

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
28. März 2002 (28.03.2002)

PCT

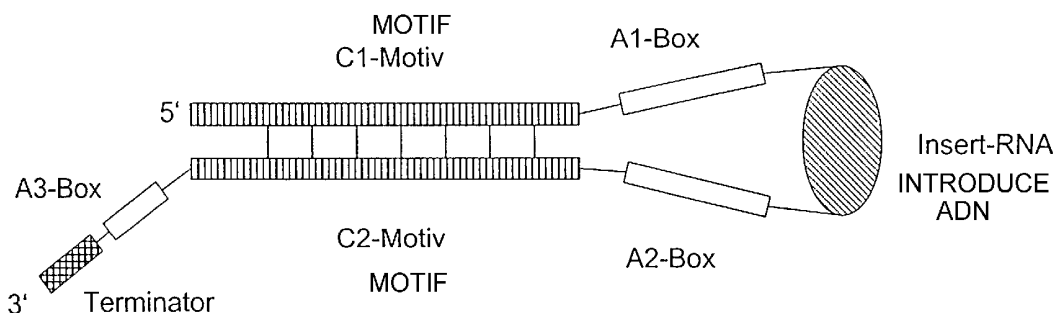
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/24931 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/85, 15/82, 15/11, A61K 48/00
- (74) **Anwalt:** BOHMANN, Armin, K.; Bohmann & Loosen, Sonnenstrasse 8, 80331 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/10905
- (81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum:
20. September 2001 (20.09.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
100 46 913.2 21. September 2000 (21.09.2000) DE
- (84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US):** NASCACELL GMBH [DE/DE]; Bahnhofstrasse 9 - 15, 82327 Tutzing (DE).
- (72) **Erfinder; und**
- (75) **Erfinder/Anmelder (nur für US):** BLIND, Michael [DE/DE]; Seinsheimstrasse 11, 81245 München (DE).
FAMULOK, Michael [DE/DE]; Leonardusstrasse 26, 53175 Bonn (DE).
- Veröffentlicht:**
— mit internationalem Recherchenbericht

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title:** EXPRESSION SYSTEM FOR FUNCTIONAL NUCLEIC ACIDS

(54) **Bezeichnung:** EXPRESSIONSSYSTEM FÜR FUNKTIONALE NUKLEINSÄUREN



(57) **Abstract:** The invention relates to a nucleic acid sequence for expressing a nucleic acid to be inserted into the nucleic acid sequence, whereby the nucleic acid sequence comprises, in the 5' - 3' direction, the following elements: a C1-motif, an A1 box, an A2 box, a C2 motif, an A3 box, and a terminator, whereby the C1 motif and the C2 motif, together, form a helix; the A1 box comprises k bases, whereby k, independent of l and m, is an integer ranging from 0 to 100; the A2 box comprises l bases, whereby l, independent of k and m, is an integer ranging from 0 to 100, and the A3 box comprises m bases, whereby m, independent of k and l, is an integer ranging from 0 to 20.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft eine Nukleinsäuresequenz zur Expression einer in die Nukleinsäuresequenz zu inserierende Nukleinsäure, wobei die Nukleinsäuresequenz in 5' - 3' - Richtung die folgenden Elemente umfasst: ein C1-Motiv, eine A1-Box, eine A2-Box, ein C2-Motiv, eine A3-Box, und einen Terminator, wobei das C1-Motiv und das C2-Motiv zusammen eine Helix ausbilden; die A1-Box k Basen umfasst, wobei k unabhängig von l und m eine ganze Zahl von 0 bis 100 ist; die A2-Box l Basen umfasst, wobei l unabhängig von k und m eine ganze Zahl von 0 bis 100 ist; und die A3-Box m Basen umfasst, wobei m unabhängig von k und l eine ganze Zahl von 0 bis 20 ist.

WO 02/24931 A1



— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Expressionssystem für funktionale Nucleinsäuren

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Nucleinsäuresequenz zur Expression einer darin zu inserierenden Nucleinsäure, eine diese Nucleinsäuresequenz umfassendes Expressionssystem, einen diese umfassender Vektor, eine diese umfassende Zelle und ein diese umfassendes transgenes Tier und transgene Pflanze. Weiterhin betrifft die Erfindung verschiedene Verwendungen der erfindungsgemäßen Nucleinsäuresequenz.

Aufgrund ihrer vielfältigen Eigenschaften wurden RNA-Moleküle in jüngster Zeit zur Modulation intrazellulärer Prozesse eingesetzt. Beispielsweise kann die Translation von Proteinen durch Antisense-RNA, die mit der kodierende mRNA hybridisiert, blockiert werden (Übersichtsartikel: Mesmaeker et al., Acc. Chem. Res. 28 (1995), 366-374). Durch einen vergleichbaren Mechanismus wirken katalytisch aktive Ribozyme wie Hammerhead- oder Hairpinribozyme, die sich an komplementäre Bereiche an mRNAs anlagern können und ihre Ziel-RNA durch Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen zerstören (Castanotto et al., Advances Pharmacol. 25 (1994), 289-317; Rossi, Tibtech 13 (1997), 301-305). Diese Applikationen haben solche funktionalen RNA-Moleküle besonders interessant für Anwendungen in der Gentherapie gemacht, der dadurch ein breiteres Anwendungsfeld eröffnet wird als ausschließlich fehlende oder mutierte Gene für Proteine zu ersetzen. Antisense-Nucleinsäuren und Ribozyme wirken in der Gentherapie nicht durch die Expression eines essentiellen, fehlenden Proteins, sondern wirken direkt auf in der Zielzelle exprimierte Moleküle. Meist werden die RNA-Moleküle zur Inhibition der Translation von Proteinen verwendet, die durch unnatürliche Expression eine bestimmte Krankheit hervorrufen oder von Pathogenen, wie Viren, für ihren Lebenszyklus benötigt werden.

Zur Krebs-Therapie wurde beispielsweise eine 900 Nucleotide lange Antisense-RNA gegen das bei Pankreaskrebs auftretende CaSm-Onkogen getestet (Kelley et al., Surgery 128 (2000), 353-60). Als Vektoren wurden rekombinante Adenoviren eingesetzt. Durch die Antisensekonstrukte konnte die in vitro Proliferation von PC-Zelllinie um bis zu 93% reduziert werden. In vivo konnte das Tumorwachstum in Mausmodellen durch intratumorale Injektion um 40% reduziert werden und die durchschnittliche Überlebensrate von 35 auf 60 Tage erhöht werden.

In einem Infektionsmodell zur anti-HIV-Therapie wurde die Produktion von HIV-Viren in Zellkultursystemen durch multigene Antisense-RNAs, die gegen mehrere Gene des HIV-Genoms gerichtet waren, um 81% bis 91% inhibiert (Shahabuddin und Khan, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 10 (2000), 141-51).

Ebenso wurden in klinischen Studie anti-*tat* oder doppelte anti-*tat* und *-rev* Hammerhead-Ribozyme zur anti-HIV Therapie getestet. Durch den Abbau der Tat- und Rev-RNA in den infolge der Behandlung transgenen CD 4+ T-Zellen wurden die entsprechenden Proteine nicht gebildet und die Replikation der Viren konnte nicht stattfinden. Derartige transgene CD4+ T-Zellen können die Infektion mit HIV überleben. In den klinischen Experimenten wurden CD4+ T-Zellen von Patienten mit den Ribozymen transduziert und wieder in die Patienten zurückgegeben. Die derart veränderten Zellen konnten noch nach 10 Monaten in den Patienten gefunden werden (Amado et al., *Front. Biosci.* 15 (1999), D468-475).

