielsweise die SSH-Methode (Firma Clontech) oder die RDA-Methode. Zu einer ebenfalls bevorzugten Anwendungsform gehört die Kombination von Chiptechnologie und subtraktiver Hybridisierung. Die

Identifizierung der differenziell exprimierten Gene erfolgt unter Einsatz der Chiptechnologie mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Programmen z.B. mit dem Vector Xpression Programm der Firma InforMax. Beim Einsatz von subtraktiver Hybridisierung erfolgt nach der Isolierung der differentiell exprimierten Gene anhand herkömmlicher, dem Fachmann geläufiger Verfahren wie Klonierung und anschließende Sequenzierung (siehe z.B. Sambrook and Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory (2001), New York und Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1998), New York) ein Sequenzabgleich in einer Datenbank wie z.B. Gene-Bank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

[0053] Die Expression in der Zielzelle unterscheidet sich im Vergleich zur Expression in einer Kontrollzelle. In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Expression in der Zielzelle im Vergleich zur Expression in einer Kontrollzelle erhöht, vorzugsweise mindestens um einen Faktor 1,5. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Expression in der Zielzelle im Vergleich zur Expression in einer Kontrollzelle um mindestens einen Faktor 5 erhöht, und in einer am meisten bevorzugten Ausführungsform ist die Expression nur in der Zielzelle, jedoch nicht in der Kontrollzelle nachweisbar.

[0054] Der Begriff „Design von Ribonukleinsäure Molekülen, die an Ribonukleinsäure Moleküle aus Schritt a) binden und sie funktionell inaktivieren“ umfasst im Sinne der vorliegenden Erfindung die Verwendung von RNA-inaktivierenden-DNA-Enzymen (DNAzymen) und/oder Small-Interfering-RNA (siRNA), die Ribonukleinsäure Moleküle funktionell inaktivieren.

[0055] Der Begriff DNAzyme umfasst dabei erfindungsgemäß DNA-Moleküle, die die Ziel-Sequenz der Nukleinsäure, sowohl DNA als auch RNA, spezifisch erkennen und spalten.

[0056] Ein generelles DNAzyme-Modell stellt das „10-23“-Modell dar. DNAzyme des 10-23-Modells – auch als „10-23 DNAzyme“ bezeichnet – besitzen eine katalytische Domäne von 15 Desoxyribonukleinsäuren, welche von zwei Substratbindungsdomänen flankiert wird. Die Länge der Substratbindungsdomänen ist variabel, sie sind entweder gleich oder unterschiedlich lang. In einer bevorzugten Ausführung, beträgt die Länge der Substratbindungsdomänen zwischen 6 und 14 Nukleotide. In einer besonders bevorzugten Ausführung sind die Substratbindungsdomänen vollständig komplementär zu der Region, die die Spaltstelle flankiert. Um die Ziel RNA zu binden und sie zu spalten, muss das DNAzyme jedoch nicht unbedingt vollständig komplementär sein. In vitro Untersuchungen zeigen, dass DNAzyme des 10-23 Typs die Ziel mRNA an Purin-Pyrimidin Abfolge-Sequenzen spalten.

[0057] Um die DNAzyme in der Behandlung von Krankheiten zu verwenden, ist es bevorzugt, dass die DNAzyme so gut wie möglich gegen Degradation im Körper (im Blut, im intrazellulären Milieu usw.) stabilisiert sind. Eine bevorzugte Ausführung ist die Einführung einer 3'-3'-Inversion an einem oder mehreren Enden des DNAzymes. Der Begriff 3'-3'-Inversion bezeichnet eine kovalente Phosphatbindung zwischen den 3'-Kohlenstoffen des terminalen Nukleotids und des angrenzenden Nukleotids. Dieser Typ von Bindung steht im Gegensatz zu der normalen Phosphatbindung zwischen den 3' und 5' Kohlenstoffen von aufeinander folgenden Nukleotiden. Dementsprechend wird bevorzugt, dass das Nukleotid am 3'-Ende der an das 3'-Ende der katalytischen Domäne angrenzenden Substratbindungsdomäne invers ist. Zusätzlich zu den Inversionen können die DNAzyme modifizierte Nukleotide oder Nukleotid-Verbindungen enthalten. Modifizierte Nukleotide beinhalten z.B. N3'-P5'-Phosphoramidat Verbindungen, 2'-O-Methyl-Substitutionen und Peptid-Nukleinsäure-Verbindungen. Ihre Herstellung ist dem Fachmann geläufig.

[0058] Obwohl die potentiellen DNAzyme-Schnittstellen ubiquitär vorkommen, sind diese oft durch die sekundäre Struktur der RNA blockiert und somit den DNAzymen unzugänglich. Daher werden aus einem Pool an DNAzymen diejenigen selektioniert, deren Schnittstellen frei zugänglich sind. Diese selektionierten DNAzyme sind aktiv, spalten die Ziel-mRNA und inaktivieren sie somit funktionell. Die Effizienz der Spaltung der mRNA durch die einzelnen DNAzyme wird entweder durch Einzeltestung jedes DNAzymes oder durch gekoppelte Testung mehrerer DNAzyme in „Multiplex-Assays“ (beschrieben z. B. in Cairns et al., 1999) gezeigt.

[0059] Der Begriff siRNA umfasst erfindungsgemäß doppelsträngige, 21-23 Basen lange RNA-Moleküle, die zu einer spezifischen Degradation der komplementären Ziel-mRNAs sowohl in vitro als auch in vivo führen. Es ist dem Fachmann anhand der Literatur (z.B. <http://www.mpibpc.gwdg.de/abteilungen/100/105/index.html>) bekannt, ausgehend von der Ziel-mRNA Sequenz siRNA-Moleküle herzustellen.

[0060] Die Wahrscheinlichkeit, dass sich unter drei ausgewählten siRNA-Molekülen mindestens ein hochaktives (Inhibition der Ziel-RNA um mindestens 80%) befindet wird in der Literatur mit mindestens 70% angegeben. Es werden aus einem Pool an siRNA-Molekülen diejenigen selektioniert, die zu einer spezifischen Dege-

neration der komplementären Ziel-mRNA sowohl in vitro als auch in vivo führen.

[0061] Der Begriff „Einbringen der spezifischen Ribonukleinsäure Moleküle aus Schritt b) in Zielzellen“ umfasst im Sinne der vorliegenden Erfindung die Transfektion von Vektoren, insbesondere Plasmide, Cosmide, Viren oder Bakteriophagen, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen spezifischen Ribonukleinsäuremoleküle enthalten, in die Zielzellen. Vorzugsweise sind die Vektoren zur Transformation tierischer und humaner Zellen geeignet und erlauben die Integration der erfindungsgemäßen Ribonukleinsäuremoleküle. Verfahren zur Transfektion wie z.B. Lipofektion mittels DMRIE-C der Firma Invitrogen sind dem Fachmann aus der Literatur bekannt. Grundsätzlich sind dafür auch liposomale Vektoren geeignet. Die Zielmoleküle sind Transkriptionsfaktoren, Zellen, die Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren sezernieren, aber auch Zellen, die auf der Oberfläche der exprimierten Rezeptoren tragen.

[0062] Als Kontrollzellen im Sinne der Erfindung werden gesunde Zellen des Zielgewebes, typgleiche Zellen aus anderen Kompartimenten desselben Patienten oder auch aus gesunden Individuen herangezogen.

[0063] Die Kultivierung der Zielzelle erfolgt in Nährmedien, die den Bedürfnissen der Zielzelle nach pH-Wert, Temperatur, Salzkonzentration, Antibiotika, Vitaminen, Spurenelementen und Belüftung entsprechend angepasst sind.

[0064] Der Begriff Patient bezieht sich gleichermaßen auf Menschen und Wirbeltiere. Damit kann das Arzneimittel in der Human- und Veterinärmedizin verwendet werden.

[0065] Der Begriff „Formulierung der spezifischen Ribonukleinsäure Moleküle aus Schritt b) oder einer Zielzelle aus Schritt c) in einem Arzneimittel“ umfasst pharmazeutisch akzeptable Kompositionen, die Modifikationen und "Prodrugs" beinhalten, sofern sie nach zuverlässiger medizinischer Beurteilung keine übermäßige Toxizität, Irritationen oder allergische Reaktionen am Patienten auslösen. Der Terminus "Prodrug" bezieht sich auf Verbindungen, die zur Verbesserung der Aufnahme transformiert werden, wie beispielsweise durch Hydrolyse im Blut.

[0066] Bevorzugter Weise ermöglicht die Formulierung, dass die spezifischen Ribonukleinsäure Moleküle den Patienten in Form einer pharmazeutisch akzeptablen Komposition entweder oral, rektal, parenteral, intravenös, intramuskulär oder subkutan, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, intrathekal, intravasculär, lokal (Puder, Salbe oder Tropfen) oder in Sprayform verabreicht werden.

[0067] Dosierungsformen für die örtliche Administration des Arzneimittels dieser Erfindung schließen Salben, Puder, Sprays oder Inhalationsmittel ein. Die aktive Komponente wird unter sterilen Bedingungen mit einem physiologisch akzeptablen Trägerstoff und möglichen Preservativen, Puffern oder Treibmitteln, je nach Bedarf, vermischt.

[0068] Die Art der Dosierung wird vom behandelnden Arzt entsprechend den klinischen Faktoren bestimmt. Es ist dem Fachmann bekannt, dass die Art der Dosierung von verschiedenen Faktoren wie z.B. Körpergröße, Gewicht, Körperoberfläche, Alter, Geschlecht oder der allgemeinen Gesundheit des Patienten abhängig ist, aber auch von dem speziell zu verabreichenden Mittel, der Dauer und Art der Verabreichung und von anderen Medikamenten, die möglicherweise parallel verabreicht werden.

[0069] Das mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte Arzneimittel weist eine hohe Patienten-, Krankheits-, Stadien- bzw. Phasenspezifität auf. Es bewirkt eine Zell-spezifische Intervention und ist spezifisch für Kompartimente und Organe. Es entstehen keine oder nur sehr geringe Reaktionen des Immunsystems gegen das Arzneimittel, und das Nebenwirkungsprofil steht in einem akzeptablen Verhältnis zu Schweregrad, Prognose und Verlauf der Erkrankung.

[0070] Das Arzneimittel kann zur Therapie gegen sämtliche Erkrankungsgruppen, die mit chronischen Entzündungen einhergehen, wie z.B. Autoimmunerkrankungen, Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises (Manifestationen an u. a. Haut, Lunge, Niere, Gefäßsystem, Nervensystem, Bindegewebe, Bewegungsapparat, Endokrines System), Allergische Soforttypreaktionen und Asthma, Chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen (COPD), Arteriosklerose, Psoriasis und Kontaktekzem sowie gegen chronische Abstoßungsreaktionen nach Organ- und Knochenmarkstransplantation angewendet werden.

Ausführungsbeispiel

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1: GATA-3

a) Identifikation von Ribonukleinsäure Molekülen, deren Expression in einer Zielzelle sich im Vergleich zur Expression einer Kontrollzelle unterscheidet

- i) Als Zielzellen werden die für die Entstehung von chronischen Entzündungsreaktionen verantwortlichen naiven CD4⁺ Zellen verwendet.
- ii) Die CD4⁺ Zielzellen werden über Magnetic Beads (Firma Miltenyi (Macs-System) Dynal (DynaBeads) oder BD-Bioscience (iMAG) isoliert, alternativ mittels Fluoreszenz-markierter Antikörper an Zellsortern beispielsweise der Firmen Cytomation (MOFLO) oder BD-Bioscience (FACS-Vantage).
- iii) Isolierung der RNA erfolgt nach Standard-Methode, siehe Sambrook and Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory (2001), New York und Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1998), New York. Alternativ wird ein RNeasy Kit der Firma Qiagen verwendet, oder es erfolgt direkte Isolierung der mRNA aus CD4⁺Zielzellen mit Oligotex mRNA Kit der Firmen Qiagen nach Herstellerangaben.
- iv) Die Identifizierung von mRNAs, die differentiell unterschiedlich sind, d.h. mRNAs, deren Expression in der Zielzelle gegenüber der Kontrollzelle erhöht ist, erfolgt mittels Genchips (z.B. MWG, CLONTECH)], und die Identifizierung der differentiell exprimierten Gene mittels Vector Xpression Programm der Firma Infor-Max.

[0071] Filter-Hybridisierungsverfahren (z. Bsp. Unigene) nach Herstellerangaben. Der Isolierung der differentiell exprimierten Gene schließt sich Klonierung, Sequenzierung (nach Standardvorschriften siehe z.B. Sambrook and Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory (2001) und der Sequenzabgleich in der Gene-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) an.

[0072] Die Expression von GATA-3 unterscheidet sich in der Zielzelle (TH2-Zelle) im Vergleich zur Expression in einer Kontrollzelle (beispielsweise Th0-Zelle).

b) Design von spezifischen Ribonukleinsäure Molekülen, die an Ribonukleinsäure Moleküle aus Schritt a) binden und sie funktionell inaktivieren

[0073] [Fig. 3](#) zeigt den erfindungsgemäßen Pool hgd 1 bis hgd 70 an spezifischen DNAzymen gegen GATA-3 mRNA. Die DNAzyme weisen eine Gesamtlänge von 33 Nukleotiden auf, wobei die zentrale katalytische Domäne 15 Nukleotiden (in kleingeschriebenen Buchstaben) der katalytischen Domäne des bekannten 10-23 DNAzyme ([Fig. 2](#)) entspricht. Diese katalytische Domäne wird von zwei aus jeweils 9 Nukleotiden bestehenden rechten und linken Substratbindungsdomänen (in großgeschrieben Buchstaben) flankiert. Die Nukleotidsequenz der rechten und linken Substratbindungsdomäne ist unterschiedlich und variiert bei den DNAzymen hgd 1 bis hgd 70, so dass eine unterschiedlich spezifische Bindung mittels Watson-Crick Paarung an die GATA-3 mRNA erfolgt.

[0074] [Fig. 2](#) zeigt das allgemeine Modell zur Bindung des 10-23 DNAzyme an eine mit N markierte beliebige Ziel RNA, wobei der Pfeil auf die Spaltstelle in der Ziel mRNA hinweist.

[0075] DNAzyme können die Ziel-mRNA zwar an jeder Purin-Pyrimidin Sequenz spalten, aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass Purin-Uracil-Bindungen effektiver gespalten werden als Purin-Cytosin-Bindungen. Deshalb werden vorzugsweise DNAzyme konstruiert, die an Purin-Uracil-Bindungen spalten.

[0076] Das in [Fig. 2](#) gezeigte Modell kann in seiner Funktionsweise auf die Bindung der DNAzyme hgd 1 bis hgd 70 an GATA-3 mRNA übertragen werden.

[0077] Die DNAzyme hgd 1 bis hgd 70 werden für in vitro Versuche unmodifiziert eingesetzt, für Versuche in Zellkultur mit Modifikationen versehen (käuflich erworben durch Firma Eurogentec).

[0078] Als Modifikationen zur Stabilisierung und Schutz werden eingesetzt:

- 1) Ein stabilisierendes inverses Thymidin am 3'-Ende
- 2) eine FAM-Markierung am 5'-Ende zur Beurteilung der Transfektionseffizienz der Zellen mittels

FACS-Analyse.

[0079] Um die DNAzyme in vitro zu testen, wird GATA-3 mRNA benötigt, die durch in vitro Transkription hergestellt wird. Die einzelnen Schritte sind wie folgt:

- RNA-Isolierung aus humanem EDTA-Vollblut mittels QIAamp-RNA-Blood-Mini-Kit (Qiagen, Deutschland) nach Herstellerangaben
- reverser Transkription mit den Primern:
Forward-Primer GGCGCCGTCTTGATACTTT
Revers-Primer CCGAAAATTGAGAGAGAAGGAA, wobei ein PCR-Produkt mit einer Länge von 2731 Nukleotiden amplifiziert wird (JumpStart Accu Taq DNA Polymerase, Sigma).

[0080] PCR Bedingungen: Initiale Denaturierung (96°C, 30 Sek.) Amplifikation mit 40 Zyklen (94°C, 15 Sek.; 48°C, 30 Sek.; 68°C, 3 Min.), Final Extention (68°C, 30 Min).

[0081] Das PCR-Produkt wird mittels Standardverfahren in das Plasmid pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und zur Überprüfung sequenziert. Die Herstellung von GATA-3 mRNA erfolgt nach Linearisierung des GATA-3 enthaltenden Plasmids pCR2.1 durch Spaltung mit dem Restriktionsenzym Spe 1 durch in vitro Transkription nach Herstellerangaben (Ambion). GATA-3 mRNA liegt mit einer Länge von insgesamt 2876 Nukleotiden vor.

[0082] [Fig. 4](#) zeigt die bekannten Nukleotidsequenzen humaner GATA-3-Gene aus Datenbankeinträgen [PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>)], wobei divergente Basen grau unterlegt sind. Sequenz 1: Humanes GATA-3 aus Datenbank Nr.: XM_043124, Sequenz 2: Humanes GATA-3 aus Datenbank Nr.: X58072, Sequenz 3: Humanes GATA-3 (isoliert aus Plasmid pCR2.1).

[0083] Die GATA-3 mRNA Sequenzen unterscheiden sich bezüglich der Länge der 3'-untranslatierten oder 5'-untranslatierten Enden voneinander. Um die exakte Gesamt-Sequenz der mRNA zu erhalten, werden zur Primerselektion die mRNA Sequenzen der Einträge Nr.: XM_043124 und X58072 verwendet. Die Primerlokalisationen für die Klonierung von GATA-3 sind in [Fig. 4](#) als Unterstreichung hervorgehoben. [Fig. 4](#) zeigt weiterhin ein Alignment der Nukleinsäuresequenz von GATA-3 aus der Datenbank (Sequenz 1 und 2) mit der aus Plasmid pCR2.1 sequenzierten Nukleotidsequenz (Sequenz 3). Dabei zeigt sich, dass die Sequenzen nicht vollkommen identisch, sondern einzelne Basen unterschiedlich sind. Die Nukleinsäuresequenz 3 von GATA-3 aus [Fig. 4](#) bildet erfindungsgemäß die Grundlage für die Konstruktion von DNAzymen gegen GATA-3 mRNA.

[0084] [Fig. 4A](#) zeigt die Nukleotidsequenz der Sequenz 3 des humanen GATA-3-Gen aus [Fig. 4](#) und darin als graue Hinterlegung eingezeichnet jeweils zwei Nukleotide GT bzw. AT, zwischen denen weitere potentielle Schnittstellen für DNAzyme liegen.

[0085] Die in vitro Spaltungsexperimente von GATA-3 mRNA mit den DNAzymen (hgd1-hgd70) werden in einem Volumen von 10 µl folgender Reaktionszusammensetzung durchgeführt: 50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0,25 µM DNAzyme und 0,025 µM in vitro transkribierte GATA-3 mRNA (in einem Substrat zu DNAzyme Verhältnis von 1:10). Die Reaktionen werden bei 37°C für die jeweils angegebenen Zeiten inkubiert. Durch die Zugabe von Formamid- und EDTA-haltigem RNA-Sample-Loading-Buffer (Sigma) wird die Reaktion gestoppt. Die denaturierten Proben werden in 1,3 %igen TAE-Agarose-Gelen aufgetrennt und im UV-Transilluminator analysiert.