Weitere Ribozyme, die etwa gegen die RNA-Komponente der Telomerase oder das Bcr-Abl-Onkogen gerichtet waren, wurden auch in therapeutischen Ansätzen zur Bekämpfung von Krebszellen eingesetzt (Yokoyama et al., *Cancer res.* 58 (1998), 5406-5410; Snyder et al., *Blood* 82 (1993), 600-605; Wright et al., *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 8 (1998), 15-23).

Eine andere vielversprechende Klasse von funktionalen RNA-Molekülen sind Nukleinsäureliganden, insbesondere RNA-Liganden, die spezifisch an intrazelluläre Proteine binden können und deren Aktivität direkt inhibieren. Diese Nukleinsäureliganden können entweder natürlich vorkommende RNA-Motive sein, die durch Überexpression die Bindung einer endogenen zellulären Nukleinsäure, insbesondere RNA an ihren Interaktionspartner kompetitiert, oder neue durch in vitro Selektion erzeugte, sogenannte Aptamere, wobei Aptamere sowohl auf RNA- als auch auf DNA-Basis existieren. Aptamere konnten in zahlreichen Experimenten gegen eine Reihe von Proteinen, ob von Natur aus nukleinsäurebindend oder nicht, durch den in vitro Selektionsprozeß (oder auch SELEX für "systematic evolution of ligands by exponential enrichment") isoliert werden (Übersichtsartikel: Gold et al., *Annu. Rev. Biochem.* 64 (1995), 763-797; Ellington und Conrad, *Biotechnol. Annu. Rev.* 1 (1995), 185-214; Famulok und Mayer, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 243 (1999), 123-36).

Beispielsweise wurden zur Inhibition des Tat-Transaktivatorproteins von HIV sowohl eine 27 Nukleotide lange Sequenz der natürlichen Interaktionsdomäne des viralen Tar-RNA-Elements als auch ein de novo isoliertes anti-Tat Aptamer eingesetzt (Bohjanen, Nucleic Acid Res. 24 (1996), 3733-3738; Yamamoto et al., Genes Cells 5 (2000), 371-88). Im letzteren Fall wurde die Bindung des Tat- Proteins an das natürliche TAR-RNA-Element (sowohl TAR-1 als auch TAR-2) spezifisch kompetitiert und die von Tat abhängige Transktivierung *in vitro* und *in vivo* stark inhibiert. Ähnliche Resultate konnten mit Nukleinsäureliganden gegen das HIV-Rev-Protein erzielt werden, das für den Transport der viralen RNAs aus dem Zellkern ins Zytoplasma verantwortlich ist. Durch Überexpression eines anti Rev-Liganden konnte die Replikation der HIV-Viren in Zellkulturexperimenten blockiert werden (Good et al., Gene Therapy 4 (1997), 45-54).

In *Drosophila melanogaster* wurden Aptamere erstmals in einem transgenen Tiermodell untersucht. Die gegen das am Spleißen (engl.: splicing) beteiligte Protein B52 gerichteten Aptamere waren in der Lage, in der Fruchtfliege den gleichen Phänotyp wie der entsprechende genetische Knock-Out zu induzieren und die Effekte der Überexpression des B52-Proteins zu kompensieren (Shi et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 96 (1999), 10033-10038).

Ebenso konnte mit Aptameren gegen die cytoplasmatische Domäne der CD18-Integrinuntereinheit in humanen Leukozyten ein nicht von Natur aus mit Nukleinsäuren wechselwirkendes Signaltransduktionsprotein inhibiert und damit die Signalkaskade in den Leukozyten unterbrochen werden, die zur Aktivierung der CD18 Integrinrezeptoren und zur Adhäsion der Zellen an den natürlichen Liganden ICAM-1 („intracellular adhesion molecule-1“) (Blind et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999), 3606-3610) führt.

Aufgrund dieser positiven Ergebnisse werden Aptamere als effektive Modulatoren der Funktion von Proteinen diskutiert, die zur Untersuchung des zellulären Proteoms oder in therapeutischen Ansätzen eingesetzt werden können. Neueste Ergebnisse zeigen, daß Aptamere gerade auch gegen intrazelluläre Zielmoleküle mit großem Erfolg eingesetzt werden können. Diese auch Intramere (intrazelluläre Aptamere) genannten Modulatoren könnten in gentherapeutischen Ansätzen oder in transgenen Organismen eingesetzt werden (Platt, Nature 392 (1998), 11-17; Famulok et al., Acc. Chem. Res. 33 (2000), 591-599). Gerade aber für transgene Tiere und bei der Gentherapie müssen für die Expression von funktionalen Nukleinsäuren spezifische

Expressionssysteme eingesetzt werden, die eine effektive Transkription der Moleküle in einem eukaryontischen Zellhintergrund sicherstellen.

Für eine generelle Anwendung scheinen vor allem die Promotoren geeignet zu sein, die die zelluläre eukaryontische Transkriptionsmaschinerie benutzen, da in diesem Fall nicht auch noch eine fremde Polymerase in den Zellen exprimiert werden muß. In eukaryontischen Zellen werden verschiedene RNA-Klassen durch unterschiedliche RNA-Polymerasen (Pol) transkribiert. RNA-Polymerase-I transkribiert beispielsweise die Gene der großen ribosomalen rRNA-Untereinheiten, RNA-Polymerase-II mRNAs und RNA-Polymerase-III die Gene verschiedener kleiner Ribonukleinsäuren

Für die Transkription von Ribozymen wurden beispielsweise RNA-Polymerase-II und -III Promotoren aus eukaryontischen und viralen Systemen oder rein virale Transkriptionseinheiten wie Bakteriophagen- oder Poxvirenpromotoren eingesetzt (Cheetham GM, et al., *Curr Opin Struct Biol.* 10 (2000), 117-123; Chakrabarti S, et al., *Biotechniques.* 23 (1997), 1094-1097).

RNA-Polymerase-I Promotoren scheinen für die Expression von funktionalen Nukleinsäuren nicht geeignet zu sein, da die Transkriptionseinheiten relativ kompliziert aufgebaut sind. Insbesondere zur Termination der Transkripte werden zusätzliche Proteinfaktoren benötigt, die an multiple Terminatorsequenzen binden. Zusätzlich werden die Transkripte teilweise durch Nukleasen während der Termination prozessiert. (Paule und White, *Nucleic Acid Res.* 28 (2000), 1283-1298). Daher scheint es schwierig, zuverlässige Systeme zu entwickeln, die eine definierte Termination der Transkripte erlauben. Zudem findet die Transkription der RNA-Polymerase-I-Transkriptionseinheiten in spezialisierten Kompartimenten, den Nucleoli statt. Dort werden die ribosomalen RNAs durch Nukleasen und RNA-Editing-Komplexe weiter prozessiert und assemblieren zu großen ribosomalen Komplexen (Olson et al., *Trends Cell Biol.* 10 (2000), 189-196). Diese Modifikationen könnten sich aber negativ auf die Integrität anderer zu exprimierender Nukleinsäuresequenzen auswirken.

Die Nachteile der Pol-II-Promotoren sind in den sehr unterschiedlich starken Transkriptionseffizienzen der individuellen Promotoren und die weit verbreitete Zelltypspezifität, d.h. die Abhängigkeit von nur in bestimmten Zelltypen exprimierten Transkriptionsfaktoren, zu sehen. Zudem werden die langen Transkripte in der Regel stark

prozessiert und assoziieren mit vielen multifaktoriellen Komplexen, wie der Splicingmaschinerie oder den Ribosomen. Zur Expression kleiner funktionaler RNAs sind dagegen die weitgehende Intaktheit des primären Transkripts und die weitgehende Freiheit von störenden Assoziationen mit zellulären Faktoren für die Aufrechterhaltung der eigentlichen Aktivität, z.B. Bindung des spezifischen zellulären Zielmoleküls wünschenswert.

RNA-Polymerase III Promotoren scheinen dagegen für die Expression funktionaler RNA's besser geeignet zu sein. Sie sind für die Transkription vieler kleiner RNA-Moleküle in eukaryontischen Zellen verantwortlich und in allen Zelltypen aktiv. Zudem sind sie in homologen RNA-Transkriptionseinheiten ubiquitär in allen eukaryontischen Spezies zu finden. Pol-III-Promotoren steuern die Transkription kleiner RNA wie tRNA, snRNA, snoRNA, 5S rRNA, oder kleiner viraler RNA, wie der adenoviralen VA-RNA. Ein weiterer Vorteil der RNA-Pol III-Promotoren sind ihre äußerst hohen Transkriptionsaktivitäten. Natürliche Transkripte akkumulieren in Zellen auf bis zu 10^5 bis 10^6 Moleküle pro Zelle. So werden von der U6 snRNA beispielsweise Expressionsniveaus von 400 000 Molekülen je Zelle erreicht (Weinberg und Peuman, J. Mol. Biol. 38 (1968),:289-304). Daher wurden Pol-III-Transkriptionseinheiten zur auch zur Expression von fremden RNA-Molekülen eingesetzt (Übersichtsartikel: Couture und Stinchcomb, TIG 12 (1996), 510-514; Rossi, Tibtech 13 (1995), 301-305; Bramlage et al., Tibtech 16 (1998), 434-438). Eine ideale Expressionskassette für funktionale RNA-Moleküle sollte mehrere Punkte in sich vereinigen: i) hohe zelluläre Expressionslevel, ii) Erhaltung der funktionalen Eigenschaften des exprimierten RNA-Moleküls, iii) Kolokalisierung mit dem zellulären Zielmolekül.

In Experimenten mit Ribozymen konnte gezeigt werden, dass für hohe Expressionsniveaus neben der Verwendung der Pol-III-Promotoren eine Stabilisierung der Transkripte gegen die Degradation durch intrazelluläre Nukleasen nötig ist. Zu diesem Zweck wurde die funktionalen RNA-Sequenzen meist im Kontext von Teilen kleiner natürlicher RNA-Moleküle in cis eingesetzt, um die Transkripte durch die zusätzlichen kompakten Sequenzmotive zu stabilisieren. Durch Anfügen von kompakten Sequenzen aus tRNA oder U6-RNA konnten deutlich höhere Transkriptionsausbeuten von Ribozymtranskripten erzielt werden (Lee et al., Gene Ther. 2 (1995),377-384, Zouh et al., Thompson et al., Nucleic acid res. 23, 2259-2268; Bertrand et al., RNA 3 (1997), 75-88). In analoger Weise wurden auch schon Nukleinsäureliganden gegen das virale Rev-Protein und die zytoplasmatische Domäne des CD18-Integrinuntereinheit durch

kompakte, flankierende Stemloopsequenzen stabilisiert (Good et al., *Gene Ther.* 4 (1997), 45-54; Blind et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999), 3606-3610).

Bei Antisense-Ribozymen wurde auch gezeigt, dass die zelluläre Kolokalisierung mit dem Zielmolekül für die effektive Inhibition der Ziel-mRNA notwendig ist (Sullenger und Chech, *Science* 262 (1993), 1566-1569; Bertand und Rossi, *Nucleic Acids Mol. Biol.*, 10 (1996), 301-314; Bertrand et al., *RNA* 3 (1997), 75-88). Um die Lokalisierung zu steuern, wurden ebenfalls natürliche RNA-Sequenzen, wie tRNA-, U6-RNA, retrovirale oder mRNA-Konstrukte verwendet, um die Ribozym-RNA zu bestimmten Kompartimenten zu transportieren.

Die zelluläre Transkription findet grundsätzlich im Kern statt. Viele RNA-Spezies, wie mRNA, tRNA, kleine virale RNAs oder ribosomale RNA werden aber ins Zytoplasma transportiert. Es wird angenommen, dass die zytoplasmatische oder nukleäre Lokalisation von zwei balancierten Mechanismen, der Retention im Kern und dem aktiven Transport ins Zytoplasma abhängen (Schmidt-Zachmann et al., *Cell*. 74 (1993), 493-504; Custodio et al., *EMBO J.* 18 (1999), 2855-2866). Grundsätzlich sind verschiedene Mechanismen dafür verantwortlich, unterschiedliche RNA-Klassen (rRNA, mRNA, snRNA und tRNA) aus dem Kern ins Zytoplasma zu exportieren (Jarmolowski et al., *J. Cell. Biol.* 124 (1994), 627-635; Pokrywka et al., *J. Biol. Chem.* 270 (1995), 3619-3624, Dargemont und Kuhn, *J. Cell. Biol.* 118 (1992), 1-9). Für den Transport werden die unterschiedlichen Klassen von spezifischen Transportmaschinerien erkannt. So bilden beispielsweise tRNAs Komplexe mit den Exportfaktoren Xpo-t und dem kleinen G-Protein Ran in seiner GTP-gebundenen Form (Ran-GTP) (Hutay et al., *Mol. Cell.* 1 (1998), 359-369, *Mol. Cell. Biol.* 18 (1998), 6374-6386), und werden durch die Kernporen ins Zytoplasma transportiert. Auf ähnliche Weise werden ternäre Komplexe aus Ran-GTP, Exportin-1, verschiedenen Adaptorproteinen und 5S rRNA oder den UsnRNAs in Vertebraten aus dem Zellkern exportiert (Fornerod et al., *Cell* 90 (1997), 1051-60). Über die Strukturen in den RNA-Molekülen, die an diese spezifischen Exportmaschinerien binden, ist bislang allerdings wenig bekannt. Daher ist auch das gezielte Einführen derartiger Exportmotive in Expressionskassetten für kleine funktionale Fremd-RNAs bislang schwierig.

Obwohl bislang signifikante Fortschritte bei der endogenen Expression von katalytischen RNA-Molekülen gemacht wurden, konnte bislang kein Expressionssystem entwickelt werden, das alle Ansprüche für die effiziente Expression, nämlich hohe Expressionsniveaus, funktionale Konstrukte und gezielte Lokalisierung in sich vereinigt. Darüberhinaus wurden bislang kaum

Expressionssysteme für die Transkription von Nukleinsäureliganden, die eine andere Klasse von funktionalen RNA-Molekülen darstellen, entwickelt.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Expressionssystem bereitzustellen, das die Expression von funktionalen Nukleinsäuren erlaubt. Eine weitere Aufgabe ist es, ein Expressionssystem bereitzustellen, das die Kompartiment-spezifische Expression von funktionalen Nukleinsäuren erlaubt. Schließlich ist es eine Aufgabe der Erfindung, ein Expressionssystem bereitzustellen, das die Expression funktionaler Nukleinsäuren in allen erwünschten Geweben erlaubt.