[0086] [Fig. 5](#) zeigt als Ergebnis der Gelelektrophorese die Spaltung der GATA-3 Ziel-mRNA mit nicht modifiziertem DNAzyme [hgd11 (Spur 2), hgd13 (Spur 4), hgd17 (Spur 6), hgd40 (Spur 8)] und modifizierten DNAzymen [hgd11-M (Spur 3), hgd13-M (Spur 5), hgd17-M (Spur 7), hgd40-M (Spur 9)]. Spur 1 enthält als Kontrolle mRNA ohne DNAzym-Zugabe. Die modifizierten DNAzyme sind mit einem zusätzlichen M gekennzeichnet. Ein mitgeführter Längenstandard (nicht dargestellt) zeigt Bandengrößen von 1000 bp, 2000 bp und 3000 bp. Pfeile zeigen auf S, die Bande mit dem Substrat (hier GATA-3-mRNA) und die Spaltprodukte P1 und P2.

[0087] Der Vergleich zwischen allen 70 DNAzymen zeigt, dass hgd11, hgd13, hgd17 und hgd40 besonders aktiv sind, die Modifikationen die Effektivität der DNAzyme hgd11, hgd13 und hgd17 herabsetzt, nicht jedoch die Effektivität des DNAzymes hgd40.

[0088] Die folgende Tabelle zeigt die Einteilung der DNAzyme hgd 1 bis hgd 70 gegen GATA-3 mRNA in 4 Gruppen. Diese Gruppeneinteilung erfolgt aufgrund durchgeführten in-vitro Aktivitätstestungen der DNAzyme gegen GATA-3 mRNA. Gruppe 1: hohe Spaltungsaktivität, Gruppe 2: mittlere Spaltungsaktivität, Gruppe 3: schwache Spaltungsaktivität und Gruppe 4: keine messbare Spaltungsaktivität.

Gruppe	hgd	Aktivität gegen GATA-3 mRNA
1	11, 13, 17, 40	Hohe Spaltungsaktivität
2	10, 12, 16, 18, 23, 31, 36, 37, 39, 52, 57, 58, 63, 70	Mittlere Spaltungsaktivität
3	22, 24, 25, 34, 35, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 54, 55, 56, 57	Schwache Spaltungsaktivität
4	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 19, 20, 21, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 38, 44, 51, 53, 59, 60, 61, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 69	Keine Spaltungsaktivität

c) Einbringen der spezifischen Ribonukleinsäure Moleküle aus Schritt b) in Zielzellen

[0089] Die hoch aktiven DNAzyme hgd11, hgd13, hgd17 und hgd40 werden mit und ohne die beschriebenen Modifikationen in Zielzellen verwendet.

[0090] Dazu werden Jurkat E6.1 Zellen (human acute T cell leukemia Cells) im RPMI-Medium mit 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 10% FKS bei 37°C in befeuchteter 5 %iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Die Transfektionen werden in 6-Wellplatten durchgeführt. Hierfür werden 2×10⁶ Jurkat E6.1 Zellen in Opti-MEM-I-Zellkulturmedium (Invitrogen) überführt und mittels DMRIE-C (Invitrogen) mit den modifizierten DNAzymen (0,3 µM) transfiziert (nach Herstellerangaben der Firma Invitrogen). Nach 10 Stunden Inkubation im Brutschrank unter obigen Bedingungen wird RPMI-Medium (mit den oben angegebenen Zusätzen) hinzu gegeben und die Inkubation für weitere 14 Stunden fortgesetzt. Die Zellen werden mit Opti-MEM-Medium gewaschen und anschließend erneut nach dem oben beschriebenen Protokoll transfiziert. Nach jeder Transfektion wird die Transfektionseffizienz mittels FACS-Analyse beurteilt.

[0091] Anschließend wird die Aktivität der DNAzyme durch Nachweis der GATA-3 Proteinmenge im Westernblot überprüft (siehe [Fig. 6](#)).

[0092] Für Westernblot-Analysen werden die zytoplasmatischen Proteine und die Kernproteine mittels Protein-Extraction-Kit nach Herstellerangaben (Pierce) getrennt aufgearbeitet. Die Proteinkonzentration wird mit dem BCA-Kit (Pierce) bestimmt. Die Auftrennung von jeweils 30 µg Protein erfolgt mittels denaturierender Gel-Elektrophorese in 10 %igen SDS-Polyacrylamide-Gelen. Die Proteine werden anschließend nach Standardverfahren auf Nitrocellulose-Membranen geblottet. Die Membranen werden mit 5 % Magermilchpulver in PBS (mit 0,01 % Tween 20) geblockt und anschließend mit Maus-Anti-GATA-3 Antikörpern (Santa Cruz) (1:500) und darauf folgend mit HRP-gekoppelten Maus-Anti-Kaninchen Antikörpern (BD Biosciences) (1:2000) für jeweils eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteine werden mittels Chemilumineszenz visualisiert. Durch den parallelen Nachweis von Beta-Aktin auf den Blots werden Variationen in der Protein-Auftragsmenge kontrolliert. Dafür wird auf der Nitrozellulose-Membran zuerst GATA-3 detektiert. Anschließend wird dieselbe Membran über Nacht in einer feuchten Kammer belassen. Nach 2 maligem Waschen mit PBS erfolgt der Nachweis von β-Aktin durch Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern (Maus-anti-Human Beta-Aktin Antikörper (Sigma)).

[0093] [Fig. 6](#) zeigt das Resultat des Immunblot mit dem Ergebnis der Aktivität der DNAzyme in Zellen. Jurkat E6.1 Zellen werden mittels Lipofektion mit DNAzymen (Spur 4=hgd11-M, Spur 5=hgd13-M, Spur 6=hgd17-M, Spur 7=hgd40-M) transfiziert. Als Kontrollen werden nicht behandelte (Spur 1), nur mit Transfektionsmedium (Spur 2), beziehungsweise mit DNAzymen ohne Transfektionsmedium (Spur 3) behandelte Zellen eingesetzt. Nach 48h Inkubation werden die solubilisierten Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und GATA-3 (A) durch Immunblot mit spezifischen Antikörpern detektiert. Um zu bestätigen, dass in jeder Spur die gleiche Menge an Protein eingesetzt wird, erfolgt auf der gleichen Blot-Membran eine Immunfärbung mit β-Aktiv (B). Ein mitgeführter Längenstandard (nicht dargestellt) zeigt Proteinbanden der Größe 63,8 kDa, 49,5 kDa und 37,4 kDa.

[0094] Es zeigt sich, dass die DNAzyme hgd11, hgd13 und hgd17 in vivo nicht aktiv sind, wohingegen das

DNAzyme hgd40 die GATA-3 Expression auch in vivo inhibiert. Die spezifische Inhibition der GATA-3 Expression in vivo durch das DNAzyme hgd40 stellt somit ein effektives therapeutisches Werkzeug zur Behandlung von chronisch entzündlichen Erkrankungen dar.

d) Formulierung der spezifischen Ribonukleinsäure aus Schritt b) und/oder einer Zielzelle aus Schritt c) in einem Arzneimittel

[0095] Die Analyse verschiedener DNAzyme mit für GATA-3 spezifischer Substratbindedomäne zeigt, dass DNAzyme hgd40 die GATA-3 Expression in vivo spezifisch inhibiert und als spezifische Ribonukleinsäure zur Herstellung eines Zell- und/oder Gewebe- und/oder Krankheitsphasen-spezifischen Arzneimittels geeignet ist. Dazu wird hgd40 (5'-GTGGATGGAggctagctacaacgaGTCTTGGAG) oder mit hgd40 transfizierte Zellen in einer pharmazeutischen Komposition mit einem pharmazeutisch akzeptablen Carrier beispielsweise Liposome oder bioabbaubare Polymere versehen.

[0096] Alternativ zu den DNAzymen wird zur spezifischen Inhibition der GATA-3 Expression und zur Herstellung eines Zell- und/oder Gewebe- und/oder Krankheitsphasen-spezifischen Arzneimittels der Einsatz von zu siRNA vorgeschlagen.

[0097] Vorzugsweise wird siRNA zur Inhibition von Maus und humanem GATA-3 eingesetzt. Die Herstellung der siRNA ist dem Fachmann bekannt und in der Literatur beschrieben. Beispiele für siRNA Sequenzen sind unten aufgeführt:

Quelle	Nukleinsäuresequenzen
Maus GATA-3	Sense-Strang: CAUCGAUGGUCAAGGCAACdTdT Antisense-Strang: GUUGCCUUGACCAUCGAUGdTdT
Humane GATA-3 Sequenz 1	Sense-Strang: CAUCGACGGUCAAGGCAACdTdT Antisense-Strang: GUUGCCUUGACCGUCGAUGdTdT
Humane GATA-3 Sequenz 2	Sense-Strang: AAGAGUGCCUCAAGUACCAAdTdT Antisense-Strang: UGGUACUUGAGGCACUCUUdTdT
Humane GATA-3 Sequenz 3	Sense-Strang: AGCUUCACAAUAUUAACAGdTdT Antisense-Strang: CUGUUAUAUUGUGAAGCUdTdT
Humane GATA-3 Sequenz 4	Sense-Strang: UGACUCACUGGAGGACUUCdTdT Antisense-Strang: GAAGUCCUCCAGUGAGUCAdTdT

Beispiel 2: DNAzyme gegen T-bet

a) Identifikation von Ribonukleinsäure Molekülen, deren Expression in einer Zielzelle sich im Vergleich zur Expression einer Kontrollzelle unterscheidet

[0098] Die Identifikation erfolgt nach dem oben beschriebenen Vorgehen.

[0099] Die Expression von T-bet in der Zielzelle (Th1-Zelle) unterscheidet sich im Vergleich zur Expression in einer Kontrollzelle (Th0-Zelle).

b) Design von spezifischen Ribonukleinsäure Molekülen, die an Ribonukleinsäure Moleküle aus Schritt a) binden und sie funktionell inaktivieren

[0100] Die Identifikation von Schnittstellen zur Spaltung von T-bet erfolgt wie für GATA-3 beschrieben.

[0101] [Fig. 7](#) zeigt den erfindungsgemäßen Pool td1-td78 an spezifischen DNAzymen gegen T-bet mRNA. Die DNAzyme weisen eine Gesamtlänge von 33 Nukleotiden auf, wobei die zentrale katalytische Domäne aus 15 Nukleotiden (in kleingeschriebenen Buchstaben) der katalytischen Domäne des bekannten 10-23 DNAzyme ([Fig. 2](#)) entspricht. Diese katalytische Domäne wird von zwei, aus jeweils 9 Nukleotiden bestehenden rechten und linken Substratbindungsdomäne (in großgeschrieben Buchstaben) flankiert. Die Nukleotidsequenz der rechten und linken Substratbindungsdomäne ist unterschiedlich und variiert bei den DNAzymen td1 bis td78, so dass eine unterschiedlich spezifische Bindung mittels Watson-Crick Paarung an die T-bet mRNA erfolgt.

[0102] Da aus der Literatur bekannt ist, dass DNAzyme die Ziel-mRNA an Purin-Uracil-Bindungen effektiver spalten als Purin-Cytosin-Bindungen, werden vorzugsweise DNAzyme konstruiert, die an Purin-Uracil-Bindungen spalten.

[0103] Das in [Fig. 2](#) gezeigte Modell kann in seiner Funktionsweise auf die Bindung der DNAzyme td1 bis td78 an T-bet mRNA übertragen werden.

[0104] Die DNAzyme td1 bis td78 werden für in vitro Versuche unmodifiziert eingesetzt, für Versuche in Zellkultur mit für GATA-3 genannten Modifikationen versehen.

[0105] Zur Darstellung der Spaltungseigenschaften der DNAzyme und funktionellen Inaktivierung der Ziel mRNA der T-bet mRNA erfolgt in vitro Transkription der T-bet-mRNA aus humanem EDTA Vollblut mittels QiAamp-RNA-Blood-Mini-Kit (Qiagen, Deutschland) nach Herstellerangaben.

[0106] [Fig. 8](#) zeigt die Nukleotidsequenz von humanem T-bet, wie es der Datenbankeinträgen [PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>)] Nr.: NM 013351, Sequenz 1 zu entnehmen ist.

[0107] Die reverse Transkription erfolgt mit dem Forward-Primer CGGCCCGCTGGAGAGGAAGC und Reverse-Primer CACACACCCACACACAACC nach Standardvorschrift (ThermoScript von Invitrogen), wobei ein PCR-Produkt mit einer Länge von 2450 Nukleotiden amplifiziert wird. Dieses PCR-Produkt wird mittels Standardverfahren in das Plasmid pBluescript-SK (Stratagene) kloniert und zur Überprüfung sequenziert.

[0108] [Fig. 8](#) zeigt einen Vergleich der Nukleinsäuresequenz von T-bet Nr.: NM_013351 (Sequenz 1) und sequenzierter Sequenz (Sequenz 2). Dabei zeigt sich das beide Sequenzen nicht vollkommen identisch sind, sondern einzelne Basen ausgetauscht sind. Die Nukleinsäuresequenz 2 von T-bet aus [Fig. 8](#) bildet in dieser Erfindung die Grundlage für die Konstruktion von DNAzymen gegen T-bet mRNA.

[0109] [Fig. 8A](#) zeigt die Nukleotidsequenz der Sequenz 1 des humanen T-bet-Gen aus [Fig. 8](#) und darin als graue Hinterlegung eingezeichnet jeweils zwei Nukleotide GT bzw. AT, zwischen denen weitere potentielle DNAzym-Schnittstellen liegen.

[0110] Die Herstellung von T-bet mRNA erfolgt nach Linearisierung des T-bet enthaltenden Plasmids pBluescript-SK durch Spaltung mit dem Restriktionsenzym Xba I (Fermentas) und durch in-vitro-Transkription nach Herstellerangaben (Ambion). T-bet mRNA liegt mit einer Länge von insgesamt 2550 Nukleotiden vor.

[0111] Die in vitro Spaltungsexperimente von T-bet mRNA mit den DNAzymen (td1 bis td78) werden entsprechend den Angaben zu GATA-3 durchgeführt und analysiert. [Fig. 9](#) zeigt als Ergebnis der Gelelektrophorese die Spaltung der T-bet Ziel-mRNA mit modifizierten DNAzymen [td54-M (Spur 3), td69-M (Spur 4), td70-M (Spur 5)]. Spur 2 enthält als Kontrolle T-bet Ziel-mRNA ohne DNAzym-Zugabe. Ein mitgeführter Längenstandard (Spur M) zeigt Bandengrößen von 2000 by und 3000 bp. Pfeile zeigen auf A, die Bande mit dem Substrat (hier T-bet mRNA) und auf B eines der beiden Spaltprodukte (das andere Spaltprodukt ist auf dieser Abbildung nicht zu sehen).

[0112] Der Vergleich zwischen allen 78 DNAzymen zeigt, dass td54, td69 und td70 besonders aktiv sind, die Modifikationen die Effektivität der DNAzyme nicht herabsetzen.

[0113] Die folgende Tabelle zeigt die Einteilung der DNAzyme td 1 bis td 78 gegen t-bet-3 mRNA in 4 Gruppen. Diese Gruppeneinteilung erfolgt aufgrund durchgeführter in-vitro Aktivitätstestungen der DNAzyme gegen t-bet mRNA. Gruppe 1: hohe Spaltungsaktivität, Gruppe 2: mittlere Spaltungsaktivität, Gruppe 3: schwache Spaltungsaktivität und Gruppe 4: keine messbare Spaltungsaktivität.

Gruppe	td	Aktivität gegen t-bet mRNA
1	54, 69, 70	Hohe Spaltungsaktivität
2	21, 24, 28, 29, 30, 45, 71, 72, 77, 78	Mittlere Spaltungsaktivität
3	13, 19, 22, 23, 25, 27, 31, 32, 44, 46, 47, 48, 50, 51, 53, 55, 56, 57, 58, 60, 61, 62, 65, 67, 68, 73, 74, 75	Schwache Spaltungsaktivität
4	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 26, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 49, 52, 59, 63, 64, 66, 76	Keine Spaltungsaktivität

c) Einbringen der spezifischen Ribonukleinsäure Moleküle aus Schritt b) in Zielzellen

[0114] Die DNAzyme td54, td69 und td70 werden mit und ohne die beschriebenen Modifikationen in Zielzellen verwendet. Die Angaben zur Transfektion von Jurkat E6.1 Zellen entsprechen denen zu dem Ausführungsbeispiel GATA-3.

[0115] Nach der Transfektion von Jurkat E6.1 Zellen wird die T-bet-mRNA Menge relativ zu GAPDH-mRNA Expression mittels Real-Time-PCR (LightCycler, Roche) quantitativ bestimmt, um Aussagen über die in vitro Effektivität der DNAzyme zu erhalten.

[0116] Für LightCycler-Analysen wird die RNA aus den Jurkat E6.1 Zellen mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen, Deutschland) gereinigt und nachfolgend photometrisch normalisiert. Nach reverser Transkription mit Superscript II (Gibco) laut Herstellerangaben, folgt die quantitative Analyse der T-bet- und GAPDH-mRNA im LightCycler. Das Gesamtvolumen für die PCR ist 20µl, darin enthalten sind 1 µl DNA, je 1 µl (0,5µM) Sense- und Antisense-Primer sowie 10µl QuantiTect-SYBR-Green-PCR-Master-Mix (Qiagen, Deutschland). Die verwendeten PCR-Primer für T-bet sind: Sense 5'-CCCACCATGTCCTACTACCG-3'; Antisense 5'-GCAATCTCAGTC-CACACCAA-3'. Die PCR-Primer für GAPDH sind: Sense 5'-TCTTCTTTGCGTCGCCAG-3' und Antisense 5'-AGCCCCAGCCTTCTCCA-3'. Die PCR Konditionen sind: Denaturierung (15min 95°C), Amplifikation (15sec 95°C, 25sec 59°C, 25sec 72°C von 50 Zyklen) dann Final-Extension 2min 72°C. Die anschließende Schmelzkurve wird folgendermaßen generiert: 0sec 95°C, 15sec 60°C dann wird die Temperatur in 0,2°C Schritten erhöht auf 97°C, gleichzeitig wird kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Die Schmelzkurve dient der internen Kontrolle, da alle PCR-Produkte eine spezifische Schmelztemperatur haben.

[0117] SYBR-Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff (enthalten im QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix), der an doppelsträngige DNA bindet. Wenn während der Extension die DNA verdoppelt wird, bindet SYBR-Green daran und generiert ein bindungsabhängiges Fluoreszenzsignal, welches vom LightCycler am Ende jeder Extension detektiert wird. Je höher die Menge an Ausgangsmaterial, desto früher wird die signifikante Erhöhung der Fluoreszenz detektiert. Die LightCycler Software stellt gesammelte Fluoreszenz-Intensitäten gegen die Zyklen graphisch dar.

[0118] In der [Fig. 10](#) sind T-bet- und GAPDH-mRNA LightCycler Amplifikationskurven nach der Behandlung von Jurkat E6.1 Zellen mit den DNAzyme td54m, td69m und td70m im Vergleich zu Nonsens-DNAzym behandelten, dargestellt.

[0119] Der jeweilige „Crossing Point“ (Ct), definiert als der PCR-Zyklus, bei dem sich die Fluoreszenz zum erstmals signifikant von der Hintergrund-Fluoreszenz unterscheidet, wird manuell mit der Fit-Point Methode der LightCycler Software bestimmt. Die relative Quantifizierung von T-bet- und GAPDH-mRNA in mit DNAzymen behandelten Zellen im Vergleich zu Nonsense-DNAzym behandelten Zellen wird nach der im User Bulletin #2 (ABI Prism 7700 Sequence detection System User Bulletin #2 (2001) Relative quantification of gene expression <http://docs.appliedbiosystems.com/pebi/docs/04303859.pdf>) beschriebenen Anleitung durchgeführt. Dabei werden die Menge an T-bet-mRNA aus dem Kontrollversuch gleich 100% gesetzt. Die Daten der relativen Quantifizierung sind in der [Fig. 11](#) graphisch dargestellt.