Des weiteren besteht die Aufgabe darin, ein Expressionssystem bereitzustellen, das in einer Wirtszelle aktiv ist, ohne dass die Wirtszelle mit weiteren, für die Expression, insbesondere Transkription, der funktionalen Nukleinsäure erforderlichen Proteinen versehen werden muß.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe gelöst durch eine Nukleinsäuresequenz zur Expression einer in die Nukleinsäuresequenz zu inserierenden Nukleinsäure, wobei die Nukleinsäuresequenz in 5'-3'-Richtung die folgenden Elemente umfasst:

ein C1- Motiv,
eine A1-Box,
eine A2-Box,
ein C2-Motiv,
eine A3-Box, und
einen Terminator,

wobei das C1-Motiv und das C2-Motiv zusammen eine Helix ausbilden;

die A1-Box k Basen umfasst, wobei k unabhängig von l und m eine ganze Zahl von 0 bis 100 ist;

die A2-Box l Basen umfasst, wobei l unabhängig von k und m eine ganze Zahl von 0 bis 100 ist; und

die A3-Box m Basen umfasst, wobei m unabhängig von k und l eine ganze Zahl von 0 bis 20 ist.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass

k unabhängig von l und m eine ganze Zahl von 0 bis 20, bevorzugterweise von 5 bis 15 ist;

l unabhängig von k und m eine ganze Zahl von 0 bis 20, bevorzugterweise von 5 bis 15 ist; und

m unabhängig von k und l eine ganze Zahl von 0 bis 9 ist.

In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass

das C1-Motiv n Basen umfasst, wobei n unabhängig von p, k, l und m eine ganze Zahl ≥ 10 ist und

das C2-Motiv p Basen umfasst, wobei p unabhängig von n, k, l und m eine ganze Zahl ≥ 10 ist.

In einer noch weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass

n unabhängig von p, k, l und m eine ganze Zahl ≥ 16 , bevorzugterweise ≥ 20 ist und

p unabhängig von n, k, l und m eine ganze Zahl ≥ 16 , bevorzugterweise ≥ 20 ist.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass die von C1 und C2 zusammen gebildete Doppelhelix mindestens 10 Basenpaarungen umfasst.

Weiterhin kann erfindungsgemäß vorgesehen sein, dass der Terminator ein Terminator für die RNA-Polymerase III ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, dass der Terminator vier oder mehr aufeinanderfolgende Uridin-Basen für den Fall, dass die Nukleinsäuresequenz eine RNA-Sequenz ist, und vier oder mehr aufeinanderfolgende Thymidin-Basen umfasst, für den Fall, dass die Nukleinsäuresequenz eine DNA-Sequenz ist.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz kann weiter einen Promotor umfassen, insbesondere einen Promotor für RNA-Polymerase III.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, dass der Promotor ausgewählt ist aus der Gruppe, die Promotoren von 5S-RNA-Genen, U6 sn RNA-Promotoren, tRNA-Promotoren, 7 SL-RNA-Promotoren und VA-RNA-Promotoren umfasst.

In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass die Nukleinsäuresequenz weiter die zu inserierende Nukleinsäure umfasst, wobei die zu inserierende Nukleinsäure bevorzugterweise zwischen der A1-Box und der A2-Box angeordnet ist.

Schließlich kann in einer Ausführungsform vorgesehen sein, dass die zu inserierende Nukleinsäure eine funktionale Nukleinsäure ist.

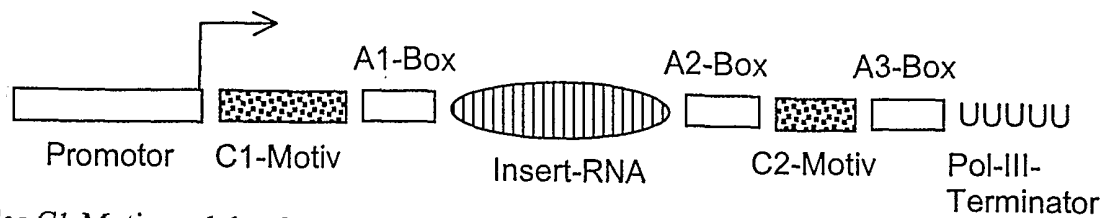
In einer bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, dass die funktionale Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Aptamere, Intramere, Aptamzyme, allosterische Zentren von Aptazymen und Ribozyme umfasst.

Des Weiteren kann vorgesehen sein, dass die funktionale Nukleinsäure mit einem Zielmolekül, insbesondere einem Nukleinsäure-Zielmolekül, über einen Mechanismus in Wechselwirkung tritt, der verschieden ist von komplementärer Basenpaarung.

In einem weiteren Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch ein erfindungsgemäßes Expressionssystem, das eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz umfasst.

In einer Ausführungsform kann vorgesehen sein, dass das Expressionssystem für die Expression, bevorzugterweise für die Transkription, einer funktionalen Nukleinsäure ist.

In einem weiteren Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch ein Expressionssystem für die Expression einer funktionalen Nukleinsäure umfassend die folgende Struktur:



wobei das C1-Motiv und das C2-Motiv zusammen eine Helix ausbilden;

die A1-Box k Basen umfasst, wobei k unabhängig von l und m eine ganze Zahl von 0 bis 100 ist;

die A2-Box l Basen umfasst, wobei l unabhängig von k und m eine ganze Zahl von 0 bis 100 ist; und

die A3-Box m Basen umfasst, wobei m unabhängig von k und l eine ganze Zahl von 0 bis 20 ist.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass

das C1-Motiv n Basen umfasst, wobei n unabhängig von p , k , l und m eine ganze Zahl ≥ 10 ist und

das C2-Motiv p Basen umfasst, wobei p unabhängig von n , k , l und m eine ganze Zahl ≥ 10 ist.

In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass die Werte von k , l , m , n und p dieselben sind wie bei der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz.

In einem weiteren Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch einen Vektor umfassend eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder ein erfindungsgemäßes Expressionssystem.

In einem noch weiteren Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch eine Zelle umfassend eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder ein erfindungsgemäßes Expressionssystem oder einen erfindungsgemäßen Vektor.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass die Zelle eine eukaryontische Zelle. Bevorzugterweise ist die eukaryontische Zelle *Saccharomyces cerevisiae*. In einer weiteren

bevorzugten. Ausführungsform ist die Zelle eine Oocyte von *Xenopus laevis*. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die eukaryontische Zelle eine Säugetierzelle.

In einer ganz besonders bevorzugten Form ist die Zelle eine menschliche Zelle.

In einer alternativen Ausführungsform ist die Zelle eine Pflanzenzelle.

In einem weiteren Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch ein transgenes Tier umfassend eine erfindungsgemäße Zelle.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass das transgene Tier ausgewählt ist aus der Gruppe, die Säugetiere, Fische, Insekten und Nematoden umfaßt.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, dass das transgene Tier ein Säugetier ist. Bevorzugterweise ist das Säugetier ausgewählt aus der Gruppe, die Mäuse, Ratten, Kaninchen, Hunde, Schweine, Schafe, Kühe, Pferde, Ziege, Esel, Kamele, Hühner und Affen umfasst.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Tier ein Nematode, bevorzugterweise *C. elegans*.

In einer weiteren Ausführungsform ist das Tier ein Fisch, bevorzugterweise ein Zebrafisch.

In einer noch weiteren Ausführungsform ist das Tier ein Insekt, bevorzugterweise *Drosophila melanogaster*.

In einer noch weiteren Ausführungsform ist das Tier ein Frosch, insbesondere *Xenopus laevis* oder mehrzellige Frühstadien davon.

In einem noch weiteren Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch eine transgene Pflanze umfassend eine erfindungsgemäße Zelle.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Pflanze ausgewählt aus der Gruppe, die Nutzpflanzen, Gemüsepflanzen, Reis, Weizen, Mais, Maniok, Kartoffel, Hirse, Soja, Tomaten, Baumwolle, Erbsen, Tabak, Bohnen und *Aradopsis thaliana*.

In einem weiteren Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure für die Targetvalidierung

In einem noch weiteren Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure für die Targetidentifizierung

In einem weiteren Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure für die Gentherapie.

In einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendungen ist die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz das erfindungsgemäße Expressionssystem.

In einem weiteren Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren zur gentherapeutischen Behandlung eines Organismus, wobei dem Organismus eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder ein erfindungsgemäßes Expressionssystem oder ein erfindungsgemäßer Vektor oder eine erfindungsgemäße Zelle verabreicht wird.

Schließlich wird die Aufgabe gelöst durch ein Medikament umfassend eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz und/oder ein erfindungsgemäßes Expressionssystem und/oder einen erfindungsgemäßen Vektor und/oder eine erfindungsgemäße Zelle.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure und deren verschiedenen hierin beschriebenen Verwendungen, insbesondere wenn diese als Expressionssystem verwendet wird, erlaubt eine effiziente Expression funktionaler Nukleinsäuren, d.h. ein hohes Expressionsniveaus, funktionale bzw. funktionsfähige Konstrukte und eine gezielte Lokalisierung.

Die Bezeichnungen Motiv C1, Motiv C2, Box A1, Box A2 und Box A3 werden hierin zur Definition der funktionalen Teile der erfindungsgemäßen Nukleinsäure bzw. des

erfindungsgemäßen Expressionssysteme verwendet und sind nicht notwendigerweise identisch mit den Motiven und Boxen, wie sie im Stand der Technik beschrieben sind.

Der Begriff „Motiv“, wie er insbesondere hierin im Zusammenhang mit den Begriffen „C1-Motiv“ und „C2-Motiv“ verwendet wird, bezeichnet hierin eine Abfolge von Nukleotiden, die mit einander kovalent, typischerweise über eine Phosphodiesterbindung, verbunden sind, mithin als Polynukleotid vorliegen. Der Begriff „Motiv“ wird darüber hinaus hierin neben der Bezeichnung für ein Polynukleotid bevorzugterweise auch in dem Sinne verwendet, dass er ein Polynukleotid umfassend mindestens zwei kovalent miteinander verknüpfte Nukleotide bezeichnet, wobei das Polynukleotid entweder als solches oder wenn es mit einer anderen chemischen Verbindung wie beispielsweise einem anderen Motiv, d.h. einem anderen Polynukleotid, in Wechselwirkung tritt eine Sekundär- oder Tertiärstruktur einnimmt. Wie hierin beschrieben treten das C1-Motiv und das C2-Motiv miteinander in Wechselwirkung und bilden insgesamt eine Helix aus.

Bei derartigen Motiven ist besonders beachtlich, dass die Sequenz der sie aufbauenden Nukleotide in der Regel durch den Wechselwirkungspartner bestimmt wird und/oder die auszubildende Sekundär- und/oder Tertiärstruktur. Soll beispielsweise eine Helix ausgebildet werden, kann ein Strang aus einer Abfolge von Cytosin-Resten und der zweite zur Ausbildung der Helix erforderliche Strang aus einer Abfolge von Guanosin-Resten bestehen. Die Auswahl einer konkreten Sequenz für ein Motiv ist somit im Rahmen der Fähigkeiten der Fachleute.

Der Begriff der „Box“, wie er hierin insbesondere verwendet wird, bezeichnet ebenfalls eine Abfolge von Nukleotiden, die mit einander kovalent, typischerweise über eine Phosphodiesterbindung, verbunden sind, mithin als Polynukleotid vorliegen. Dieses Polynukleotid hat in einer Nukleinsäure, in der es enthalten ist, in der Regel die Funktion, bestimmte andere Teile der Nukleinsäure, wie beispielsweise die Motive, voneinander zu trennen, sie relativ zu einander anzuordnen, sie miteinander zu verbinden oder sie so anzuordnen, dass die erforderliche oder erwünschte Sekundär- und/oder Tertiärstruktur ausgebildet wird. Die Sequenz der Boxen kann dabei in Abhängigkeit von der konkreten Aufgabe, die der Box im jeweiligen Fall zukommt, d.h. in Abhängigkeit vom jeweiligen Kontext, in den sie eingebaut werden soll, von den Fachleuten unter Befolgung bestimmter Auswahlkriterien festgelegt werden. Ein entscheidendes Kriterium ist insbesondere im

vorliegenden Fall, dass die Box selbst nicht mit den anderen Teilen der erfindungsgemäßen Nukleinsäure, die als Expressionssystem verwendet werden kann, in Wechselwirkung tritt und dabei die Ausbildung der für die Funktionalität der erfindungsgemäßen Nukleinsäure erforderlichen Sekundär- und/oder Tertiärstrukturen nicht blockiert, beispielsweise nicht an das C1-Motiv hybridisiert, das mit dem C2-Motiv unter Ausbildung einer Helix hybridisieren soll..“

Der Erfindung liegt die überraschende Erkenntnis zugrunde, dass die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz bzw. Nukleinsäure bzw. das diese umfassende Expressionssystem, das im folgenden auch als Pol-III-Helix-Expressionssystem bezeichnet wird, die zuverlässige Expression von Nukleinsäuren bzw. von Nukleinsäureliganden, die in das Expressionssystem inseriert vorliegen oder inseriert werden, in eukaryontischen Zellen erlaubt.

Die Erfindung umfasst ein strukturelles Motiv, das aus einer terminal angeordneten Helix besteht, die durch Basenpaarung des 5'-Endes und des 3'-Endes des Expressionskonstrukts entsteht. Die zu exprimierende funktionale Nukleinsäure wird hierbei von dieser terminal angeordneten Helix eingeschlossen.

Das erfindungsgemäße Expressionssystem und damit auch die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz kombiniert in bislang einmaliger Weise alle Eigenschaften, die für eine effektive Expression der funktionalen Nukleinsäure-Moleküle, typischerweise ein RNA-Molekül, benötigt werden. Folgende Eigenschaften charakterisieren das erfindungsgemäße Pol-III-Helix-Expressionssystem: i) die Struktur der insertierten funktionalen Nukleinsäure [RNA] und damit ihre Fähigkeit zur dreidimensionalen Interaktion mit ihren Bindungspartnern wird erhalten, ii) die rigide Struktur der terminalen Helix schützt das Expressionskonstrukt vor der Degradation durch intrazelluläre Nukleasen, iii) durch kleine Variationen der Struktur der

ausbilden, die mit Strukturen, bevorzugterweise komplementären Strukturen, auf anderen Molekülen wechselwirken. Bei den Nukleinsäureliganden kann es sich dabei um DNA-Nukleinsäuresequenzen, RNA-Nukleinsäuresequenzen oder chemisch modifizierte Formen von DNA- oder RNA-Nukleinsäuresequenzen handeln.

Der Begriff der funktionalen Nukleinsäuren kann dabei auch „fremde“ Nukleinsäuren umfassen, also solche Nukleinsäuren, die aufgrund ihrer definierten Sekundär- und Tertiärstrukturen dreidimensionale Kontaktflächen ausbilden, die mit Strukturen, bevorzugterweise komplementären Strukturen, auf anderen Molekülen wechselwirken, und als solches in dem zellulären Hintergrund natürlicherweise nicht vorkommen.