[0120] Im Vergleich zur Nonsense-DNAzym Behandlung zeigt sich, dass das td69m-DNAzyme zu einer Suppression von 81,3% und das td70m-DNAzyme zu einer Suppression von 81,0% führt, wohingegen das td54m-DNAzym keinen suppressiven Effekt auf T-bet mRNA hat.

[0121] Das bedeutet, dass das td54m-DNAzym in vivo nicht aktiv ist, wohingegen td69m- und td70m-DNAzyme auch im zellulären Milieu die mRNA von T-bet inaktiveren. Die spezifische Reduktion der T-bet mRNA in vivo durch die DNAzyme td69m und td70m stellt somit ein effektives therapeutisches Werkzeug zur Behandlung von chronisch entzündlichen Erkrankungen dar.

d) Formulierung der spezifischen Ribonukleinsäure aus Schritt b) und/oder einer Zielzelle aus Schritt c) in einem Arzneimittel

[0122] Die Analyse verschiedener DNAzyme mit für T-bet spezifischer Substratbindedomäne zeigt, dass DNAzyme td69 und td70 die T-bet Expression in vivo spezifisch inhibieren und als spezifische Ribonukleinsäure zur Herstellung eines Zell- und/oder Gewebe- und/oder Krankheitsphasen-spezifischen Arzneimittels geeignet sind.

[0123] Dazu wird td69 (GGCAATGAaggctagctacaacgaTGGGTTTCT) oder td70 (TCACGGCAaggctagctacaacgaGAACTGGGT) oder mit td69m bzw. td70m transfizierte Zellen in einer pharmazeutischen Komposition mit einem pharmazeutisch akzeptablen Carrier beispielsweise Liposome oder bioabbaubare Polymere versehen.

[0124] Alternativ zu den DNAzymen wird zur spezifischen Inhibition der T-bet Expression und zur Herstellung eines Zell- und/oder Gewebe- und/oder Krankheitsphasenspezifischen Arzneimittels der Einsatz von siRNA vorgeschlagen.

[0125] Vorzugsweise handelt es sich um siRNA zur Inhibition von humanem T-bet. Die Herstellung der siRNA ist dem Fachmann bekannt und in der Literatur beschrieben. Ein Beispiel für siRNA Sequenzen:

Quelle	Nukleinsäuresequenzen
Human T-bet	Sense-Strang: UCAGCACCAGACAGAGAUGdTdT Antisense-Strang: CAUCUCUGUCUGGUGCUGAdTdT

[0126] Dem Fachmann ist ersichtlich, dass mit dem Wissen der vorliegenden Erfindung auch leicht spezifische DNAzyme bzw. siRNAs als Arzneimittel bei chronisch entzündlichen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen herstellbar sind, die gegen weitere Transkriptionsfaktoren gerichtet sind, die eine Rolle bei der Differenzierung zu TH1- beziehungsweise TH2-Zellen spielen beispielsweise STAT4, STAT5a, STAT1, c-Rel, CREB2, ATF-2, ATF-2, Hlx, IRF-1, c-Maf, NFAT, NIP45, AP1, MeI-18, SKAT-2, CTLA-4 oder die gegen weitere Faktoren der Signaltransduktionswege zur Differenzierung und/oder Expression von Zytokinen gerichtet sind, beispielsweise Src kinase, Tec kinase, Rlk (Txk im Menschen), Itk, Tec, RIBP, PLCγ, MAP kinase, ERK, JNK, P38, MKK, MKK1, MKK2, MKK3, MKK4, MKK6, MKK7, Rac2, GADD45, GADD45β, GADD45γ, SOCS, CIS, SOCS1, SOCS2, SOCS3, JAK, JAK1, JAK3, NIP45.

[0127] Diese Proteine weisen eine Expression auf, die in einer Zielzelle im Vergleich zur Expression einer Kontrollzelle erhöht ist.

SEQUENCE LISTING

<110> TransMIT Gesellschaft für Technologietransfer mbH
 <120> Verfahren zur Herstellung eines Zell- und/oder Gewebe- und/oder
 Krankheitsphasen-spezifischen Arzneimittels
 <130> unknown
 <140> DE 10346487.5
 <141> 2003-10-02
 <160> 153
 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> hgd1 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

 <400> 1
 tcggtcagag gctagctaca acgatgcggt gct 33

 <210> 2
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> hdg2 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

 <400> 2
 ggcgtacgag gctagctaca acgactgctc ggt 33

 <210> 3
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> hgd3 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

 <400> 3
 ggcggcgtag gctagctaca acgagacctg ctc 33

 <210> 4
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> hgd4 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 4
 ctcgggtcag gctagctaca acgactgggt agc 33

<210> 5
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd5 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 5
 tcctctgcag gctagctaca acgacggggt cct 33

<210> 6
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd6 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 6
 actctgcaag gctagctaca acgatctgcg agc 33

<210> 7
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd7 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 7
 gggcgacgag gctagctaca acgatctgca att 33

<210> 8
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd8 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 8
 aaggggacgag gctagctaca acgagactct gca 33

<210> 9
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd9 DNAzyme against GATA-3mRNA

<222> (1)..(33)

<400> 9
aaaacgggag gctagctaca acgacagggtt gta 33

<210> 10
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> hgd10 DNAzyme against GATA-3mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 10
agaataaaaag gctagctaca acgagggacc agg 33

<210> 11
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> hgd11 DNAzyme against GATA-3mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 11
atggcagaag gctagctaca acgaaaaacg gga 33

<210> 12
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> hgd12 DNAzyme against GATA-3mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 12
aactgggtag gctagctaca acgaggcaga ata 33

<210> 13
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> hgd13 DNAzyme against GATA-3mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 13
atccaaaaag gctagctaca acgatgggta tgg 33

<210> 14
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> hgd14 DNase against GATA-3mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 14
aggggaag gctagctaca acgaaaaat cca 33

<210> 15
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> hgd15 DNase against GATA-3mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 15
tttataaag gctagctaca acgatattt gga 33

<210> 16
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> hgd16 DNase against GATA-3mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 16
gtgggggag gctagctaca acgaggaag gct 33

<210> 17
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> hgd17 DNase against GATA-3mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 17
gttgaatgag gctagctaca acgattgctt tcg 33

<210> 18
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> hgd18 DNase against GATA-3mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 18
gtcgttgaag gctagctaca acgagattg ctt 33

<210> 19
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd19 DNase against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)
 <400> 19
 ggcccggaag gctagctaca acgaccgcg gcg 33

<210> 20
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd20 DNase against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)
 <400> 20
 tcacctccag gctagctaca acgaggcctc ggc 33

<210> 21
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd21 DNase against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)
 <400> 21
 ccgccgtcag gctagctaca acgactccat ggc 33

<210> 22
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd22 DNase against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)
 <400> 22
 ggtggctcag gctagctaca acgaccagcg cgg 33

<210> 23
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd23 DNase against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)
 <400> 23
 cgttgagcag gctagctaca acgaggcggg gtg 33

<210> 24
 <211> 33

<212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd24 DNase against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 24
 ccgctccag gctagctaca acgagtagga gtg 33

<210> 25
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd25 DNase against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 25
 cagcggtag gctagctaca acgatgcgcc gcg 33

<210> 26
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd26 DNase against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 26
 gcacatccag gctagctaca acgactcctc cgg 33

<210> 27
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd27 DNase against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 27
 aaaagcacag gctagctaca acgaccacct cct 33

<210> 28
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd28 DNase against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 28
 taaaaagcag gctagctaca acgaatccac ctc 33

<210> 29
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd29 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 29
 gaccgtcgag gctagctaca acgagttaa aag 33

<210> 30
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd30 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 30
 ttgccttgag gctagctaca acgacgtcga tgt 33

<210> 31
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd31 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 31
 agggcgagg gctagctaca acgagtggtt gcc 33

<210> 32
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd32 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 32
 tggccctgag gctagctaca acgacgagtt tcc 33

<210> 33
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd33 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 33
 acctctgcag gctagctaca acgacgtggc cct 33

<210> 34
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd34 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 34
 cggagggttag gctagctaca acgactctgc acc 33

<210> 35
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd35 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 35
 ggcggcacag gctagctaca acgactggct ccc 33

<210> 36
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd36 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 36
 cgggdcggcag gctagctaca acgaacctgg ctc 33

<210> 37
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd37 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 37
 agggatccag gctagctaca acgagaagca gag 33

<210> 38
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd38 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 38
 gggtagggag gctagctaca acgaccatga agc 33

<210> 39
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd39 DNase against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 39
 gggctgagag gctagctaca acgatccagg ggg 33

<210> 40
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd40 DNase against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 40
 gtggatggag gctagctaca acgagtcttg gag 33

<210> 41
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd 41 DNase against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 41
 cgtggtggag gctagctaca acgaggacgt ctt 33

<210> 42
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd 42 DNase against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 42
 gggggtagag gctagctaca acgaggagag ggg 33

<210> 43
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd 43 DNase against GATA-3mRNA

<222> (1)..(33)

<400> 43
ggaggaggag gctagctaca acgagaggcc ggg 33

<210> 44
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> hgd44 DNAzyme against GATA-3mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 44
gccccccgag gctagctaca acgaaaggag gag 33

<210> 45
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> hgd45 DNAzyme against GATA-3mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 45
ccggggagag gctagctaca acgagtcctt cgg 33

<210> 46
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> hgd46 DNAzyme against GATA-3mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 46
ggacagcgag gctagctaca acgagggtcc ggg 33

<210> 47
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> hgd47 DNAzyme against GATA-3mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 47
tgggggtggag gctagctaca acgaagcgat ggg 33

<210> 48
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd48 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)
 <400> 48
 cttgaggcag gctagctaca acgatctttc tcg 33

<210> 49
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd49 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)
 <400> 49
 cacctggtag gctagctaca acgattgagg cac 33

<210> 50
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd50 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)
 <400> 50
 gcaggggcag gctagctaca acgactggta ctt 33

<210> 51
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd51 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)
 <400> 51
 ccagcttcag gctagctaca acgagctgtc ggg 33

<210> 52
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd52 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)
 <400> 52
 gtgggacgag gctagctaca acgatccagc ttc 33

<210> 53
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd53 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)
 <400> 53
 ggagtgggag gctagctaca acgagactcc agc 33

<210> 54
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd54 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)
 <400> 54
 atgctgccag gctagctaca acgagggagt ggg 33

<210> 55
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd55 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)
 <400> 55
 gggcggtcag gctagctaca acgagctgcc acg 33

<210> 56
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd56 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)
 <400> 56
 gaggctccag gctagctaca acgaccaggg cgg 33

<210> 57
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd57 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)
 <400> 57
 gtgggtcgag gctagctaca acgagaggag gct 33

<210> 58
 <211> 33

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> hgd58 DNAzyme against GATA-3mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 58
aggtggtgag gctagctaca acgaggggtg gtg 33

<210> 59
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> hgd59 DNAzyme against GATA-3mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 59
actcgggcag gctagctaca acgagtaggg cgg 33

<210> 60
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> hgd60 DNAzyme against GATA-3mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 60
ggagctgtag gctagctaca acgatcgggc acg 33

<210> 61
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> hgd61 DNAzyme against GATA-3mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 61
ggacttgtag gctagctaca acgaccgaag ccg 33

<210> 62
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> hgd62 DNAzyme against GATA-3mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 62
gggcctggag gctagctaca acgattgcat ccg 33

<210> 63
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd63 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 63
 tgtgctggag gctagctaca acgacgggcc ttg 33

<210> 64
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd64 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 64
 gttcacacag gctagctaca acgatccctg cct 33

<210> 65
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd65 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 65
 cagttcacag gctagctaca acgaactccc tgc 33

<210> 66
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd66 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 66
 cacagttcag gctagctaca acgaacactc cct 33

<210> 67
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd67 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 67
 gttgccccag gctagctaca acgaagttca cac 33

<210> 68
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd68 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 68
 tcgccgccag gctagctaca acgaagtggg gtc 33

<210> 69
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd69 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 69
 cccgtgccag gctagctaca acgactcgcc gcc 33

<210> 70
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> hgd70 DNAzyme against GATA-3mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 70
 ggcgttcag gctagctaca acgaaggtag tgt 33

<210> 71
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td1 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 71
 tggcttctag gctagctaca acgagccctc gtc 33

<210> 72
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td2 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 72
 gggctctgag gctagctaca acgagcctgg ctt 33

<210> 73
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td3 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 73
 gggaccccag gctagctaca acgacggagc ccg 33

<210> 74
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td4 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 74
 ggtgggggag gctagctaca acgacccacc gga 33

<210> 75
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td5 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 75
 ggcgggggag gctagctaca acgaccgagg gcc 33

<210> 76
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td6 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 76
 gggctgggag gctagctaca acgagggcag gga 33

<210> 77
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td7 DNAzyme against T-bet mRNA

<222> (1)..(33)
 <400> 77
 cgtcgaggag gctagctaca acgaccgccc ctc 33

<210> 78
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td8 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 78
 gggctggcag gctagctaca acgacttccc gta 33

<210> 79
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td9 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 79
 cgatgcccag gctagctaca acgaccgggg cgg 33

<210> 80
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td10 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 80
 gctccacgag gctagctaca acgagcccat ccg 33

<210> 81
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td11 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 81
 ccggctccag gctagctaca acgagatgcc cat 33

<210> 82
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
<221> td12 DNAzyme against T-bet mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 82
tctccgcaag gctagctaca acgaccggct cca 33

<210> 83
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> td13 DNAzyme against T-bet mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 83
ccgtcagcag gctagctaca acgagtctcc gca 33

<210> 84
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> td14 DNAzyme against T-bet mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 84
tccccggcag gctagctaca acgacggctc ggt 33

<210> 85
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> td15 DNAzyme against T-bet mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 85
cccccgcgag gctagctaca acgagctcgt ccg 33

<210> 86
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> td16 DNAzyme against T-bet mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 86
gtagggagag gctagctaca acgaccagg ctg 33

<210> 87
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
 <221> td17 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)
 <400> 87
 gggcgggcag gctagctaca acgacaaggc gcc 33
 <210> 88
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td18 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)
 <400> 88
 cggaaggag gctagctaca acgatcgccc gcg 33
 <210> 89
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td19 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)
 <400> 89
 tagtcctcag gctagctaca acgagcggcc ccg 33
 <210> 90
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td20 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)
 <400> 90
 tccccgacag gctagctaca acgactccag tcc 33
 <210> 91
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td21 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)
 <400> 91
 tttccccgag gctagctaca acgaacctcc agt 33
 <210> 92
 <211> 33

<212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td22 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 92
 tgagcgcgag gctagctaca acgacctcag ttt 33

<210> 93
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td23 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 93
 ggaccacaag gctagctaca acgaaggtgg ttg 33

<210> 94
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td24 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 94
 cttggaccag gctagctaca acgaaacagg tgg 33

<210> 95
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td25 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 95
 aaacttgag gctagctaca acgacacaac agg 33

<210> 96
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td26 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 96
 ctgattaaag gctagctaca acgattggac cac 33

<210> 97
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td27 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 97
 tgggtgctgag gctagctaca acgataaact tgg 33

<210> 98
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td28 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 98
 tgatgatcag gctagctaca acgactctgt ctg 33

<210> 99
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td29 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 99
 tgggtgatgag gctagctaca acgacatctc tgt 33

<210> 100
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td30 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 100
 gcttgggtgag gctagctaca acgagatcat ctc 33

<210> 101
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td31 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 101
 atgggaacag gctagctaca acgaccgccg tcc 33

<210> 102
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td32 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 102
 gaatgggaag gctagctaca acgaatccgc cgt 33

<210> 103
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td33 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 103
 tgacaggaag gctagctaca acgaggaac atc 33

<210> 104
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td34 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 104
 agtaaagtag gctagctaca acgaaggaat ggg 33

<210> 105
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td35 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 105
 cacagtaaag gctagctaca acgagacagg aat 33

<210> 106
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td36 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 106
 gcccgccag gctagctaca acgaagtaaa tga 33

<210> 107
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td37 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 107
 ccacaaacag gctagctaca acgacctgta gtg 33

<210> 108
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td38 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 108
 gtccacaaag gctagctaca acgaatcctg tag 33

<210> 109
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td39 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 109
 ccacgtccag gctagctaca acgaaaacat cct 33

<210> 110
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td40 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 110
 ccaagaccag gctagctaca acgagtccac aaa 33

<210> 111
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td41 DNAzyme against T-bet mRNA

<222> (1)..(33)
 <400> 111
 ccaccaagag gctagctaca acgacacgtc cac 33

<210> 112
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td42 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 112
 gctggtccag gctagctaca acgacaagac cac 33

<210> 113
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td43 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 113
 gctctggtag gctagctaca acgacgccag tgg 33

<210> 114
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td44 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 114
 ctgcaccag gctagctaca acgattgccg ctc 33

<210> 115
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td45 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 115
 cacactgcag gctagctaca acgaccactt gcc 33

<210> 116
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td46 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)
 <400> 116
 ctttccacag gctagctaca acgatgcacc cac 33

<210> 117
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td47 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)
 <400> 117
 gcctttccag gctagctaca acgaactgca ccc 33

<210> 118
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td48 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)
 <400> 118
 ttcctggcag gctagctaca acgagctgcc ctc 33

<210> 119
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td49 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)
 <400> 119
 gtggacgtag gctagctaca acgaaggcgg ttt 33

<210> 120
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td50 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)
 <400> 120
 ccgggtggag gctagctaca acgagtacag gcg 33

<210> 121
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td51 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)
 <400> 121
 cctggcgcag gctagctaca acgaccagtg cgc 33

<210> 122
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td52 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)
 <400> 122
 caaatgaaag gctagctaca acgattcctg gcg 33

<210> 123
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td53 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)
 <400> 123
 tttcccaaag gctagctaca acgagaaact tcc 33

<210> 124
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td54 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)
 <400> 124
 attggtggag gctagctaca acgagccccc ttg 33

<210> 125
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td55 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)
 <400> 125
 tgggtcacag gctagctaca acgatgttgg acg 33

<210> 126
 <211> 33

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> td56 DNAzyme against T-bet mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 126
tctgggtcag gctagctaca acgaattggt gga 33

<210> 127
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> td57 DNAzyme against T-bet mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 127
gcacaatcag gctagctaca acgactgggt cac 33

<210> 128
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> td58 DNAzyme against T-bet mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 128
ggagcacaag gctagctaca acgacatctg ggt 33

<210> 129
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> td59 DNAzyme against T-bet mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 129
actggagcag gctagctaca acgaaatcat ctg 33

<210> 130
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> td60 DNAzyme against T-bet mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 130
atggaggag gctagctaca acgatggagc aca 33

<210> 131
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td61 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 131
 tggtagcttag gctagctaca acgaggagg act 33

<210> 132
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td62 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 132
 gggctggtag gctagctaca acgattatgg agg 33

<210> 133
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td63 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 133
 tcaacgatag gctagctaca acgagcagcc ggg 33

<210> 134
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td64 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 134
 cctcaacgag gctagctaca acgaatgcag ccg 33

<210> 135
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td65 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 135
 tcacctcaag gctagctaca acgagatatg cag 33

<210> 136
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td66 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 136
 cgtcggtcag gctagctaca acgactcaac gat 33

<210> 137
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td67 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 137
 gtaaagatag gctagctaca acgagcgtgt tgg 33

<210> 138
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td68 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 138
 aagtaaagag gctagctaca acgaatgcgt gtt 33

<210> 139
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td69 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 139
 ggcaatgaag gctagctaca acgatgggtt tct 33

<210> 140
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td70 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

```

<400> 140
tcacggcaag gctagctaca acgagaactg ggt 33

<210> 141
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> td71 DNAzyme against T-bet mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 141
aggcagtcag gctagctaca acgaggcaat gaa 33

<210> 142
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> td72 DNAzyme against T-bet mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 142
atctcggcag gctagctaca acgatctggt agg 33

<210> 143
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> td73 DNAzyme against T-bet mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 143
gctgagtaag gctagctaca acgactcggc att 33

<210> 144
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> td74 DNAzyme against T-bet mRNA
<222> (1)..(33)

<400> 144
tattatcaag gctagctaca acgatttcag ctg 33

<210> 145
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> td75 DNAzyme against T-bet mRNA

```

<222> (1)..(33)
 <400> 145
 gggttattag gctagctaca acgacaattt tca 33

<210> 146
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td76 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 146
 aaggggttag gctagctaca acgatatcaa ttt 33

<210> 147
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td77 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 147
 ctcccgaag gctagctaca acgacctttg gca 33

<210> 148
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td78 DNAzyme against T-bet mRNA
 <222> (1)..(33)

<400> 148
 gtacatggag gctagctaca acgatcaaag ttc 33

<210> 149
 <211> 2588
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> td54 bindingsite
 <222> (952)..(970)

<220>
 <221> td69 bindingsite
 <222> (1096)..(1114)

<220>
 <221> td70 bindingsite
 <222> (1100)..(1118)

<400> 149
 cggccccgctg gagaggaagc ccgagagctg ccgcgcgctt gccggacgag ggcgtagaag 60

DE 103 46 487 A1 2005.05.12

ccaggcgta	gagcccgggc	tccggtggg	tccccaccc	ggcctcggg	tccccgccc	120
cctgtccct	gcccattcca	gcccacgca	ccctctcgc	cgcgagggg	cggtcctcg	180
acggctacg	gaaggtgcca	gcccggccc	gatgggcatc	gtggagccg	gttgcggaga	240
catgctgac	ggcaccgagc	cgatgccgg	gagcgacgag	ggccgggccc	ctggcgccga	300
cccgcagcac	cgctacttct	acccggagcc	gggcgcgcag	gacgcggacg	agcgtcgcgg	360
gggcggcagc	ctgggggtct	cctaccggg	gggcgccttg	gtgcccggc	cgccgagccg	420
cttccttga	gcctacgcct	acccggcgc	acccaggcg	gccggcttc	ccggcgcggg	480
cgagtcctt	ccgccggcc	cggacgccga	gggtaccag	ccgggcgagg	gctacgccgc	540
cccggaccg	cgcgccggg	tctaccggg	gccgcgtgag	gactacgcgc	taccgcggg	600
actggaggt	tcggggaaac	tgagggtcgc	gctcaacaac	cacctgttgt	ggtccaagtt	660
taatcagcac	cagacagaga	tgatcatcac	caagcagga	cggcgatgt	tcccattcct	720
gtcatttact	gtggccggg	tggagcccac	cagccactac	aggatgtttg	tggacgtggt	780
cttgggtgac	cagcaccact	ggcggtagc	gagcggcaag	tgggtgcagt	gtggaaaggc	840
cgagggcagc	atgccaggaa	accgcctgta	cgccaccgc	gactccccca	acacaggagc	900
gcactggatg	cgccaggaag	tttcatttgg	gaaactaaag	ctcacaaca	acaagggggc	960
gtccaacaat	gtgaccaga	tgattgtgct	ccagtcctc	cataagtacc	agccccggct	1020
gcatatcggt	gaggtgaacg	acggagagcc	agaggcagcc	tgcaacgctt	ccaacacgca	1080
tatctttact	ttccaagaaa	cccagttcat	tgccgtgact	gcctaccaga	atgccgagat	1140
tactcagctg	aaaattgata	ataaccctt	tgccaaagga	ttccgggaga	actttgagtc	1200
catgtacaca	tctgttgaca	ccagcatccc	ctccccgct	ggaccaact	gtcaattcct	1260
tgggggagat	cactactctc	ctctcctacc	caaccagtat	cctgttcca	gccgcttcta	1320
ccccgacctt	cctggccagg	cgaaggatgt	ggttccccag	gcttactggc	tgggggcccc	1380
ccgggaccac	agctatgagg	ctgagtttcg	agcagtcagc	atgaagcctg	cattcttgcc	1440
ctctgcccc	gggcccacca	tgtcctacta	ccgaggccag	gaggtcctgg	cacctggagc	1500
tggctggcct	gtggcacccc	agtaccctcc	caagatgggc	ccggccagct	ggttccgccc	1560
tatgcggact	ctgcccattg	aacccggccc	tggaggctca	gaggacggg	gaccagagga	1620
ccagggtccc	cccttgggtg	ggactgagat	tgccccatc	cggccggaat	ccagtgattc	1680
aggactgggc	gaaggagact	ctaagaggag	gcgcgtgtcc	ccctatcctt	ccagtgggtga	1740
cagctcctcc	cctgctgggg	ccccttctcc	ttttgataag	gaagctgaag	gacagtttta	1800
taactatttt	cccaactgag	cagatgacat	gatgaaagga	acagaaacag	tgttattagg	1860
ttggaggaca	ccgactaatt	tgggaaacgg	atgaaggact	gagaaggccc	ccgctccctc	1920
tggcccttct	ctgtttagta	gttggttggg	gaagtggggc	tcaagaagga	ttttggggtt	1980
caccagatgc	ttcctggccc	acgatgaaac	ctgagagggg	tgtccccttg	ccccatcctc	2040
tgccctaact	acagtcgttt	acctggtgct	gcgtcttgc	tttggtttcc	agctggagaa	2100

DE 103 46 487 A1 2005.05.12

aagaagacaa gaaagtcttg ggcatagaagg agctttttgc atctagtggg tgggaggggt 2160
 cagggtgtggg acatgggagc aggagactcc actttcttcc tttgtacagt aactttcaac 2220
 cttttcgttg gcatgtgtgt taatccctga tccaaaaaga acaaatacac gtatgttata 2280
 accatcagcc cgccagggtc agggaaagga ctcacctgac tttggacagc tggcctgggc 2340
 tccccctgct caaacacagt ggggatcaga gaaaaggggc tggaaagggg ggaatggccc 2400
 acatctcaag aagcaagata ttgtttgtgg tggttgtgtg tgggtgtgtg ttttttcttt 2460
 ttctttcttt ttattttttt tgaatggggg aggctattta ttgtactgag agtgggtgtct 2520
 ggatatattc cttttgtctt catcactttc tgaataaac ataaaactgt taaaaaaaaa 2580
 aaaaaaaaa 2588

<210> 150
 <211> 2450
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> mutation
 <222> (134)..(134)

<220>
 <221> mutation
 <222> (310)..(310)

<220>
 <221> td54 bindingsite
 <222> (952)..(970)

<220>
 <221> td69 bindingsite
 <222> (1096)..(1114)

<220>
 <221> td70 bindingsite
 <222> (1100)..(1118)

<220>
 <221> mutation
 <222> (1399)..(1399)

<220>
 <221> mutation
 <222> (1556)..(1556)

<400> 150
 cggcccgtg gagaggaagc ccgagagctg ccgcgcgcct gccggacgag ggcgtagaag 60
 ccaggcgtca gagcccgggc tccggtgggg tccccaccg gccctcggg tccccgccc 120
 cctgctccct gcctatcca gccacgcga ccctctcgcg cgcggagggg cgggtcctcg 180
 acggctacgg gaaggtgccg gcccggccc gatgggcatc gtggagccgg gttgcggaga 240
 catgctgacg ggcaccgagc cgatgccggg gagcgacgag ggccggggcg ctggcgccga 300
 cccgcagcag cgctacttct acccgagcc gggcgcgcag gacgcggacg agcgtcgcgg 360
 gggcggcagc ctgggggtct cctaccggg gggcgccttg gtgcccgcc cgccgagccc 420

DE 103 46 487 A1 2005.05.12

cttccttggg	gcctacgcct	acccgccg	accccaggcg	gccggcttcc	ccggcgcggg	480
cgagtccttc	ccgccgccc	cggacgccga	gggctaccag	ccgggagagg	gctacgccgc	540
cccggacccg	cgcgccgggc	tctaccggg	gccgctgag	gactacgcgc	taccgcggg	600
actggagggtg	tcggggaaac	tgagggtcgc	gctcaacaac	cacctgttgt	ggtccaagtt	660
taatcagcac	cagacagaga	tgatcatcac	caagcagggg	cggcggatgt	tcccattcct	720
gtcatttact	gtggccgggc	tggagcccac	cagccactac	aggatgtttg	tggacgtggt	780
cttgggtggac	cagcaccact	ggcggtagca	gagcggcaag	tgggtgcagt	gtggaaaggc	840
cgagggcagc	atgccaggaa	accgcctgta	cgtccacccg	gactccccca	acacaggagc	900
gactggatg	cgccaggaag	tttcatttgg	gaaactaaag	ctcacaaca	acaagggggc	960
gtccaacaat	gtgaccaga	tgattgtgct	ccagtcctc	cataagtacc	agccccggct	1020
gcataatcgtt	gaggtgaacg	acggagagcc	agaggcagcc	tgcaacgctt	ccaacacgca	1080
tatctttact	ttccaagaaa	cccagttcat	tgccgtgact	gcctaccaga	atgccgagat	1140
tactcagctg	aaaattgata	ataaccctt	tgccaaagga	ttccgggaga	actttgagtc	1200
catgtacaca	tctgttgaca	ccagcatccc	ctccccgcct	ggaccaact	gtcaattcct	1260
tgggggagat	caactactct	ctctcctacc	caaccagtat	cctgttcca	gccgcttcta	1320
ccccgacctt	cctggccagg	cgaaggatgt	ggttccccag	gcttactggc	tgggggcccc	1380
ccgggaccac	agctatgggg	ctgagtttcg	agcagtcagc	atgaagcctg	cattcttgcc	1440
ctctgcccct	gggcccacca	tgtcctacta	ccgaggccag	gaggtcctgg	caactggagc	1500
tggctggcct	gtggcacccc	agtaccctcc	caagatgggc	ccggccagct	ggttcagccc	1560
tatgcggact	ctgcccattg	aacccggccc	tggaggctca	gagggacggg	gaccagagga	1620
ccagggctcc	cccttgggtg	ggactgagat	tgccccatc	cggccggaat	ccagtgattc	1680
aggactgggc	gaaggagact	ctaagaggag	gcgctgttcc	ccctatcctt	ccagtggatga	1740
cagctcctcc	cctgctgggg	ccccttctcc	ttttgataag	gaagctgaag	gacagtttta	1800
taactatttt	cccaactgag	cagatgacat	gatgaaagga	acagaaacag	tgttattagg	1860
ttggaggaca	ccgactaatt	tgggaaacgg	atgaaggact	gagaaggccc	ccgctccctc	1920
tggcccttct	ctgttttagta	gttggttggg	gaagtggggc	tcaagaagga	ttttgggggt	1980
caccagatgc	ttcctggccc	acgatgaaac	ctgagagggg	tgccccctg	ccccatcctc	2040
tgcccctaact	acagtcgttt	acctggtgct	gcgtcttgc	tttggtttcc	agctggagaa	2100
aagaagacaa	gaaagtcttg	ggcatgaagg	agctttttgc	atctagtggg	tgggaggggt	2160
caggtgtggg	acatgggagc	aggagactcc	actttcttcc	ttgtacagt	aactttcaac	2220
cttttcggtg	gcatgtgtgt	taatccctga	tccaaaaaga	acaaatacac	gtatgttata	2280
accatcagcc	cgccagggtc	agggaaagga	ctcacctgac	tttggacagc	tggcctgggc	2340
tccccctgct	caaacacagt	ggggatcaga	gaaaaggggc	tggaaagggg	ggaatggccc	2400
acatctcaag	aagcaagata	ttgtttgtgg	tggttgtgtg	tgggtgtgtg		2450

<210> 151
 <211> 2399
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 151
 ggcgccgtct tgatactttc agaaagaatg cattccctgt aaaaaaaaaa aaaaaatact 60
 gagagaggga gagagagaga gaagaagaga gagagacgga gggagagcga gacagagcga 120
 gcaacgcaat ctgaccgagc aggtcgtacg ccgccgcctc ctctctctct ctgctcttcg 180
 ctaccaggt gacccgagga gggactccgc ctccgagcgg ctgaggacc cgggtgcagag 240
 gagcctggct cgcagaattg cagagtcgtc gccctttttt acaacctggt cccgttttat 300
 tctgccgtac ccagtttttg gatttttgtc ttccccttct tctctttgct aaacgacccc 360
 tccaagataa tttttaaaaa accttctcct ttgctcacct ttgcttcca gccttcccat 420
 cccccaccg aaagcaaattc attcaacgac ccccgaccct ccgacggcag gagccccccg 480
 acctcccagg cggaccgccc tccctccccg cgcgcggggt cggggcccgg cgagagggcg 540
 cgagcacagc cgaggccatg gaggtgacgg cggaccagcc gcgctgggtg agccaccacc 600
 accccgccgt gctcaacggg cagcaccggg acacgcacca cccgggcctc agccactcct 660
 acatggacgc ggcgcagtac ccgctgccgg aggaggtgga tgtgcttttt aacatcgacg 720
 gtcaaggcaa ccacgtcccg ccctactacg gaaactcggg cagggccacg gtgcagaggt 780
 accctccgac ccaccagggg agccaggtgt gccgcccgcc tctgcttcat ggatccctac 840
 cctggctgga cggcggcaaa gccctgggca gccaccacac cgcctcccc tggaatctca 900
 gcccttctc caagacgtcc atccaccag gctccccggg gccctctcc gtctaccccc 960
 cggcctcgtc ctctctcttg tcggggggcc acgccagccc gcacctctc accttcccgc 1020
 ccaccccgcc gaaggacgtc tccccggacc catcgctgtc caccccaggc tcggccggct 1080
 cggcccggca ggacgagaaa gagtgctca agtaccaggt gccctgccc gacagcatga 1140
 agctggagtc gtcccactcc cgtggcagca tgaccgccct ggggtggagcc tcctcgtcga 1200
 cccaccacc catcaccacc taccgcccct acgtgcccga gtacagctcc ggactcttcc 1260
 ccccagcag cctgctgggc ggctccccca ccggcttcgg atgcaagtcc aggcccaagg 1320
 cccgtccag cacagaaggc agggagtgtg tgaactgtgg ggcaacctc accccactgt 1380
 ggcggcgaga tggcacggga cactacctgt gcaacgcctg cgggctctat cacaaaatga 1440
 acggacagaa ccggcccctc attaagccca agcgaaggct gtctgcagcc aggagagcag 1500
 ggacgtcctg tgcgaactgt cagaccacca caaccacact ctggaggagg aatgccaatg 1560
 gggaccctgt ctgcaatgcc tgtgggctct actacaagct tcacaatatt aacagacccc 1620
 tgactatgaa gaaggaaggc atccagacca gaaaccgaaa aatgtctagc aaatccaaaa 1680
 agtgcaaaaa agtgcatgac tctactggagg acttccccaa gaacagctcg tttaaccggg 1740
 ccgccctctc cagacacatg tcctccctga gccacatctc gcccttcagc cactccagcc 1800

DE 103 46 487 A1 2005.05.12

acatgctgac cacgcccacg ccgatgcacc cgccatccag cctgtccttt ggaccacacc 1860
 acccctccag catggtcacc gccatgggtt agagccctgc tcgatgctca cagggccccc 1920
 agcgagagtc cctgcagtcc ctttcgactt gcattttttgc aggagcagta tcatgaagcc 1980
 taaacgcgat ggatatatgt ttttgaaggc agaaagcaaa attatgtttg ccactttgca 2040
 aaggagctca ctgtggtgtc tgtgttccaa cactgaatc tggaccccat ctgtgaataa 2100
 gccattctga ctcatatccc ctatttaaca gggctcttag tgctgtgaaa aaaaaaatgc 2160
 tgaacattgc atataactta tattgtaaga aatactgtac aatgacttta ttgcatctgg 2220
 gtagctgtaa ggcatgaagg atgccaagaa gtttaaggaa tatgggagaa atagtgtgga 2280
 aattaagaag aaactaggtc tgatattcaa atggacaaac tgccagtttt gtttcctttc 2340
 actggccaca gttgtttgat gcattaaaag aaaataaaaa aaagaaaaaa gagaaaaga 2399

<210> 152
 <211> 2365
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 152
 tcccagcctt cccatcccc caccgaaagc aaatcattca acgacccccg accctccgac 60
 ggcaggagcc ccccgacctc ccaggcggac cgcccttccc tccccgcgcg ggttccgggc 120
 ccggcgagag ggcgcgacga cagccgaggc catggagggtg acggcggacc agccgcgctg 180
 ggtgagccac caccaccccg ccgtgctcaa cgggcagcac ccggacacgc accacccggg 240
 cctcagccac tcctacatgg acgcggcgca gtacccgctg ccggaggagg tggatgtgct 300
 ttttaacatc gacggtcaag gcaaccacgt cccgccctac tacggaaact cggtcagggc 360
 cacggtgacg aggtaccctc cgaccacca cgggagccag gtgtgccgcc cgcctctgct 420
 tcatggatcc ctaccctggc tggacggcgg caaagccctg ggacagccacc acaccgcctc 480
 cccctggaat ctacgccctt tctccaagac gtccatccac cacggctccc cggggcccct 540
 ctccgtctac cccccggcct cgtcctcctc cttgtcgggg ggccacgcca gcccgcacct 600
 cttcaccttc ccgcccacc cgccgaagga cgtctccccg gaccatcgc tgtccacccc 660
 aggctcggcc ggctcggccc ggcaggacga gaaagagtgc ctcaagtacc aggtgccctt 720
 gcccagacagc atgaagctgg agtcgtccca ctcccgtggc agcatgaccg ccctgggtgg 780
 agcctcctcg tcgaccacc accccatcac cacctaccg ccctacgtgc ccgagtacag 840
 ctccggactc ttcccccca gcagcctgct gggcggctcc cccaccggct tcggatgcaa 900
 gtccaggccc aaggcccggc ccagcacagg cagggagtgt gtgaactgtg gggcaacctc 960
 gacccactg tggcggcgag atggcacggg aactacctg tgcaacgcct gcgggctcta 1020
 tcacaaaatg aacggacaga accggcccct cattaagccc aagcgaaggc tgtctgcagc 1080
 caggagagca gggacgtcct gtgcgaactg tcagaccacc acaaccacac tctggaggag 1140
 gaatgccaat ggggaccctg tctgcaatgc ctgtgggctc tactacaagc ttacaatat 1200
 taacagacc ctgactatga agaaggaagg catccagacc agaaaccgaa aaatgtctag 1260

```

caaatccaaa aagtgcaaaa aagtgcatga ctactggag gacttcccca agaacagctc 1320
gtttaaccg gccgccctct ccagacacat gtcctccctg agccacatct cgcccttcag 1380
ccactccagc cacatgctga ccacgccac gccgatgcac ccgccatcca gcctgtcctt 1440
tggaccacac caccctcca gcatggtcac cgccatgggt tagagccctg ctcgatgctc 1500
acagggcccc cagcgagagt ccctgcagtc ctttcgact tgcatttttg caggagcagt 1560
atcatgaagc ctaaacgcga tggatatatg ttttgaagg cagaaagcaa aattatgttt 1620
gccactttgc aaaggagctc actgtgggtg ctgtgttcca accactgaat ctggacccca 1680
tctgtgaata agccattctg actcatatcc cctatttaac agggctctcta gtgctgtgaa 1740
aaaaaaaaat cctgaacatt gcatataact tatattgtaa gaaatactgt acaatgactt 1800
tattgcatct gggtagctgt aaggcatgaa ggatgccaa aagttaagg aatatgggag 1860
aaatagtgtg gaaattaaga agaaactagg tctgatattc aatggacaa actgccagtt 1920
ttgtttcctt tctctggcca cagttgtttg atgcattaa agaaaataaa aaaaagaaaa 1980
aagagaaaag aaaaaaaaaag aaaaaagttg taggcgaatc atttgttcaa agctgttggc 2040
cctctgcaaa ggaaatacca gttctgggca atcagtgtta ccgttcacca gttgccattg 2100
agggtttcag agagcctttt tctaggccta catgctttgt gaacaagtcc ctgtaattgt 2160
tgtttgatg tataattcaa agcaccaaaa taagaaaaga ttagattta tttcatcata 2220
ttatacagac cgaactgttg tataaattta tttactgcta gtcttaagaa ctgctttcct 2280
tcgtttgttt gttcaatat tttccttctc tctcaatttt cggttgaata aactagatta 2340
cattcagttg gcaaaaaaaaa aaaaa 2365