Andererseits kann der Begriff der funktionalen Nukleinsäuren auch solche Nukleinsäuren umfassen, die aufgrund ihrer definierten Sekundär- und Tertiärstrukturen dreidimensionale Kontaktflächen ausbilden, die mit Strukturen, bevorzugterweise komplementären, dreidimensionalen Strukturen, auf anderen Molekülen wechselwirken, und als solches im zellulären Hintergrund bereits vorkommen, wobei das Vorkommen darauf zurückführbar sein kann, dass die jeweilige Zelle bereits zu einem früheren Zeitpunkt transformiert wurde, dass die jeweilige Zelle eine derartige funktionale Nukleinsäure bereits als Teil ihrer natürlichen genetischen Ausrüstung in sich trägt, oder dass die jeweilige Zelle eine derartige funktionale Nukleinsäure infolge eines pathologischen Ereignisses, dem die Zelle unterworfen ist oder wurde, in sich trägt.

In einem weiteren Aspekt kann der Begriff der funktionalen Nukleinsäuren auch solche bevorzugterweise fremden Nukleinsäure-Moleküle, insbesondere RNA-Moleküle umfassen, die in Zellen eingeschleust werden und die daraufhin durch Interaktion mit zellulären Faktoren deren Funktion beeinflussen. Funktional kann in diesem Kontext alternativ oder kummulativ zu dem vorstehend Gesagtem auch bedeuten, dass die Nukleinsäure-Moleküle in der Lage sind, durch Bindung oder katalytisch Aktivität zelluläre Komponenten wie andere Nukleinsäuren (wie Deoxyribonukleinsäuren oder Ribonukleinsäuren) oder Proteine zu beeinflussen. Dabei können diese funktionalen Nukleinsäuren beispielsweise zu therapeutischen, diagnostischen Applikationen, der Validierung der Aufgabe intrazellulärer Komponenten, zur Identifizierung funktional wichtiger zellulärer Faktoren, zur Inhibition bestimmter Proteine in transgenen Organismen zum Zwecke gesteigerter Produktivität oder anderen Zwecken eingesetzt werden.

Beispiele für funktionale Ribonukleinsäuren umfassen Antisensmoleküle, Ribozyme, Aptamere oder Intramere.

Unter Nukleinsäureliganden sollen hierin auch bevorzugterweise einzelsträngige Nukleinsäuren verstanden werden, die durch definierte Sekundär- und Tertiärstrukturen dreidimensionale Motive ausbilden, die mit anderen Molekülen, insbesondere solchen, die eine strukturell komplementäre Oberfläche besitzen, spezifisch über Wasserstoffbrücken, elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen oder andere in Kontakt treten. Diese Wechselwirkungen über dreidimensionalen Motive wurden durch eine Vielzahl von aufgeklärten Strukturen bestätigt (Übersichtsartikel: Famulok, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9 (1999), 324-329; Nagai und Mattaj (Eds.), *RNA protein interactions* (1994) Oxford University Press; The RNA World Website at IMB Jena, www.imb-jena.de/RNA). Nukleinsäureliganden können natürlich vorkommende Motive, das heißt natürlich vorkommende Nukleinsäuresequenzen sein. Beispielsweise interagiert etwa das RRE ("rev responsive element") in der viralen RNA von HIV ("human immunodeficiency virus") mit dem viralen Rev-Protein und mediiert so den Export der RNA vom Zellkern ins Zytoplasma (Malim et al., *Nature* 338 (1989), 254-257; Cochrane et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990), 1198-1202). Ein anderes Beispiel ist das IRE-Motiv ("iron responsive element"), das in einigen mRNAs gefunden wird und durch Bindung des Proteins Aconitase im Zytoplasma die Stabilität der mRNAs reguliert (Cox et al., *EMBO J.* 10 (1991), 1891-1902; Kennedy et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992), 11730-11734; Henderson et al., *J. Biol. Chem.* 269 (1994), 17481-17489).

Beispiele für nicht natürlich vorkommende Nukleinsäureliganden sind in vitro selektierte Aptamere oder die allosterischen Zentren von Aptazyme (Hybridmoleküle aus Aptameren und Ribozymen, beispielsweise beschrieben von Robertson MP, et al., *Nucleic Acids Res.* 28 (2000), 1751-1759), die durch Bindung eines Liganden die katalytische Aktivität des Aptazyms regulieren.

Nukleinsäureliganden in Sinne der vorliegenden Erfindung sind insbesondere auch solche Nukleinsäuren, die an ein Target-Molekül mittels eines Mechanismus binden oder das Target-Molekül mittels eines Mechanismus erkennen, der verschieden ist vom Mechanismus der komplementären Basenpaarung. Dies gilt auch dann, wenn das Target-Molekül eine

Nukleinsäure ist. Unter Target soll hierin in diesem Zusammenhang ein Molekül verstanden werden, das mit dem Nukleinsäureliganden in Wechselwirkung tritt.

Die verschiedenen, vorstehend gegebenen Definitionen oder Aspekte des Begriffs Nukleinsäureligand können hierin sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination angewandt werden.

Unter Aptameren sollen hierin insbesondere einzelsträngige, hochaffine Nukleinsäureliganden verstanden werden, die durch die Anfang der 90-er Jahre entwickelte Technologie der *in vitro* Selektion oder SELEX (“systematic evolution of ligands by exponential enrichment”) (Tuerk und Gold, *Science* 249 (1990), 505-510) isoliert werden. Diese aus ssDNA oder ssRNA bestehenden Aptamere besitzen sehr hohe Affinitäten und Spezifitäten für ihre Zielmoleküle. Bis dato konnten zahlreiche dieser funktionalen Nukleinsäuren für eine Vielzahl von kleinen, organischen Verbindungen, Peptiden, Proteinen, oder komplexe Strukturen wie Viren und Zellen isoliert (Übersichtsartikel: Gold et al., *Annu. Rev. Biochem.* 64 (1995), 763-797; Ellington und Conrad, *Biotechnol. Annu. Rev.* 1 (1995), 185-214; Famulok und Mayer, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 243 (1999), 123-36; Famulok, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9 (1999), 324-329). Das hohe Potential der Technologie liegt in dem rein *in vitro* stattfindenden Prozeß der Aptamers Selektion. Die Nukleinsäureliganden werden aus kombinatorischen Bibliotheken von bis zu 10^{15} individuellen Sequenzen durch wiederholte Zyklen aus Kontakt mit dem Zielmolekül, Abtrennung aller nicht bindenden Nukleinsäuren und enzymatischer Amplifikation der mit dem Zielmolekül interagierenden Moleküle angereichert (Übersichtsartikel: Klug und Famulok, *Mol. Biol. Rep.* 20 (1994), 97-107; Conrad et al., *Mol. Diversity* 1 (1995), 69-78).

Die Selektion von RNA-Aptameren aus Bibliotheken von komplett oder teilweise randomisierten Sequenzen erfolgt beispielsweise über Affinitätschromatographie. Andere häufig angewandte Separationstechniken für RNA/Proteinkomplexe sind elektrophoretische Trennverfahren oder die Retention auf Nitrozellulosemembranen.

Viele der gegen Proteine selektierten Aptamere sind in der Lage, deren biologische Aktivität zu inhibieren. So wurden eine Reihe von Nukleinsäureliganden für Hormone und Wachstumsfaktoren wie bFGF (“basic fibroblast growth factor”), hTSH (“human thyroid stimulating hormone”) oder Vasopressin isoliert, die deren Bindung an ihre natürlichen

Rezeptoren und ihre biologische Wirkung blockieren (Jellinek et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 11227-11231; Lin et al., Nucleic Acid Res. 24 (1996), 3407-3413; Williams et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997), 11285-11290). Ebenso wurden effektive Enzyminhibitoren für Polymerasen, Proteasen, oder Phosphatasen identifiziert (Bock et al., Nature 355 (1992), 564-566; Schneider et al., Biochemistry 34 (1995), 9599-9610; Gal et al., Eur. J. Biochem. 252 (1998), 553-562; Bell et al., J. Biol. Chem. 273 (1998), 14309-14314).