```

```

<210> 153
<211> 2728
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> mutation
<222> (57)..(57)

```

```

<220>
<221> mutation
<222> (59)..(59)

```

```

<220>
<221> mutation
<222> (69)..(69)

```

```

<220>
<221> hgd40 bindingsite
<222> (909)..(927)

```

```

<400> 153
ggcgccgtct tgatactttc agaaagaatg cattccctgt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaat 60
actgagagag ggagagagag agaagaagag agagagacgg agggagagcg agacagagcg 120
agcaacgcaa tctgaccgag caggtcgtac gccgccgct cctcctctc tctgctcttc 180

```

DE 103 46 487 A1 2005.05.12

gctacccagg	tgacccgagg	agggactccg	cctccgagcg	gctgaggacc	ccggtgcaga	240
ggagcctggc	tcgcagaatt	gcagagtcgt	cgcccctttt	tacaacctgg	tcccgtttta	300
ttctgccata	cccagttttt	ggatttttgt	cttccccttc	ttctctttgc	taaacgacct	360
ctccaagata	atttttaaaa	aaccttctcc	tttgctcacc	tttgcttccc	agccttccca	420
tccccccacc	gaaagcaaat	cattcaacga	cccccgacct	tccgacggca	ggagcccccc	480
gacctcccag	gcggaccgcc	ctccctcccc	gcgcgcgggt	tccgggcccc	gcgagagggc	540
gcgagcacag	ccgaggccat	ggaggtgacg	gcgaccagc	gcgcctgggt	gagccaccac	600
caccccgccg	tgctcaacgg	gcagcacccg	gacacgcacc	acccgggcct	cagccactcc	660
tacatggacg	cggcgagta	cccgctgccg	gaggaggtgg	atgtgctttt	taacatcgac	720
ggtcaaggca	accacgtccc	gccctactac	ggaaactcgg	tcagggccac	ggtgcagagg	780
tacctcccga	cccaccacgg	gagccaggtg	tgccgcccgc	ctctgcttca	tggatccctc	840
cctggctgga	cggcggcaaa	gccctgggca	gccaccacac	cgccctcccc	tggaatctca	900
gccccttctc	caagacgtcc	atccaccacg	gctccccggg	gcccctctcc	gtctaccccc	960
cggcctcgtc	ctcctccttg	tcggggggcc	acgccagccc	gcacctcttc	accttcccgc	1020
ccaccccgcc	gaaggacgtc	tccccggacc	catcgctgtc	caccccaggc	tcggccggct	1080
cggcccggca	ggacgagaaa	gagtgcctca	agtaccaggt	gcccctgccc	gacagcatga	1140
agctggagtc	gtcccactcc	cgtggcagca	tgaccgccct	gggtggagcc	tcctcgtcga	1200
cccaccaccc	catcaccacc	tacccgccct	acgtgcccga	gtacagctcc	ggactcttcc	1260
ccccagcag	cctgctgggc	ggctccccca	ccggcttcgg	atgcaagtcc	aggcccaagg	1320
cccgtccag	cacagaaggc	agggagtgtg	tgaactgtgg	ggcaacctcg	accccactgt	1380
ggcggcgaga	tggcacggga	cactacctgt	gcaacgcctg	cgggctctat	cacaaaatga	1440
acggacagaa	ccggcccctc	attaagccca	agcgaaggct	gtctgcagcc	aggagagcag	1500
ggacgtcctg	tgcaactgt	cagaccacca	caaccacact	ctggaggagg	aatgccaatg	1560
gggaccctgt	ctgcaatgcc	tgtgggctct	actacaagct	tcacaatatt	aacagacccc	1620
tgactatgaa	gaaggaaggc	atccagacca	gaaaccgaaa	aatgtctagc	aatccaaaa	1680
agtgcaaaaa	agtgcattgac	tactggagg	acttccccaa	gaacagctcg	tttaaccggg	1740
ccgccctctc	cagacacatg	tcctccctga	gccacatctc	gcccttcagc	caccccagcc	1800
acatgctgac	cacgcccacg	ccgatgcacc	cgccatccag	cctgtccttt	ggaccacacc	1860
accctccag	catggtcacc	gccatggggt	agagccctgc	tgatgctcac	agggccccca	1920
gcgagagtcc	ctgcagtccc	tttcgacttg	catttttgca	ggagcagtat	catgaagcct	1980
aaacgcgatg	gatatatggt	tttgaaggca	gaaagcaaaa	ttatgcttgc	cactttgcaa	2040
aggagctcac	tgtgggtgtct	gtgttccaac	cactgaatct	ggaccccatc	tgtgaataag	2100
ccattctgac	tcatatcccc	tatttaacag	ggtctctagt	gctgtgaaaa	aaaaaaatgc	2160
tgaacattgc	atataactta	tattgtaaga	aatactgtac	aatgacttta	ttgcatctgg	2220

gtagctgtaa ggcataaagg atgccaagaa gtttaaggaa tatgggagaa atagtgtgga	2280
aattaagaag aaactaggtc tgatattcaa atggacaaac tgccagtttt gtttcctttc	2340
actggccaca gttgtttgat gcattaaaag aaaataaaaa aaagaaaaag agaaaagaaa	2400
aaaaaagaaa aaagttgtag gcgaatcatt tgttcaaagc tgttggcctc tgcaaaggaa	2460
ataccagttc gggcaatcag tgttaccggt caccagttgc cattgagggt ttcagagagc	2520
ctttttctag gcctacatgc tttgtgaaca agtccctgta attggtgttt gtatgtataa	2580
ttcaaagcac caaataaga aaagatgtag atttatttca tcatattata cagaccgaac	2640
tgttgataa atttatttac tgctagtctt aagaactgct ttctttcggt tgtttgtttc	2700
aatattttcc ttctctctca attttcgg	2728

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines Zell- und/oder Gewebe- und/oder Krankheitsphasen-spezifischen Arzneimittels, gekennzeichnet durch die Schritte,

- a) Identifikation von Ribonukleinsäure-Molekülen, deren Expression sich in einer Zielzelle im Vergleich zur Expression einer Kontrollzelle unterscheidet
- b) Design von spezifischen Ribonukleinsäure-Molekülen, die an Ribonukleinsäure Moleküle aus Schritt a) binden und sie funktionell inaktivieren
- c) Einbringen der spezifischen Ribonukleinsäure-Moleküle aus Schritt b) in Zielzellen
- d) Formulierung der spezifischen Ribonukleinsäure-Moleküle aus Schritt b) und/oder einer Zielzelle aus Schritt c) in einem Arzneimittel

2. Verfahren gemäß Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch dass die Zielzelle eine Zelle ist, die Transkriptionsfaktoren und/oder Hormone und/oder Zytokine und/oder Wachstumsfaktoren sezerniert und/oder charakteristische Oberflächenrezeptoren aufweist.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch dass die Kontrollzelle eine gesunde Zelle des Zielgewebes oder eine typgleiche Zelle aus anderen Kompartimenten desselben Patienten ist.

4. Verfahren gemäß Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch dass Ribonukleinsäure-Moleküle isoliert werden, deren Expression in einer Zielzelle im Vergleich zur Expression einer Kontrollzelle erhöht ist.

5. Verfahren gemäß Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch dass die Ribonukleinsäure-Moleküle, deren Expression in einer Zielzelle im Vergleich zur Expression einer Kontrollzelle erhöht ist, ausgewählt ist aus STAT4, STAT5a, STAT1, c-Rel, CREB2, ATF-2, ATF-2, Hlx, IRF-1, c-Maf, NFAT, NIP45, AP1, Mel-18, SKAT-2, CTLA-4, Src kinase, Tec kinase, Rik (Txk im Menschen), Itk, Tec, RIBP, PLC γ , MAP kinase, ERK, JNK, P38, MKK, MKK1, MKK2, MKK3, MKK4, MKK6, MKK7, Rac2, GADD45, GADD45 β , GADD45 γ , SOCS, CIS, SOCS1, SOCS2, SOCS3, JAK, JAK1, JAK3, NIP45 mRNA sind.

6. Verfahren gemäß Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, dass die Ribonukleinsäure-Moleküle, deren Expression in einer Zielzelle im Vergleich zur Expression einer Kontrollzelle erhöht ist, GATA-3 mRNA sind.

7. Verfahren gemäß Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch dass die Ribonukleinsäure-Moleküle, deren Expression in einer Zielzelle im Vergleich zur Expression einer Kontrollzelle erhöht sind T-bet mRNA ist.

8. Verfahren gemäß Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch dass die spezifischen Ribonukleinsäure Moleküle, die an GATA-3 mRNA binden und sie funktionell inaktivieren RNA-inaktivierende-DNA-Enzyme (DNAzyme) oder Small-Interfering-RNA (siRNA) sind.

9. Verfahren gemäß Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch dass die spezifischen Ribonukleinsäure Molekülen, die an T-bet mRNA binden und sie funktionell inaktivieren RNA-inaktivierende-DNA-Enzyme (DNAzyme) oder Small-Interfering-RNA (siRNA) sind.

10. DNAzyme, das spezifisch GATA-3 mRNA spaltet, bestehend aus
– einer katalytischen Domäne mit der Nukleotidsequenz GGCTAGCTACAACGA, die mRNA an jeder Purin:Py-

rimidin Schnittstelle schneidet, an der sie gebunden ist

- einer rechten Substratbindedomäne, die sich am 3'-Ende der katalytischen Domäne anschließt und
- einer linken Substratbindedomäne, die sich am 5'-Ende der katalytischen Domäne anschließt, wobei die beiden Substratbindedomänen jeweils komplementär zu zwei Regionen der GATA-3 mRNA sind, so dass sie mit der mRNA hybridisieren.

11. DNAzym, gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass es die Sequenz hgd 40 GTGGATGGA GGCTAGCTACAA CGAGTCTTGGAG hat.

12. DNAzym, das spezifisch T-bet mRNA spaltet, bestehend aus

- einer katalytischen Domäne mit der Nukleotidsequenz GGCTAGCTACAACGA, die mRNA an jeder Purin:Pyrimidin Schnittstelle schneidet, an der sie gebunden ist
- einer rechten Substratbindedomäne, die sich am 3'-Ende der katalytischen Domäne anschließt und
- einer linken Substratbindedomäne, die sich am 5'-Ende der katalytischen Domäne anschließt, wobei die beiden Substratbindedomänen jeweils komplementär zu zwei Regionen der T-bet mRNA sind, so dass sie mit der mRNA hybridisieren.

13. DNAzym, gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass es die Sequenzen td69 GGCAATGAA GGCTAGCTACAACGA TGGGTTTCT oder td70 TCACGGCAA GGCTAGCTACAACGA GAACTGGGT hat.

14. DNAzym, gemäß der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sie modifiziert sind.

15. DNAzym, gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Modifikation ein inverses Thymin am 3'-Ende und/oder eine FAM-Markierung am 5'-Ende ist.

16. Arzneimittel enthaltend ein DNAzym gemäß der Ansprüche 10 bis 15 und einen pharmazeutisch akzeptablen Carrier.

17. Arzneimittel gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass der pharmazeutisch akzeptablen Carrier aus der Gruppe der Liposome und bioabbaubaren Polymeren stammt.

18. Verwendung eines DNAzym-haltigen Arzneimittels gemäß der vorangegangenen Ansprüche zur Behandlung von chronischen Entzündungen und Autoimmunerkrankungen.

Es folgen 18 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

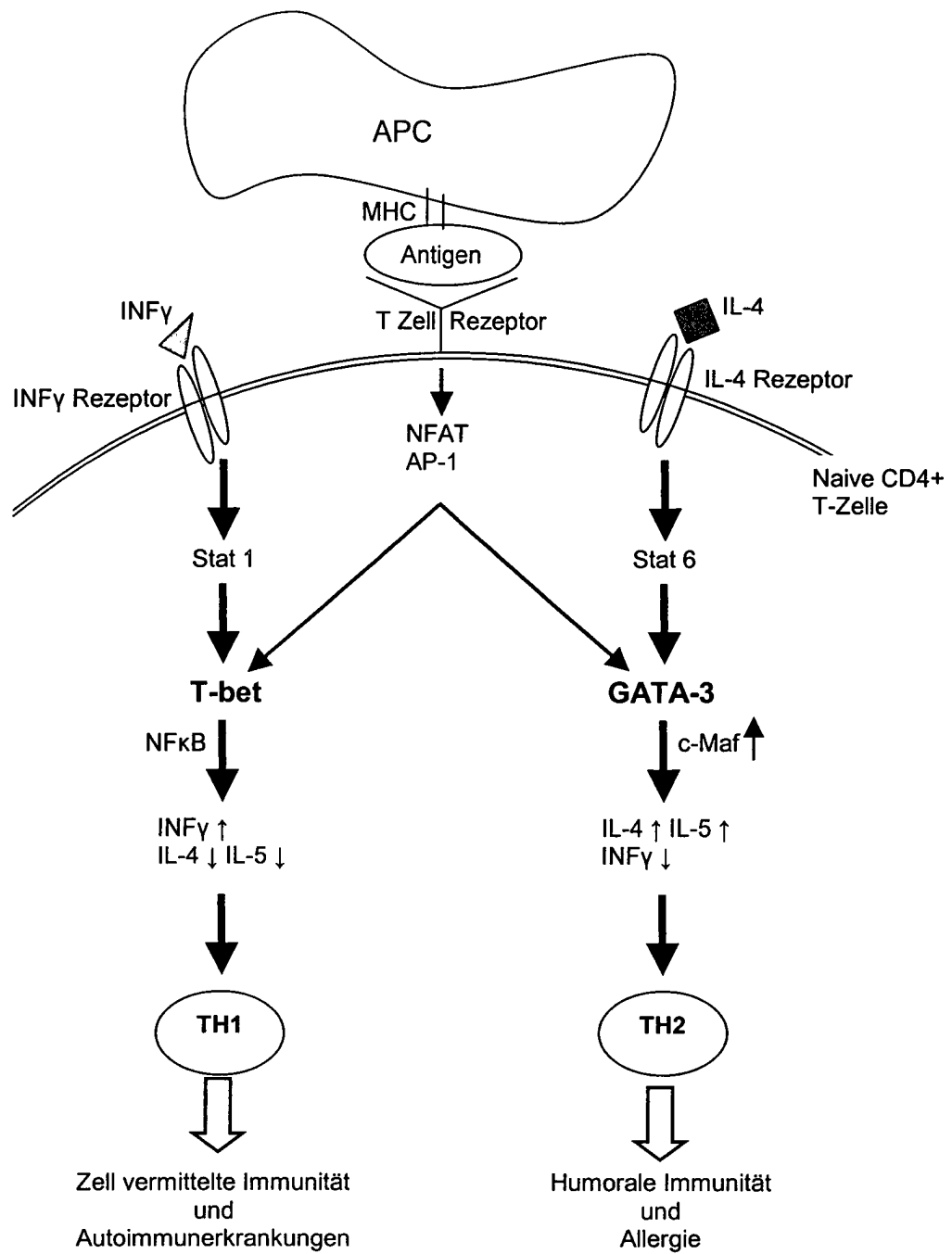


Fig. 1

Fig. 3

Name	DNAzyme Sequenz
hgd1	5'-TCGGTCAGAggctagctacaacgaTGC GTTGCT-3'
hgd2	5'-GGCGTACGAggctagctacaacgaCTGCTCGGT-3'
hgd3	5'-GGCGGCGTAggctagctacaacgaGACCTGCTC-3'
hgd4	5'-CTCGGGTCAggctagctacaacgaCTGGGTAGC-3'
hgd5	5'-TCCTCTGCAggctagctacaacgaCGGGGTCCT-3'
hgd6	5'-ACTCTGCAAggctagctacaacgaTCTGCGAGC-3'
hgd7	5'-GGGCGACGAggctagctacaacgaTCTGCAATT-3'
hgd8	5'-AAGGGGCGAggctagctacaacgaGACTCTGCA-3'
hgd9	5'-AAAACGGGAggctagctacaacgaCAGGTTGTA-3'
hgd10	5'-AGAATAAAAaggctagctacaacgaGGGACCAGG-3'
hgd11	5'-ATGGCAGAAggctagctacaacgaAAAACGGGA-3'
hgd12	5'-AACTGGGTAggctagctacaacgaGGCAGAATA-3'
hgd13	5'-ATCCAAAAaggctagctacaacgaTGGGTATGG-3'
hgd14	5'-AGGGGAAGAggctagctacaacgaAAAAATCCA-3'
hgd15	5'-TTTTAAAAaggctagctacaacgaTATCTTGGA-3'
hgd16	5'-GTGGGGGGAggctagctacaacgaGGGAAGGCT-3'
hgd17	5'-GTTGAATGAggctagctacaacgaTTGCTTTCG-3'
hgd18	5'-GTCGTTGAAggctagctacaacgaGATTTGCTT-3'
hgd19	5'-GGCCCGGAAggctagctacaacgaCCGCGCGCG-3'
hgd20	5'-TCACCTCCAaggctagctacaacgaGGCCTCGGC-3'
hgd21	5'-CCGCCGTCAggctagctacaacgaCTCCATGGC-3'
hgd22	5'-GGTGGCTCAggctagctacaacgaCCAGCGCGG-3'
hgd23	5'-CGTTGAGCAggctagctacaacgaGGCGGGGTG-3'
hgd24	5'-CCGCGTCCAaggctagctacaacgaGTAGGAGTG-3'
hgd25	5'-CAGCGGGTAggctagctacaacgaTGCGCCGCG-3'
hgd26	5'-GCACATCCAaggctagctacaacgaCTCCTCCGG-3'
hgd27	5'-AAAAGCACAggctagctacaacgaCCACCTCCT-3'
hgd28	5'-TAAAAAGCAggctagctacaacgaATCCACCTC-3'
hgd29	5'-GACCGTCGAggctagctacaacgaGTTAAAAAG-3'
hgd30	5'-TTGCCTTGAggctagctacaacgaCGTCGATGT-3'
hgd31	5'-AGGGCGGGAggctagctacaacgaGTGGTTGCC-3'
hgd32	5'-TGGCCCTGAggctagctacaacgaCGAGTTTCC-3'
hgd33	5'-ACCTCTGCAggctagctacaacgaCGTGGCCCT-3'
hgd34	5'-CGGAGGGTAggctagctacaacgaCTCTGCACC-3'
hgd35	5'-GGCGGCACAggctagctacaacgaCTGGCTCCC-3'
hgd36	5'-CGGGCGGCAggctagctacaacgaACCTGGCTC-3'
hgd37	5'-AGGGATCCAaggctagctacaacgaGAAGCAGAG-3'
hgd38	5'-GGGTAGGGAggctagctacaacgaCCATGAAGC-3'
hgd39	5'-GGGCTGAGAggctagctacaacgaTCCAGGGGG-3'
hgd40	5'-GTGGATGGAggctagctacaacgaGTCTTGAG-3'
hgd41	5'-CGTGGTGGAggctagctacaacgaGGACGTCTT-3'
hgd42	5'-GGGGGTAGAggctagctacaacgaGGAGAGGGG-3'
hgd43	5'-GGAGGAGGAggctagctacaacgaGAGGCCGGG-3'
hgd44	5'-GCCCCCGAggctagctacaacgaAAGGAGGAG-3'
hgd45	5'-CCGGGGAGAggctagctacaacgaGTCCCTTCGG-3'
hgd46	5'-GGACAGCGAggctagctacaacgaGGGTCCGGG-3'
hgd47	5'-TGGGGTGGAggctagctacaacgaAGCGATGGG-3'
hgd48	5'-CTTGAGGCAggctagctacaacgaTCTTTCTCG-3'
hgd49	5'-CACCTGGTAggctagctacaacgaTTGAGGCAC-3'

Name	DNAzyme Sequenz
hgd50	5'-GCAGGGGCaggctagctacaacgaCTGGTACTT-3'
hgd51	5'-CCAGCTTCaggctagctacaacgaGCTGTCGGG-3'
hgd52	5'-GTGGGACGaggctagctacaacgaTCCAGCTTC-3'
hgd53	5'-GGAGTGGGaggctagctacaacgaGACTCCAGC-3'
hgd54	5'-ATGCTGCCaggctagctacaacgaGGGAGTGGG-3'
hgd55	5'-GGGCGGTCaggctagctacaacgaGCTGCCACG-3'
hgd56	5'-GAGGCTCCaggctagctacaacgaCCAGGGCGG-3'
hgd57	5'-GTGGGTCGaggctagctacaacgaGAGGAGGCT-3'
hgd58	5'-AGGTGGTGaggctagctacaacgaGGGGTGGTG-3'
hgd59	5'-ACTCGGGCaggctagctacaacgaGTAGGGCGG-3'
hgd60	5'-GGAGCTGTaggctagctacaacgaTCGGGCACG-3'
hgd61	5'-GGACTTGCaggctagctacaacgaCCGAAGCCG-3'
hgd62	5'-GGGCCTGGaggctagctacaacgaTTGCATCCG-3'
hgd63	5'-TGTGCTGGaggctagctacaacgaCGGGCCTTG-3'
hgd64	5'-GTTCACACaggctagctacaacgaTCCCTGCCT-3'
hgd65	5'-CAGTTCACaggctagctacaacgaACTCCCTGC-3'
hgd66	5'-CACAGTTCaggctagctacaacgaACACTCCCT-3'
hgd67	5'-GTTGCCCCaggctagctacaacgaAGTTCACAC-3'
hgd68	5'-TCGCCGCCaggctagctacaacgaAGTGGGGTC-3'
hgd69	5'-CCCGTGCCaggctagctacaacgaCTCGCCGCC-3'
hgd70	5'-GGCGTTGCaggctagctacaacgaAGGTAGTGT-3'

Fig. 4

Multiple Sequence Alignments GATA-3

Sequenz_1	1	GGCGCCGTCTTGATAC TTTCAGAAAGAATGCATTCCTGTAAAAAAAAAAAAAAAAAACT	60
Sequenz_2	****	-----	****
Sequenz_3	1	GGCGCCGTCTTGATAC TTTCAGAAAGAATGCATTCCTGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAT	60
Sequenz_1	61	GA-GAGAGGGAGAGAGAGAGAGAAGAAGAGAGAGAGACGGAGGGAGAGCGAGACAGAGCG	119
Sequenz_2	****	-----	****
Sequenz_3	61	ACTGAGAGAGGGAGAGAGAGAGAAGAAGAGAGAGAGACGGAGGGAGAGCGAGACAGAGCG	120
Sequenz_1	120	AGCAACGCAATCTGAC CGAGCAGGTCGTACGCCCGCCCTCCTCCTCTCTGCTCTTC	179
Sequenz_2	****	-----	****
Sequenz_3	121	AGCAACGCAATCTGAC CGAGCAGGTCGTACGCCCGCCCTCCTCCTCTCTGCTCTTC	180
Sequenz_1	180	GCTACCCAGGTGACCC GAGGAGGGACTCCGCCTCCGAGCGGCTGAGGACCCCGGTGCAGA	239
Sequenz_2	****	-----	****
Sequenz_3	181	GCTACCCAGGTGACCC GAGGAGGGACTCCGCCTCCGAGCGGCTGAGGACCCCGGTGCAGA	240
Sequenz_1	240	GGAGCCTGGCTCGCAG AATTGCAGAGTCGTGCCCCCTTTTACAACCTGGTCCCGTTTTA	299
Sequenz_2	****	-----	****
Sequenz_3	241	GGAGCCTGGCTCGCAG AATTGCAGAGTCGTGCCCCCTTTTACAACCTGGTCCCGTTTTA	300
Sequenz_1	300	TTCTGCCGTACCCAGT TTTTGGATTTTGTCTTCCCTTCTTCTCTTTGCTAAACGACCC	359
Sequenz_2	****	-----	****
Sequenz_3	301	TTCTGCCGTACCCAGT TTTTGGATTTTGTCTTCCCTTCTTCTCTTTGCTAAACGACCC	360
Sequenz_1	360	CTCCAAGATAATTTTT AAAAAACCTTCTCCTTTGCTCACCTTTGCTTCCCAGCCTTCCCA	419
Sequenz_2	1	-----TCCCAGCCTTCCCA	14
Sequenz_3	361	CTCCAAGATAATTTTT AAAAAACCTTCTCCTTTGCTCACCTTTGCTTCCCAGCCTTCCCA	420
Sequenz_1	420	TCCCCCACCAGAAAGC AAATCATTTCAACGACCCCGACCCCTCCGACGGCAGGAGCCCCC	479
Sequenz_2	15	TCCCCCACCAGAAAGC AAATCATTTCAACGACCCCGACCCCTCCGACGGCAGGAGCCCCC	74
Sequenz_3	421	TCCCCCACCAGAAAGC AAATCATTTCAACGACCCCGACCCCTCCGACGGCAGGAGCCCCC	480
Sequenz_1	480	GACCTCCCAGGCGGAC CGCCCTCCCTCCCGCGCGGGTTCCGGGCCGGCGAGAGGGC	539
Sequenz_2	75	GACCTCCCAGGCGGAC CGCCCTCCCTCCCGCGCGGGTTCCGGGCCGGCGAGAGGGC	133
Sequenz_3	481	GACCTCCCAGGCGGAC CGCCCTCCCTCCCGCGCGGGTTCCGGGCCGGCGAGAGGGC	540
Sequenz_1	540	GCGAGCACAGCCGAGG CCATGGAGGTGACGGCGGACCAGCCGCGCTGGGTGAGCCACCAC	599
Sequenz_2	134	GCGAGCACAGCCGAGG CCATGGAGGTGACGGCGGACCAGCCGCGCTGGGTGAGCCACCAC	193
Sequenz_3	541	GCGAGCACAGCCGAGG CCATGGAGGTGACGGCGGACCAGCCGCGCTGGGTGAGCCACCAC	600
Sequenz_1	600	CACCCCGCGTGTCTCA ACGGGCAGCACCAGCAGCACCACCCGGGCCTCAGCCACTCC	659
Sequenz_2	194	CACCCCGCGTGTCTCA ACGGGCAGCACCAGCAGCACCACCCGGGCCTCAGCCACTCC	253
Sequenz_3	601	CACCCCGCGTGTCTCA ACGGGCAGCACCAGCAGCACCACCCGGGCCTCAGCCACTCC	660
Sequenz_1	660	TACATGGACGCGGCGC AGTACCCGCTGCCGAGGAGGTGGATGTGCTTTTTAACATCGAC	719
Sequenz_2	254	TACATGGACGCGGCGC AGTACCCGCTGCCGAGGAGGTGGATGTGCTTTTTAACATCGAC	313
Sequenz_3	661	TACATGGACGCGGCGC AGTACCCGCTGCCGAGGAGGTGGATGTGCTTTTTAACATCGAC	720
Sequenz_1	720	GGTCAAGGCAACCACG TCCCGCCTACTACGGAAACTCGGTCAGGGCCACGGTGCAGAGG	779
Sequenz_2	314	GGTCAAGGCAACCACG TCCCGCCTACTACGGAAACTCGGTCAGGGCCACGGTGCAGAGG	373
Sequenz_3	721	GGTCAAGGCAACCACG TCCCGCCTACTACGGAAACTCGGTCAGGGCCACGGTGCAGAGG	780
Sequenz_1	780	TACCTCCGACCCACC ACGGGAGCCAGGTGTGCCGCCCGCCTCTGCTTCATGGATCCCTA	839
Sequenz_2	374	TACCTCCGACCCACC ACGGGAGCCAGGTGTGCCGCCCGCCTCTGCTTCATGGATCCCTA	433
Sequenz_3	781	TACCTCCGACCCACC ACGGGAGCCAGGTGTGCCGCCCGCCTCTGCTTCATGGATCCCTA	840
Sequenz_1	840	CCCTGGCTGGACGGCG GCAAAGCCCTGGGCAGCCACCACACCGCCTCCCCTGGAATCTC	899
Sequenz_2	434	CCCTGGCTGGACGGCG GCAAAGCCCTGGGCAGCCACCACACCGCCTCCCCTGGAATCTC	493
Sequenz_3	841	CCCTGGCTGGACGGCG GCAAAGCCCTGGGCAGCCACCACACCGCCTCCCCTGGAATCTC	900
hgd40			
Sequenz_1	900	AGCCCCCTCTCCAAGA CGTCCATCCACCAGGCTCCCCGGGGCCCTCTCCGTCTACCCC	959
Sequenz_2	494	AGCCCCCTCTCCAAGA CGTCCATCCACCAGGCTCCCCGGGGCCCTCTCCGTCTACCCC	553
Sequenz_3	901	AGCCCCCTCTCCAAGA CGTCCATCCACCAGGCTCCCCGGGGCCCTCTCCGTCTACCCC	960
Sequenz_1	960	CCGGCCTCGTCTCTCT CCTTGTGGGGGGCCACGCCAGCCCGCACCTCTCACCTTCCCG	1019
Sequenz_2	554	CCGGCCTCGTCTCTCT CCTTGTGGGGGGCCACGCCAGCCCGCACCTCTCACCTTCCCG	613
Sequenz_3	961	CCGGCCTCGTCTCTCT CCTTGTGGGGGGCCACGCCAGCCCGCACCTCTCACCTTCCCG	1020
Sequenz_1	1020	CCCACCCCGCGAAGG ACGTCTCCCGGACCCATCGCTGTCCACCCAGGCTCGGCCGGC	1079
Sequenz_2	614	CCCACCCCGCGAAGG ACGTCTCCCGGACCCATCGCTGTCCACCCAGGCTCGGCCGGC	673
Sequenz_3	1021	CCCACCCCGCGAAGG ACGTCTCCCGGACCCATCGCTGTCCACCCAGGCTCGGCCGGC	1080

Sequenz_1	1080	TCGGCCCCGGCAGGACGAGAAAGAGTGCCTCAAGTACCAGGTGCCCTGCCCGACAGCATG	1139
Sequenz_2	674	TCGGCCCCGGCAGGACGAGAAAGAGTGCCTCAAGTACCAGGTGCCCTGCCCGACAGCATG	733
Sequenz_3	1081	TCGGCCCCGGCAGGACGAGAAAGAGTGCCTCAAGTACCAGGTGCCCTGCCCGACAGCATG	1140
Sequenz_1	1140	AAGCTGGAGTCGTCCC ACTCCC GTGGCAGCATGACCGCCCTGGGTGGAGCCTCCTCGTCG	1199
Sequenz_2	734	AAGCTGGAGTCGTCCC ACTCCC GTGGCAGCATGACCGCCCTGGGTGGAGCCTCCTCGTCG	793
Sequenz_3	1141	AAGCTGGAGTCGTCCC ACTCCC GTGGCAGCATGACCGCCCTGGGTGGAGCCTCCTCGTCG	1200
Sequenz_1	1200	ACCCACCACCCCATCA CCACCTACCCGCCCTACGTGCCCGAGTACAGTCCGGACTCTTC	1259
Sequenz_2	794	ACCCACCACCCCATCA CCACCTACCCGCCCTACGTGCCCGAGTACAGTCCGGACTCTTC	853
Sequenz_3	1201	ACCCACCACCCCATCA CCACCTACCCGCCCTACGTGCCCGAGTACAGTCCGGACTCTTC	1260
Sequenz_1	1260	CCCCCAGCAGCCTGC TGGGCGGCTCCCCACCGGCTTCGGATGCAAGTCCAGGCCAAG	1319
Sequenz_2	854	CCCCCAGCAGCCTGC TGGGCGGCTCCCCACCGGCTTCGGATGCAAGTCCAGGCCAAG	913
Sequenz_3	1261	CCCCCAGCAGCCTGC TGGGCGGCTCCCCACCGGCTTCGGATGCAAGTCCAGGCCAAG	1320
Sequenz_1	1320	GCCCGGTCCAGCACAG AAGGCAGGGAGTGTGTGAAC TGTGGGGCAAC TCGACCCCACTG	1379
Sequenz_2	914	GCCCGGTCCAGCACAG ---GCAGGGAGTGTGTGAAC TGTGGGGCAAC TCGACCCCACTG	970
Sequenz_3	1321	GCCCGGTCCAGCACAG AAGGCAGGGAGTGTGTGAAC TGTGGGGCAAC TCGACCCCACTG	1380
Sequenz_1	1380	TGGCGGCGAGATGGCA CGGGACACTACCTGTGCAACGCCTGCGGGCTCTATCACAAAATG	1439
Sequenz_2	971	TGGCGGCGAGATGGCA CGGGACACTACCTGTGCAACGCCTGCGGGCTCTATCACAAAATG	1030
Sequenz_3	1381	TGGCGGCGAGATGGCA CGGGACACTACCTGTGCAACGCCTGCGGGCTCTATCACAAAATG	1440
Sequenz_1	1440	AACGGACAGAACC GGC CCCTCATTAAGCCCAAGCGAAGGCTGTCTGCAGCCAGGAGAGCA	1499
Sequenz_2	1031	AACGGACAGAACC GGC CCCTCATTAAGCCCAAGCGAAGGCTGTCTGCAGCCAGGAGAGCA	1090
Sequenz_3	1441	AACGGACAGAACC GGC CCCTCATTAAGCCCAAGCGAAGGCTGTCTGCAGCCAGGAGAGCA	1500
Sequenz_1	1500	GGGACGTCCTGTGCGA ACTGTG CAGACCACCACAACCACACTCTGGAGGAGGAATGCCAAT	1559
Sequenz_2	1091	GGGACGTCCTGTGCGA ACTGTG CAGACCACCACAACCACACTCTGGAGGAGGAATGCCAAT	1150
Sequenz_3	1501	GGGACGTCCTGTGCGA ACTGTG CAGACCACCACAACCACACTCTGGAGGAGGAATGCCAAT	1560
Sequenz_1	1560	GGGGACCCTGTCTGCA ATGCC TGTGGGCTCTACTACAAGCTTCACAATATTAACAGACCC	1619
Sequenz_2	1151	GGGGACCCTGTCTGCA ATGCC TGTGGGCTCTACTACAAGCTTCACAATATTAACAGACCC	1210
Sequenz_3	1561	GGGGACCCTGTCTGCA ATGCC TGTGGGCTCTACTACAAGCTTCACAATATTAACAGACCC	1620
Sequenz_1	1620	CTGACTATGAAGAAGG AAGGCATCCAGACCAGAAACCGAAAAATGTCTAGCAAATCCAAA	1679
Sequenz_2	1211	CTGACTATGAAGAAGG AAGGCATCCAGACCAGAAACCGAAAAATGTCTAGCAAATCCAAA	1270
Sequenz_3	1621	CTGACTATGAAGAAGG AAGGCATCCAGACCAGAAACCGAAAAATGTCTAGCAAATCCAAA	1680
Sequenz_1	1680	AAGTGCAAAAAAGTGC ATGACTCACTGGAGGACTTCCCCAAGAACAGCTCGTTTAACCCG	1739
Sequenz_2	1271	AAGTGCAAAAAAGTGC ATGACTCACTGGAGGACTTCCCCAAGAACAGCTCGTTTAACCCG	1330
Sequenz_3	1681	AAGTGCAAAAAAGTGC ATGACTCACTGGAGGACTTCCCCAAGAACAGCTCGTTTAACCCG	1740
Sequenz_1	1740	GCCGCCCTCTCCAGAC ACATGTCCTCCCTGAGCCACATCTCGCCCTTCAGCCACTCCAGC	1799
Sequenz_2	1331	GCCGCCCTCTCCAGAC ACATGTCCTCCCTGAGCCACATCTCGCCCTTCAGCCACTCCAGC	1390
Sequenz_3	1741	GCCGCCCTCTCCAGAC ACATGTCCTCCCTGAGCCACATCTCGCCCTTCAGCCACTCCAGC	1800
Sequenz_1	1800	CACATGCTGACCACGC CCACGCCGATGCACCCGCCATCCAGCCTGTCTTTGGACCACAC	1859
Sequenz_2	1391	CACATGCTGACCACGC CCACGCCGATGCACCCGCCATCCAGCCTGTCTTTGGACCACAC	1450
Sequenz_3	1801	CACATGCTGACCACGC CCACGCCGATGCACCCGCCATCCAGCCTGTCTTTGGACCACAC	1860
Sequenz_1	1860	CACCCCTCCAGCATGG TCACCCGCATGGGTTAGAGCCCTGCTCGATGCTCAGGGCCCC	1919
Sequenz_2	1451	CACCCCTCCAGCATGG TCACCCGCATGGGTTAGAGCCCTGCTCGATGCTCAGGGCCCC	1510
Sequenz_3	1861	CACCCCTCCAGCATGG TCACCCGCATGGGTTAGAGCCCTGCTCGATGCTCAGGGCCCC	1920
Sequenz_1	1920	CAGCGAGAGTCCCTGC AGTCCCTTTGACTTGCATTTTTGCAGGAGCAGTATCATGAAGC	1979
Sequenz_2	1511	CAGCGAGAGTCCCTGC AGTCCCTTTGACTTGCATTTTTGCAGGAGCAGTATCATGAAGC	1570
Sequenz_3	1921	CAGCGAGAGTCCCTGC AGTCCCTTTGACTTGCATTTTTGCAGGAGCAGTATCATGAAGC	1980
Sequenz_1	1980	CTAAACGCGATGGATA TATGTTTTGAAGGCAGAAAGCAAAATTAATGTTTGCCACTTTGC	2039
Sequenz_2	1571	CTAAACGCGATGGATA TATGTTTTGAAGGCAGAAAGCAAAATTAATGTTTGCCACTTTGC	1630
Sequenz_3	1981	CTAAACGCGATGGATA TATGTTTTGAAGGCAGAAAGCAAAATTAATGTTTGCCACTTTGC	2040
Sequenz_1	2040	AAAGGAGCTCACTGTG GTGTCTGTGTCCAACCACTGAATCTGGACCCCATCTGTGAATA	2099
Sequenz_2	1631	AAAGGAGCTCACTGTG GTGTCTGTGTCCAACCACTGAATCTGGACCCCATCTGTGAATA	1690
Sequenz_3	2041	AAAGGAGCTCACTGTG GTGTCTGTGTCCAACCACTGAATCTGGACCCCATCTGTGAATA	2100