Unter Intrameren sollen hierin solche Aptamere verstanden werden, die neben der reinen Bindung ihres Liganden spezifisch für den Einsatz im intrazellulären Milieu konstruiert worden sind. Beispielsweise können durch Verwendung rein viraler Expressionssysteme durch Anfügen von viralen RNA-Sequenzen und der Verwendung von viralen Promotoren eines kombinierten Systems aus dem Vacciniavirus und dem T7-Bakteriophagen Aptamere stabilisiert, mit hoher Transkriptionseffizienz und lokalisiert im Zytoplasma durch virale Polymerasen transkribiert werden und dort ihre Zielmoleküle binden (Blind et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999), 3606-3610). Unter Intramer sollen hierin insbesondere solche in vitro selektierten Aptamere verstanden werden, die durch Stabilisierung, Lokalisation, Expression, Anfügen natürlicher oder nicht-natürlicher Nukleinsäuresequenzen, chemische Modifikationen oder andere Maßnahmen zum Zwecke der funktionalen Modulation der Aktivität eines intrazellulären Zielmoleküls optimiert und eingesetzt werden.

Unter Aptazymen sollen hierin insbesondere katalytische Nukleinsäuren, sogenannte Ribozyme, verstanden werden, die aus einer katalytischen Domäne und einer allosterischen Domäne bestehen, die durch Bindung eines Effektormoleküls die katalytische Aktivität des Aptazyms kontrolliert. Der Mechanismus ist vergleichbar mit der Regulierung von allosterisch regulierten Proteinenzymen. Ribozyme können eine Reihe von chemischen Reaktionen, meist Phosphoestertransferreaktionen, beschleunigen (Scott, Curr. Opin. Struct. Biol. 8 (1998), 720-726; Carola und Eckstein, Curr. Opin. Chem. Biol. 3 (1999), 274-283). Durch Design oder in vitro Selektion konnten eine Reihe von Aptazymen hergestellt werden, deren katalytische Aktivität durch Bindung eines Liganden an eine zusätzliche Nukleinsäuredomäne entweder aktiviert oder inhibiert wird (Soukup und Breaker, Curr. Opin. Struct. Biol. 10 (2000), 318-325). Durch in vitro Selektion konnten Aptazyme isoliert werden, die eine neue Bindungsdomäne für Liganden enthalten, die vorher nicht bekannt war (Robertson und Ellington, Nat. Biotechnol. 17 (1999), 62-66; Piganeau et al., RNA 2000, The Annual Meeting of the RNA Society (2000),

Madison, (Abstract)). Diese Bindungsdomäne kann isoliert werden und wie ein Aptamer zur Modulation des entsprechenden Zielmoleküls eingesetzt werden.

Unter Vektoren sollen hierin allgemein *Gentransfersysteme* verstanden werden, die in der Lage sind, Nukleinsäuren in einen Wirtsorganismus wie eine Zelle, hierin bevorzugterweise eine eukaryontische Zelle, einzuschleusen und erlauben, dass die eingeschleuste Nukleinsäure zumindest für eine bestimmte Zeit in der Zelle stabil vorhanden und gegebenenfalls stabil exprimiert wird. Die verschiedenen gebräuchlichen Vektorsysteme sind den Fachleuten auf dem Gebiet Experten bekannt und sind beispielsweise beschrieben in Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3 (1989), Edition: 02, Cold Spring Harbour; Glover, D, *DNA cloning: a practical approach: expression systems* (1995), Edition: 02, Irl Press.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz weist mehrere Elemente auf, die wie die A1-Box, die A2-Box oder die A3-Box fakultativ vorhanden sind. Das Vorhandensein oder das Fehlen einer dieser Boxen ist jeweils unabhängig vom Vorhandensein oder Fehlen einer der jeweiligen anderen Boxen. Bevorzugterweise liegt bei Anwesenheit der A1-Box auch die A2-Box vor und umgekehrt. Die Größe oder Länge der A1-Box bzw. der A2-Box und damit der Wert von k und l , die jeweils die Länge der A1-Box bzw. der A2-Box beschreiben, kann verschieden sein. Es ist jedoch bevorzugt, wenn k und l den gleichen Wert aufweisen.

Die Werte von k und l können jeden beliebigen ganzzahligen Wert von 0 bis 100 einnehmen. Besonders bevorzugte Bereiche für k und l sind, unabhängig voneinander, 0 bis 20, wobei der Bereich von 5 bis 15 besonders bevorzugt ist.

Die Länge der A3-Box, ausgedrückt als die Anzahl der die Box ausbildenden Basen m , kann einen Wert von 0 bis 20 einnehmen. Besonders bevorzugt ist dabei ein Bereich von 0 bis 9.

Die Länge m der A3-Box kann somit jeden ganzzahligen Wert zwischen 0 und 20 einnehmen. Grundsätzlich erscheint auch eine größere Länge möglich, aufgrund der derzeit vorliegenden Ergebnisse scheint, ohne dass dies hierin eine Beschränkung hinsichtlich der Länge darstellen soll, eine Obergrenze bei einem Wert zwischen 10 und 17 dann gegeben zu sein, wenn ein Export der Transkripte aus dem Kern angestrebt wird. Ist eine Lokalisation im Zellkern angestrebt, kann die Länge der Box A3 größer sein als 10, wobei die Länge der Box A 3

bevorzugt größer als 15 ist und noch bevorzugter größer als 18. Unter diesen Bedingungen sind Werte von 40, 60 oder bis zu 100 Basen grundsätzlich möglich. Die faktische Obergrenze für die Länge von A3 ergibt sich dann, wenn durch die Länge der A3-Box die Struktur der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz bzw. des erfindungsgemäßen Expressionssystems verändert wird und sich insbesondere die in Fig. 2A dargestellte Sekundärstruktur nicht mehr ausbildet. Dieser Aspekt der Obergrenze von m gilt sinngemäß auch für alle anderen die Länge von Motiven oder Boxen angegebenden Laufparametern wie k, l, m, n und p, wobei dieses Kriterium auch für die Untergrenze der besagten Laufparameter gilt.

Die Größe des C1-Motivs ebenso wie die Größe des C2-Motivs, ebenfalls ausgedrückt als die Anzahl der das jeweilige Motiv ausbildenden Basen n bzw. p, sind unabhängig voneinander ausgestaltbar. Der Wert von n bzw. p kann jeweils größer oder gleich 10 sein. Bevorzugt ist eine Länge von größer gleich 16, wobei eine Länge von größer gleich 20 besonders bevorzugt ist. In besonders bevorzugten Ausführungsformen kann vorgesehen sein, dass die Länge des C1-Motivs gleich der Länge des C2-Motivs ist. Die Sequenz des C1-Motivs und des C2-Motivs ist dabei so zu gestalten, dass es einen Bereich innerhalb eines jeden C-Motivs gibt, der komplementär zu einem Bereich des jeweils anderen C-Motivs ist. Dabei ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die zueinander komplementären Bereiche der C-Motive innerhalb des jeweiligen C-Motivs relativ zueinander an einander entsprechenden Stellen angeordnet sind. Es ist jedoch auch im Rahmen der Erfindung, dass die zueinander komplementären Bereiche der C-Motive innerhalb des jeweiligen C-Motivs an verschiedenen Stellen angeordnet sind. Dies hätte beispielsweise zur Folge, dass die Überhänge der beiden C-Motive - bezogen auf die ausgebildete Helix - unterschiedlich sein können.