Sequenz_1	2100	AGCCATTCTGACTCAT ATCCCCTATTTAACAGGGTCTCTAGTGTGTGAAAAAAAAAA-T	2158
Sequenz_2	1691	AGCCATTCTGACTCAT ATCCCCTATTTAACAGGGTCTCTAGTGTGTGAAAAAAAAAAAT	1750
Sequenz_3	2101	AGCCATTCTGACTCAT ATCCCCTATTTAACAGGGTCTCTAGTGTGTGAAAAAAAAAAAT	2160
Sequenz_1	2159	GCTGAACATTGCATATACTTATATTGTAAGAAATACTGTACAATGACTTTATTGCATCT	2218
Sequenz_2	1751	CCTGAACATTGCATATACTTATATTGTAAGAAATACTGTACAATGACTTTATTGCATCT	1810
Sequenz_3	2161	GCTGAACATTGCATATACTTATATTGTAAGAAATACTGTACAATGACTTTATTGCATCT	2220
Sequenz_1	2219	GGGTAGCTGTAAGGCA TGAAGGATGCCAAGAAGTTAAGGAATATGGGAGAAATAGTGTG	2278
Sequenz_2	1811	GGGTAGCTGTAAGGCA TGAAGGATGCCAAGAAGTTAAGGAATATGGGAGAAATAGTGTG	1870
Sequenz_3	2221	GGGTAGCTGTAAGGCA TGAAGGATGCCAAGAAGTTAAGGAATATGGGAGAAATAGTGTG	2280
Sequenz_1	2279	GAAATTAAGAAGAAAC TAGGTCTGATATTCAAATGGACAACTGCCAGTTTTGTTTCCTT	2338
Sequenz_2	1871	GAAATTAAGAAGAAAC TAGGTCTGATATTCAAATGGACAACTGCCAGTTTTGTTTCCTT	1930
Sequenz_3	2281	GAAATTAAGAAGAAAC TAGGTCTGATATTCAAATGGACAACTGCCAGTTTTGTTTCCTT	2340
Sequenz_1	2339	TCACTGGCCACAGTTG TTTGATGCATTTAAAAGAAAATAAAAAAAGAAAAAGAGAAAAG	2398
Sequenz_2	1931	TCACTGGCCACAGTTG TTTGATGCATTTAAAAGAAAATAAAAAAAGAAAAAGAGAAAAG	1990
Sequenz_3	2341	TCACTGGCCACAGTTG TTTGATGCATTTAAAAGAAAATAAAAAAAGAAAAAGAGAAAAG	2399
Sequenz_1	2399	A-----	2399
Sequenz_2	1991	AAAAAAAAAGAAAAA GTTGTAGGCCAATCATTTGTTCAAAGCTGTTGGCCCTCTGCAA	2050
Sequenz_3	2400	AAAAAAAAAGAAAAA GTTGTAGGCCAATCATTTGTTCAAAGCTGTTGGCC-TCGCAA	2458
Sequenz_1	****	-----	****
Sequenz_2	2051	GGAAATACCAAGTCTG GGCAATCAGTGTACCGTTCACCAAGTGGCCATTGAGGGTTTCAG	2110
Sequenz_3	2459	GGAAATACCAAGTCTG GGCAATCAGTGTACCGTTCACCAAGTGGCCATTGAGGGTTTCAG	2518
Sequenz_1	****	-----	****
Sequenz_2	2111	AGAGCCTTTTCTAGG CCTACATGCTTTGTGAACAAGTCCCTGTAATTGTTGTTTGTATG	2170
Sequenz_3	2519	AGAGCCTTTTCTAGG CCTACATGCTTTGTGAACAAGTCCCTGTAATTGTTGTTTGTATG	2578
Sequenz_1	****	-----	****
Sequenz_2	2171	TATAATCAAAGCACC AAAATAAGAAAAGATGTAGATTTATTTTCATCATATTATACAGAC	2230
Sequenz_3	2579	TATAATCAAAGCACC AAAATAAGAAAAGATGTAGATTTATTTTCATCATATTATACAGAC	2638
Sequenz_1	****	-----	****
Sequenz_2	2231	CGAACTGTTGTATAAA TTTATTTACTGCTAGTCTTAAGAAGTCTTTCTTTTCGTTTGT	2290
Sequenz_3	2639	CGAACTGTTGTATAAA TTTATTTACTGCTAGTCTTAAGAAGTCTTTCTTTTCGTTTGT	2698
Sequenz_1	****	-----	****
Sequenz_2	2291	GTTTCAATATTTTCTCTCTCAATTTTCGGTTGAATAAACTAGATTACATTCAGTTG	2350
Sequenz_3	2699	GTTTCAATATTTTCTCTCTCAATTTTCGGTTGAATAAACTAGATTACATTCAGTTG	2731
Sequenz_1	****	-----	****
Sequenz_2	2351	GCAAAAAAAAAAAAA	2365
Sequenz_3	****	-----	****

GGCGCCGTCTTGATACTTTCAGAAAGAATGCATTCCTGTAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAATACTGAGAGAGGGAGAGAGAGAAGAAGAGAGAGACGG
 AGGGAGAGCGAGACAGAGCGAGCAACGCAATCTGACCGAGCAGGTGCTAC
 GCCGCCGCTCCTCCTCCTCTGCTCTTCGCTACCCAGGTGACCCGAGG
 AGGGACTCCGCTCCGAGCGGCTGAGGACCCCGGTGCAGAGGAGCCTGGC
 TCGCAGAATTGCAGAGTCGTGCCCCCTTTTTACAACCTGGTCCCCGTTTTA
 TTCTGCCATACCCAGTTTTTTGGATTTTTGTCTTCCCCTTCTTCTTTTGC
 TAAACGACCCCTCCAAGATAATTTTTAAAAACCTTCTCCTTTGCTCACC
 TTTGCTTCCCAGCCTTCCCATCCCCCACCGAAAGCAAATCATTCAACGA
 CCCCCGACCTCCGACGGCAGGAGCCCCCGACCTCCAGGCGGACCGCC
 CTCCTTCCCCGCGCGCGGGTTCCGGGCCCGGAGAGGGCGCGAGCACAG
 CCGAGGCCATGGAGGTGACGGCGGACCAGCCGCGCTGGGTGAGCCACCAC
 CACCCCGCCGTGCTCAACGGGCAGCACCCGGACACGCACCACCCGGGCCCT
 CAGCCACTCCTACATGGACGCGGCGCAGTACCCGCTGCCGGAGGAGGTGG
 ATGTGCTTTTTAACATCGACGGTCAAGGCAACCACGTCCCGCCCTACTAC
 GGAAACTCGGTGAGGGCCACGGTGCAGAGGTACCCTCCGACCCACCACGG
 GAGCCAGGTGTGCCGCCGCTCTGCTTCATGGATCCCTACCCTGGCTGG
 ACGGCGGCAAAGCCCTGGGCAGCCACCACACCGCCTCCCCCTGGAATCTC
 AGCCCTTCTCCAAGACGTCCATCCACCACGGCTCCCCGGGGCCCTCTC
 CGTCTACCCCCCGGCTCGTCTCCTCCTTGTGGGGGGCCACGCCAGCC
 CGCACCTCTTACCTTCCCGCCACCCCGCCGAAGGACGTCTCCCCGGAC
 CCATCGCTGTCCACCCAGGCTCGGCCGGCTCGGCCCGGCAGGACGAGAA
 AGAGTGCCTCAAGTACCAGGTGCCCTGCCCGACAGCATGAAGCTGGAGT
 CGTCCCCTCCCCTGGCAGCATGACCGCCCTGGGTGGAGCCTCCTCGTCG
 ACCCACCACCCCATCACCACCTACCCGCCCTACGTGCCCGAGTACAGCTC
 CGGACTCTTCCCCCCCAGCAGCCTGCTGGGCGGCTCCCCACCGGCTTCG
 GATGCAAGTCCAGGCCAAAGCCCGGTCCAGCACAGAAGGCAGGAGTGT
 GTGAACGTGGGGCAACCTCGACCCACTGTGGCGGCGAGATGGCAGGG
 ACACTACCTGTGCAACGCCTGCGGGCTCTATCACAAAATGAACGGACAGA
 ACCGGCCCCCTCATTAAGCCCAAGCGAAGGCTGTCTGCAGCCAGGAGAGCA
 GGGACGTCCTGTGCGAAGTGTGAGACCACCACAACCACACTCTGGAGGAG
 GAATGCCAATGGGGACCCTGTCTGCAATGCCTGTGGGCTCTACTACAAGC
 TTCACAATATAACAGACCCCTGACTATGAAGAAGGAAGGCATCCAGACC
 AGAAACCGAAAAATGTCTAGCAAATCCAAAAAGTGCAAAAAAGTGCATGA
 CTCACTGGAGGACTTCCCCAAGAACAGCTCGTTTAACCCGGCCGCCCTCT
 CCAGACACATGTCTCCTGAGCCACATCTCGCCCTCAGCCACCCAGC
 CACATGCTGACCACGCCACGCCGATGCACCCGCCATCCAGCCTGTCCCTT
 TGGACCACACCACCCCTCCAGCATGGTCACCGCCATGGGTAGAGCCCTG
 CTCGATGCTCACAGGGCCCCCAGCGAGAGTCCCTGCAGTCCCTTTCGACT
 TGCATTTTTGCAGGAGCAGTATCATGAAGCCTAAACGCGATGGATATATG
 TTTTTGAAGGCAGAAAGCAAAATTAATGCTTGCCACTTTGCAAAGGAGCTC
 ACTGTGGTGTCTGTGTTCCAACCACTGAATCTGGACCCATCTGTGAATA
 AGCCATCTGACTCATATCCCCTATTTAACAGGGTCTCTAGTGTCTGAA
 AAAAAAAATGCTGAACATTCATATAACTTATATTGTAAGAAATACTGT
 ACAATGACTTTTATGCACTCTGGGTAGCTGTAAGGCATGAAGGATGCCAAG
 AAGTTTAAGGAATATGGGAGAAATAGTGTGGAAATTAAGAAGAACTAGG
 TCTGATATTCAAATGGACAAACTGCCAGTTTTGTTTTCTTTCACTGGCCA
 CAGTTGTTTTGATGCATAAAAGAAAATAAAAAAAAGAAAAGAGAAAAGA
 AAAAAAAGAAAAAAGTTGTAGGCGAATCATTTGTTCAAAGCTGTTGGCC
 TCTGCAAAGGAAATACCAGTTCTGGGCAATCAGTGTACCCTTACCAGT
 TGCCATGAGGTTTTAGAGAGCCTTTTTCTAGGCCTACATGCTTTTGTGA
 ACAAGTCCCTGTAATTTGTTGTTTGTATGTATAATCAAAGCACCAAAATA
 AGAAAAGATGTAGATTTATTTTCATCATATATACAGACCGAACTGTTGTA
 TAAATTTTACTGCTAGTCTTAAGAACTGCTTTCTTTGTTTTGTTGT
 TTCAATATTTTCTTCTCTCAATTTTC

Fig. 4 A

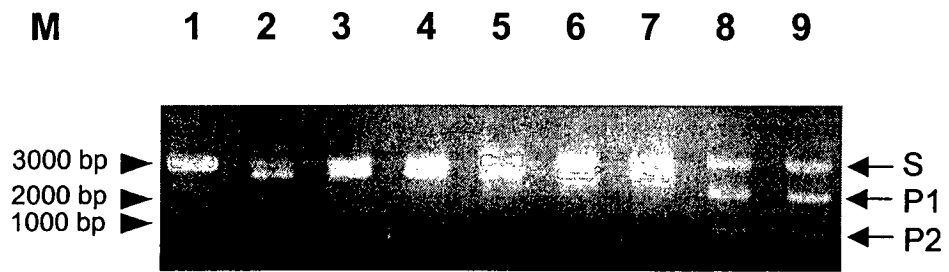


Fig. 5

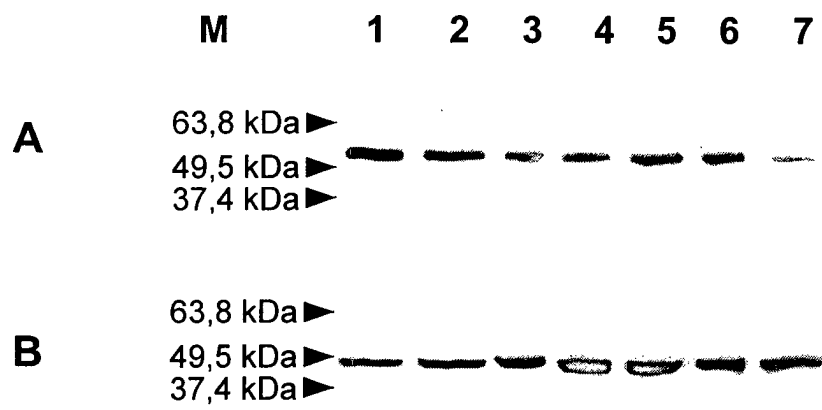


Fig. 6

Fig. 7

Name	DNAzyme Sequenz
td1	TGGCTTCTAggctagctacaacgaGCCCTCGTC
td2	GGGCTCTGAggctagctacaacgaGCCTGGCTT
td3	GGGACCCCAggctagctacaacgaCGGAGCCCG
td4	GGTGGGGGAggctagctacaacgaCCCACGGGA
td5	GGCGGGGGAggctagctacaacgaCCGAGGGCC
td6	GGGCTGGGAggctagctacaacgaGGGCAGGGA
td7	CGTCGAGGAggctagctacaacgaCCGCCCTC
td8	GGGCTGGCAggctagctacaacgaCTTCCCGTA
td9	CGATGCCCAggctagctacaacgaCCGGGGCGG
td10	GCTCCACGAggctagctacaacgaGCCCATCCG
td11	CCGGCTCCAggctagctacaacgaGATGCCCAT
td12	TCTCCGCAAggctagctacaacgaCCGGCTCCA
td13	CCGTCAGCAggctagctacaacgaGTCTCCGCA
td14	TCCCCGGCAggctagctacaacgaCGGCTCGGT
td15	CCCCCGCAggctagctacaacgaGCTCGTCCG
td16	GTAGGGAGAggctagctacaacgaCCCAGGCTG
td17	GGGCGGGCAggctagctacaacgaCAAGGCGCC
td18	CGGGAAGGAggctagctacaacgaTCGCCCGCG
td19	TAGTCCTCAggctagctacaacgaGCGGCCCGG
td20	TCCCCGACAggctagctacaacgaCTCCAGTCC
td21	TTTCCCCGAggctagctacaacgaACCTCCAGT
td22	TGAGCGCGAggctagctacaacgaCCTCAGTTT
td23	GGACCACAaggctagctacaacgaAGGTGGTTG
td24	CTTGGACCAggctagctacaacgaAACAGGTGG
td25	AAACTTGGAggctagctacaacgaCACAACAGG
td26	CTGATTAAAggctagctacaacgaTTGGACCAC
td27	TGGTGCTGAggctagctacaacgaTAACTTGG
td28	TGATGATCAggctagctacaacgaCTCTGTCTG
td29	TGGTGATGAggctagctacaacgaCATCTCTGT
td30	GCTTGGTGAggctagctacaacgaGATCATCTC
td31	ATGGGAACAggctagctacaacgaCCGCCGTCC
td32	GAATGGGAAggctagctacaacgaATCCGCCGT
td33	TGACAGGAAggctagctacaacgaGGGAACATC
td34	AGTAAATGAggctagctacaacgaAGGAATGGG
td35	CACAGTAAAggctagctacaacgaGACAGGAAT
td36	GCCCGGCCAggctagctacaacgaAGTAAATGA
td37	CCACAAACAggctagctacaacgaCCTGTAGTG
td38	GTCCACAAAggctagctacaacgaATCCTGTAG
td39	CCACGTCCAggctagctacaacgaAAACATCCT
td40	CCAAGACCAggctagctacaacgaGTCCACAAA
td41	CCACCAAGAggctagctacaacgaCACGTCCAC
td42	GCTGGTCCAggctagctacaacgaCAAGACCAC
td43	GCTCTGGTAggctagctacaacgaCGCCAGTGG
td44	CTGCACCCAggctagctacaacgaTTGCCGCTC
td45	CACACTGCAggctagctacaacgaCCAATTGCC
td46	CTTTCCACAggctagctacaacgaTGCACCCAC
td47	GCCTTTCCAggctagctacaacgaACTGCACCC
td48	TTCTTGCAggctagctacaacgaGCTGCCCTC

Name	DNAzyme Sequenz
TD49	GTGGACGTAggctagctacaacgaAGGCGGTTT
TD50	CCGGGTGGAggctagctacaacgaGTACAGGCG
TD51	CCTGGCGCAggctagctacaacgaCCAGTGCGC
TD52	CAAATGAAAggctagctacaacgaTTCCTGGCG
TD53	TTCCCAAaggctagctacaacgaGAAACTTCC
TD54	ATTGTTGGAggctagctacaacgaGCCCCCTTG
TD55	TGGGTCACAggctagctacaacgaTGTGGACG
TD56	TCTGGGTCAggctagctacaacgaATTGTTGGA
TD57	GCACAATCAggctagctacaacgaCTGGGTCAC
TD58	GGAGCACAaggctagctacaacgaCATCTGGGT
TD59	ACTGGAGCAggctagctacaacgaAATCATCTG
TD60	ATGGAGGGAggctagctacaacgaTGGAGCACA
TD61	TGGTACTTAggctagctacaacgaGGAGGGACT
TD62	GGGCTGGTAggctagctacaacgaTTATGGAGG
TD63	TCAACGATAggctagctacaacgaGCAGCCGGG
TD64	CCTCAACGAggctagctacaacgaATGCAGCCG
TD65	TCACCTCAaggctagctacaacgaGATATGCAG
TD66	CGTCGTTCAggctagctacaacgaCTCAACGAT
TD67	GTAAAGATAggctagctacaacgaGCGTGTTGG
TD68	AAGTAAAGAggctagctacaacgaATGCGTGTT
TD69	GGCAATGAaggctagctacaacgaTGGGTTTCT
TD70	TCACGGCAaggctagctacaacgaGAACTGGGT
TD71	AGGCAGTCaggctagctacaacgaGGCAATGAA
TD72	ATCTCGGCAggctagctacaacgaTCTGGTAGG
TD73	GCTGAGTAAggctagctacaacgaCTCGGCATT
TD74	TATTATCAaggctagctacaacgaTTTCAGCTG
TD75	GGTTATTAggctagctacaacgaCAATTTTCA
TD76	AAGGGGTTAggctagctacaacgaTATCAATTT
TD77	CTCCCGAAaggctagctacaacgaCCTTTGGCA
TD78	GTACATGGAggctagctacaacgaTCAAAGTTC

Fig. 8

Multiple Sequenz Alignments T-bet

Seq_1	1	<u>CGGCCCGCTGGAGAGGAAGCCCGAGAGCTGCCGCGCGCCTGCCGGACGAGGGCGTAGAAG</u>	60
Seq_2	1	<u>CGGCCCGCTGGAGAGGAAGCCCGAGAGCTGCCGCGCGCCTGCCGGACGAGGGCGTAGAAG</u>	60
Seq_1	61	CCAGGCGTCAGAGCCCAGGCTCCGGTGGGGTCCCCACCCGGCCCTCGGGTCCCCCGCC	120
Seq_2	61	CCAGGCGTCAGAGCCCAGGCTCCGGTGGGGTCCCCACCCGGCCCTCGGGTCCCCCGCC	120
Seq_1	121	CCTGCTCCCTGCCATCCAGCCACGCGACCCCTCTCGCGCGGAGGGGGCGGGTCTCTCG	180
Seq_2	121	CCTGCTCCCTGCCATCCAGCCACGCGACCCCTCTCGCGCGGAGGGGGCGGGTCTCTCG	180
Seq_1	181	ACGGCTACGGGAAGGTGCCAGCCCAGCCCGGATGGGCATCGTGGAGCCGGGTGCGGAGA	240
Seq_2	181	ACGGCTACGGGAAGGTGCCAGCCCAGCCCGGATGGGCATCGTGGAGCCGGGTGCGGAGA	240
Seq_1	241	CATGCTGACGGGCACCGAGCCGATGCCGGGAGCGACGAGGGCCGGGCGCTGGCGCCGA	300
Seq_2	241	CATGCTGACGGGCACCGAGCCGATGCCGGGAGCGACGAGGGCCGGGCGCTGGCGCCGA	300
Seq_1	301	CCCCGAGCAGCGCTACTTCTACCCGGAGCCGGCGCGCAGGACCGGACGAGCGTCCGGG	360
Seq_2	301	CCCCGAGCAGCGCTACTTCTACCCGGAGCCGGCGCGCAGGACCGGACGAGCGTCCGGG	360
Seq_1	361	GGGCGGCAGCCTGGGGTCTCCCTACCCGGGGGGCGCCTTGGTGCCCGCCCCGCGAGCCG	420
Seq_2	361	GGGCGGCAGCCTGGGGTCTCCCTACCCGGGGGGCGCCTTGGTGCCCGCCCCGCGAGCCG	420
Seq_1	421	CTTCCTTGGAGCCTACGCCTACCCGCGCGACCCAGGCGGCCGGCTTCCCCGGCGCGGG	480
Seq_2	421	CTTCCTTGGAGCCTACGCCTACCCGCGCGACCCAGGCGGCCGGCTTCCCCGGCGCGGG	480
Seq_1	481	CGAGTCCTTCCCGCCCGCCGCGGACGCCGAGGGGTACCAGCCGGGCGAGGGCTACGCCGC	540
Seq_2	481	CGAGTCCTTCCCGCCCGCCGCGGACGCCGAGGGGTACCAGCCGGGCGAGGGCTACGCCGC	540
Seq_1	541	CCCGGACCCGCGCGCCGGGCTCTACCCGGGGCCGCGTGAGGACTACGCGCTACCCGCGGG	600
Seq_2	541	CCCGGACCCGCGCGCCGGGCTCTACCCGGGGCCGCGTGAGGACTACGCGCTACCCGCGGG	600
Seq_1	601	ACTGGAGGTGTCGGGGAACCTGAGGGTTCGCGCTCAACAACCACCTGTTGTGGTCCAAGTT	660
Seq_2	601	ACTGGAGGTGTCGGGGAACCTGAGGGTTCGCGCTCAACAACCACCTGTTGTGGTCCAAGTT	660
Seq_1	661	TAATCAGCACCAGACAGAGATGATCATCACAAGCAGGGACGGCGGATGTTCCCATTCCT	720
Seq_2	661	TAATCAGCACCAGACAGAGATGATCATCACAAGCAGGGACGGCGGATGTTCCCATTCCT	720
Seq_1	721	GTCATTTACTGTGGCCGGGCTGGAGCCACCAGCCACTACAGGATGTTTGTGGACGTGGT	780
Seq_2	721	GTCATTTACTGTGGCCGGGCTGGAGCCACCAGCCACTACAGGATGTTTGTGGACGTGGT	780
Seq_1	781	CTTGGTGGACCAGCACCCTGGCGGTACCAGAGCGGCAAGTGGGTGCAGTGTGAAAGGC	840
Seq_2	781	CTTGGTGGACCAGCACCCTGGCGGTACCAGAGCGGCAAGTGGGTGCAGTGTGAAAGGC	840
Seq_1	841	CGAGGGCAGCATGCCAGGAAACCGCCTGTACGTCCACCCGGACTCCCCAACACAGGAGC	900
Seq_2	841	CGAGGGCAGCATGCCAGGAAACCGCCTGTACGTCCACCCGGACTCCCCAACACAGGAGC	900
Seq_1	901	GCACCTGGATGCGCCAGGAAGTTTCATTTGGGAAACTAAAGCTCACAAACA <u>CAAGGGGGC</u>	960
Seq_2	901	GCACCTGGATGCGCCAGGAAGTTTCATTTGGGAAACTAAAGCTCACAAACA <u>CAAGGGGGC</u>	960
Seq_1	961	<u>GTCCAACAAT</u> GTGACCCAGATGATTGTGCTCCAGTCCCTCCATAAGTACCAGCCCCGGCT	1020
Seq_2	961	<u>GTCCAACAAT</u> GTGACCCAGATGATTGTGCTCCAGTCCCTCCATAAGTACCAGCCCCGGCT	1020
Seq_1	1021	GCATATCGTTGAGGTGAACGACGGAGAGCCAGAGCCAGCCTGCAACGCTTCCAACACGCA	1080
Seq_2	1021	GCATATCGTTGAGGTGAACGACGGAGAGCCAGAGCCAGCCTGCAACGCTTCCAACACGCA	1080
Seq_1	1081	TATCTTTACTTTCCAA <u>AGAAACCCAGTTCATTGCCGTG</u> ACTGCCTACCAGAAATGCCGAGAT	1140
Seq_2	1081	TATCTTTACTTTCCAA <u>AGAAACCCAGTTCATTGCCGTG</u> ACTGCCTACCAGAAATGCCGAGAT	1140
Seq_1	1141	TACTCAGCTGAAAATTGATAATAACCCCTTGGCCAAAGGATTCGGGAGAACTTTGAGTC	1200
Seq_2	1141	TACTCAGCTGAAAATTGATAATAACCCCTTGGCCAAAGGATTCGGGAGAACTTTGAGTC	1200
Seq_1	1201	CATGTACACATCTGTTGACACCAGCATCCCTCCCGCCTGGACCCAACCTGTCATTCCT	1260
Seq_2	1201	CATGTACACATCTGTTGACACCAGCATCCCTCCCGCCTGGACCCAACCTGTCATTCCT	1260
Seq_1	1261	TGGGGGAGATCACTACTCTCTCTCTACCCAACCAGTATCCTGTTCCAGCCGCTTCTA	1320
Seq_2	1261	TGGGGGAGATCACTACTCTCTCTCTACCCAACCAGTATCCTGTTCCAGCCGCTTCTA	1320
Seq_1	1321	CCCCGACCTTCCCTGGCCAGGCGAAGGATGTGGTTCCCCAGGCTTACTGGCTGGGGGGCCC	1380
Seq_2	1321	CCCCGACCTTCCCTGGCCAGGCGAAGGATGTGGTTCCCCAGGCTTACTGGCTGGGGGGCCC	1380
Seq_1	1381	CCGGGACCACAGCTATGAGGCTGAGTTTCGAGCAGTCAGCATGAAGCCTGCATTCTTGCC	1440
Seq_2	1381	CCGGGACCACAGCTATGAGGCTGAGTTTCGAGCAGTCAGCATGAAGCCTGCATTCTTGCC	1440

Seq_1	1441	CTCTGCCCTGGG <u>CCCACCATGTCTACTACCG</u> AGGCCAGGAGGTCTGGCACCTGGAGC	1500
Seq_2	1441	CTCTGCCCTGGGCCACCATGTCTACTACCGAGGCCAGGAGGTCTGGCACCTGGAGC	1500
Seq_1	1501	TGGCTGGCCTGTGGCACCCAGTACCCTCCCAAGATGGGCCCGGCCAGCTGGTTC <u>CG</u> GCCC	1560
Seq_2	1501	TGGCTGGCCTGTGGCACCCAGTACCCTCCCAAGATGGGCCCGGCCAGCTGGTTC <u>CG</u> GCCC	1560
Seq_1	1561	TATGCGGACTCTGCCCATGGAACCCGGCCCTGGAGGCTCAGAGGGACGGGGACCAGAGGA	1620
Seq_2	1561	TATGCGGACTCTGCCCATGGAACCCGGCCCTGGAGGCTCAGAGGGACGGGGACCAGAGGA	1620
Seq_1	1621	CCAGGGTCCCCC <u>CTGGTGTGGACTGAGATTG</u> CCCCATCCGGCCGGAATCCAGTGATTC	1680
Seq_2	1621	CCAGGGTCCCCCCTGGTGTGGACTGAGATTGCCCCCATCCGGCCGGAATCCAGTGATTC	1680
Seq_1	1681	AGGACTGGGCGAAGGAGACTCTAAGAGGAGGCGCGTGTCCCCCTATCCTTCCAGTGGTGA	1740
Seq_2	1681	AGGACTGGGCGAAGGAGACTCTAAGAGGAGGCGCGTGTCCCCCTATCCTTCCAGTGGTGA	1740
Seq_1	1741	CAGCTCCTCCCCTGCTGGGGCCCTTCTCCTTTTGATAAGGAAGCTGAAGGACAGTTTTA	1800
Seq_2	1741	CAGCTCCTCCCCTGCTGGGGCCCTTCTCCTTTTGATAAGGAAGCTGAAGGACAGTTTTA	1800
Seq_1	1801	TAACTATTTCCCAACTGAGCAGATGACATGATGAAAGGAACAGAAACAGTGTTATTAGG	1860
Seq_2	1801	TAACTATTTCCCAACTGAGCAGATGACATGATGAAAGGAACAGAAACAGTGTTATTAGG	1860
Seq_1	1861	TTGGAGGACACCGACTAATTTGGGAAACGGATGAAGGACTGAGAAGGCCCCCGCTCCCTC	1920
Seq_2	1861	TTGGAGGACACCGACTAATTTGGGAAACGGATGAAGGACTGAGAAGGCCCCCGCTCCCTC	1920
Seq_1	1921	TGGCCCTTCTCTGTTTAGTAGTTGGTTGGGGAAGTGGGGCTCAAGAAGGATTTTGGGGTT	1980
Seq_2	1921	TGGCCCTTCTCTGTTTAGTAGTTGGTTGGGGAAGTGGGGCTCAAGAAGGATTTTGGGGTT	1980
Seq_1	1981	CACCAGATGCTTCTTGGCCACGATGAAACCTGAGAGGGGTGTCCCCTTGCCCCATCCTC	2040
Seq_2	1981	CACCAGATGCTTCTTGGCCACGATGAAACCTGAGAGGGGTGTCCCCTTGCCCCATCCTC	2040
Seq_1	2041	TGCCCTAACTACAGTCGTTTACCTGGTGTGCGTCTTGCTTTTGGTTTCCAGCTGGAGAA	2100
Seq_2	2041	TGCCCTAACTACAGTCGTTTACCTGGTGTGCGTCTTGCTTTTGGTTTCCAGCTGGAGAA	2100
Seq_1	2101	AAGAAGACAAGAAAGTCTTGGGCATGAAGGAGCTTTTTGCATCTAGTGGTGGGAGGGGT	2160
Seq_2	2101	AAGAAGACAAGAAAGTCTTGGGCATGAAGGAGCTTTTTGCATCTAGTGGTGGGAGGGGT	2160
Seq_1	2161	CAGGTGTGGGACATGGGAGCAGGAGACTCCACTTCTTCTTTGTACAGTAACTTCAAC	2220
Seq_2	2161	CAGGTGTGGGACATGGGAGCAGGAGACTCCACTTCTTCTTTGTACAGTAACTTCAAC	2220
Seq_1	2221	CTTTTCGTTGGCATGTGTGTTAATCCCTGATCCAAAAGAACAATAACAGTATGTTATA	2280
Seq_2	2221	CTTTTCGTTGGCATGTGTGTTAATCCCTGATCCAAAAGAACAATAACAGTATGTTATA	2280
Seq_1	2281	ACCATCAGCCCGCAGGGTCAGGAAAGGACTCACCTGACTTTGGACAGCTGGCCTGGGC	2340
Seq_2	2281	ACCATCAGCCCGCAGGGTCAGGAAAGGACTCACCTGACTTTGGACAGCTGGCCTGGGC	2340
Seq_1	2341	TCCCCCTGCTCAAACACAGTGGGGATCAGAGAAAAGGGGCTGGAAAGGGGGAAATGGCCC	2400
Seq_2	2341	TCCCCCTGCTCAAACACAGTGGGGATCAGAGAAAAGGGGCTGGAAAGGGGGAAATGGCCC	2400
Seq_1	2401	ACATCTCAAGAAGCAAGATATTGTTTGTGGTGGTTGTGTGGGTGTGTGTTTTTCTTT	2460
Seq_2	2401	ACATCTCAAGAAGCAAGATATTGTTTGTGGTGGTTGTGTGGGTGTGTG-----	2450
Seq_1	2461	TTCTTTCTTTTTATTTTTTTTGAATGGGGAGGCTATTTATTGTAAGTGGTGTCT	2520
Seq_2	****	-----	****
Seq_1	2521	GGATATATTCCTTTTGTCTTCATCACTTCTGAAAATAAACATAAAACTGTTAAAAAAA	2580
Seq_2	****	-----	****
Seq_1	2581	AAAAAAAAA	2589
Seq_2	****	-----	****

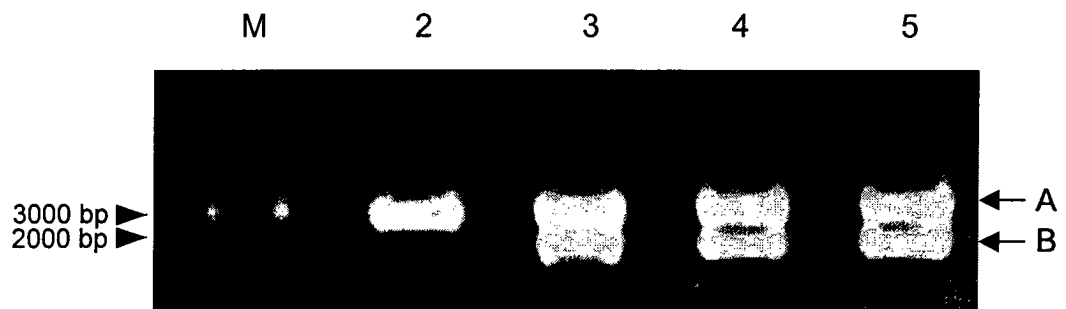


Fig. 9

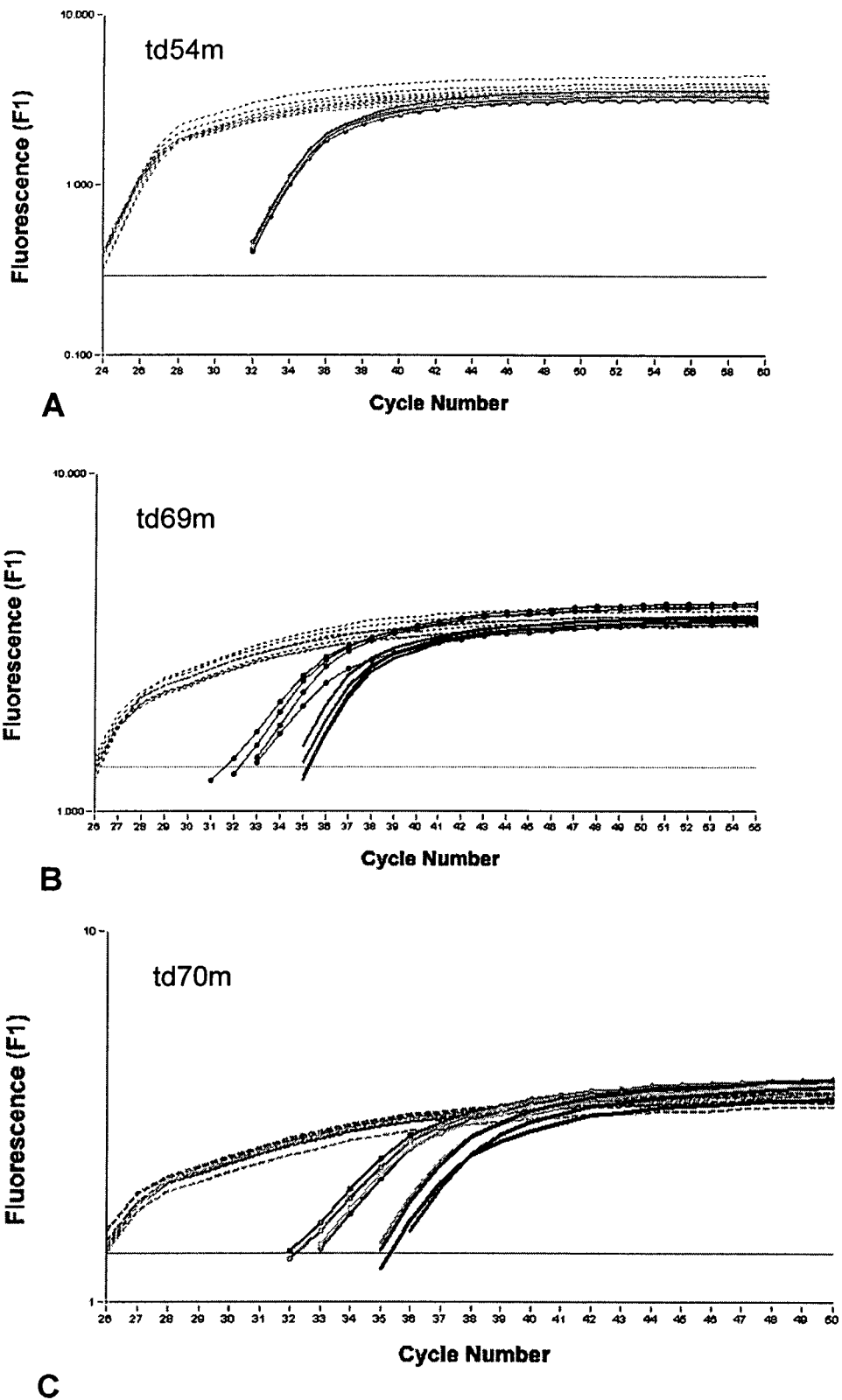


Fig. 10

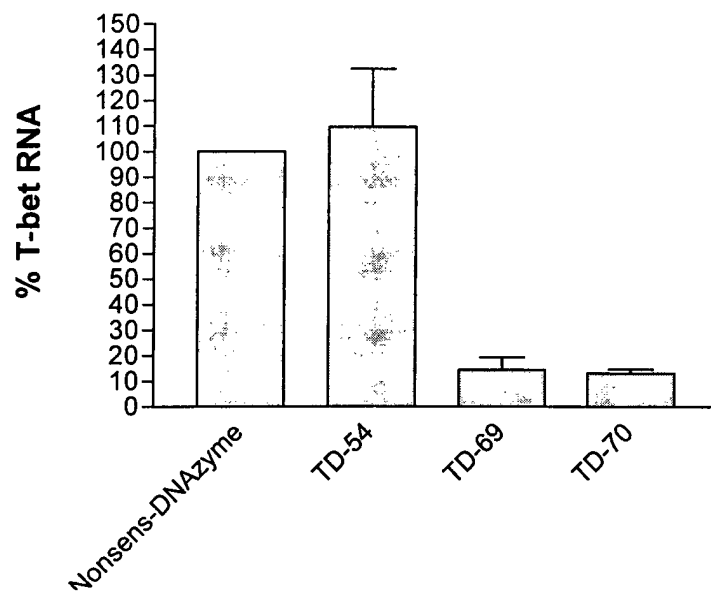


Fig. 11