Infolge der zumindestens teilweisen Komplementarität des C1-Motivs und C2-Motivs kommt es zur Ausbildung einer Doppelhelix. Dabei ist es besonders bevorzugt, wenn die Doppelhelix mindestens 14 Basenpaarungen umfasst. Unter Basenpaarungen sollen dabei hierin sowohl Watson-Crick-Basenpaarungen als auch nicht-Watson-Crick-Basenpaarungen verstanden werden, wobei sich die Anzahl der Basenpaarungen aus einer beliebigen Kombination der beiden vorstehend genannten Basenpaarungstypen zusammensetzen kann und in einem Extremfall nur Watson-Crick-Basenpaarungen und in einem anderen Extremfall nur nicht-Watson-Crick-Basenpaarungen die Doppelhelix ausbilden.

Bei den vorstehend genannten Elementen, d.h. den verschiedenen C-Motiven und A-Boxen, der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz spielt die eigentliche Sequenz eine weniger wichtige Rolle. Die besagten Elemente sind vielmehr im wesentlichen wegen ihrer strukturellen Eigenschaften von Bedeutung, die zur Ausbildung einer Nukleinsäuresequenzumgebung für den zu exprimierenden Nukleinsäureliganden führt.

Besonders bevorzugt in diesem Fall sind Sequenzen, die nicht komplementär zu den A-Boxen oder der Insert-Nukleinsäure, insbesondere Insert-RNA sind, damit dort keine stabilen Helices ausgebildet werden. Bevorzugt sind darüberhinaus C1- und C2-Motive, die keine perfekte Helix ausbilden, da es im Stand der Technik bekannt ist, daß einige intrazelluläre Enzyme durch doppelsträngige RNA aktiviert werden können.. Die Aktivierung der dsRNA activated protein kinase (PKR) führt zum Beispiel zu einer Blockade der Translation, also der Neubildung von Proteinen und kann Apoptose induzieren (Kaufman R.J., Proc Natl Acad Sci U S A. 96 (1999), 11693-11695; Williams B.R., Oncogene. 18 (1999), 6112-6120). Es wird angenommen, dass dieser Mechanismus unter anderem eine Abwehrreaktion von Zellen gegenüber der Infektion mit Viren darstellt. Um diese unerwünschten Nebeneffekte zu vermeiden, sollten kontinuierlich dsRNA-Bereiche in der von dem C1- und dem C2-Motiv gebildeten Helix bevorzugt nicht länger als 12 Positionen, noch bevorzugter nicht länger als 8 Positionen sein, wobei die Länge der Helix insgesamt immer noch 10 Basenpaare beträgt, und bevorzugterweise 14 Basenpaare. Dies kann zum Beispiel durch zwei ungleich lange C1- und C2-Motive erreicht werden. In diesem Falle bleiben einige Basen des Längeren C-Motivs ungepaart, was zu einer Unterbrechung der kontinuierlichen Helix führt wie zum Beispiel in Abbildung 9c im Pol-III-Helix-Expressionskonstrukt PH7 die ungepaarten Basenbereiche G und UU. Eine andere Möglichkeit zur Unterbrechung einer kontinuierlichen Helix sind Bereiche, in denen sich nicht-komplementäre Basen gegenüberstehen. In diesem Bereich entsteht eine ungepaarte Region, die je nach Länge auch als Mismatch oder interner Loop bezeichnet werden und von kontinuierlichen Bereichen der Helix flankiert werden, wie die nicht gepaarten Basen A und G in der Helix der Konstrukte in den Abbildungen 8 a) b) c) oder 9c) oder 10.

Die zu verwendenden Terminatoren sind typischerweise RNA-Polymerase III-Terminatoren. Derartige Terminatoren sind beispielsweise beschrieben in Paule and White, Nucleic Acid Res. 28 (2000), 1283-1298. Grundsätzlich ist ein jeder Terminator geeignet, der gewährleistet, dass die Expression und insbesondere die Transkription des Expressionssystems bzw. der darin

insetierten und zu exprimierenden Nukleinsäure, bevorzugt die für den Nukleinsäureliganden codierende Nukleinsäure, erfolgt. Es kann sich bei dem Terminator somit auch um einen solchen Terminator handeln, der für ein anderes Polymerase-System spezifisch ist, jedoch auch bei dem erfindungsgemäßen Expressionssystem in dem Sinne wirksam ist, dass die Expression am Terminator oder in dessen Umgebung beendet wird. Beispielsweise sind auch Terminatoren, bei denen wie im Falle der RNA-Polymerase-III die Termination durch kurze DNA-Sequenzen intrinsisch terminiert wird unter Verwendung der jeweils spezifischen Polymerase-Promotoren geeignet. Solche sequenzabhängigen Terminatoren finden sich beispielsweise bei der Bakteriophagen T7-RNA-Polymerase (Hartvig und Christiansen, EMBO J. 15 (1996), 4767-4774).

Die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz bzw. das diese umfassende erfindungsgemäße Expressionssystem kann auch einen Promotor umfassen, wobei der Promotor bevorzugt ein solcher ist, der die Expression und besonders die Transkription des im Expressionssystem insetierten und damit zu exprimierenden Nukleinsäureliganden (bzw. der für ihn codierenden Nukleinsäure) steuert. Grundsätzlich können somit alle derartigen Promotoren verwendet werden. RNA-Polymerasen III-Promotoren sind beispielsweise beschrieben in Paule and White, Nucleic Acid Res. 28 (2000), 1283-1298 und den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt. Derartige Vektoren sind insbesondere dann geeignet, wenn sie mit den hierin offenbarten strukturellen und funktionellen Voraussetzungen des erfindungsgemäßen Pol III-Helix-Expressionssystem kompatibel sind. Beispiele für RNA-Polymerase III-Promotoren sind die Promotoren von 5S-RNA-Genen (Typ 1) (Specht et al., Nucleic Acid Res. 19 (1991), 2189-2191), tRNA-Promotoren (Typ 2) (Thompson et al., Nucleic Acid Res. 23 (1995), 2259-2268; Sullenger et al., J. Virol. 65 (1991), 6811-6816) U6 snRNA (Typ 3) (Das et al., EMBO J. 7 (1988), 503-512, Lobo und Hernandez, Genes Dev. 58 (1989), 55-67) oder andere nicht unter die Klassifizierung 1 bis 3 fallende Pol-III-Promotoren, wie z.B. 7SL-RNA-Promotoren (Bredow et al., Gene 86 (1989), 217-225). Für die Expression von RNA-Molekülen wurden bisher einige dieser Promotoren, unter anderem tRNA, U6 snRNA- oder VA1-RNA-Promotoren verwendet (Übersichtsartikel: Rossi, Tibtech 13 (1997), 301-305; Bramlage et al., Tibtech 16 (1998), 434-438).

Die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz bzw. das erfindungsgemäße Expressionssystem kann mit einem weiteren Element versehen werden, das die ortsspezifische Lokalisation des Nukleinsäureliganden steuert. Derartige die Lokalisation steuernde Elemente werden innerhalb

der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz bzw. dem Expressionssystem in den A-Boxen (1 – 3) angeordnet werden. Derartige Elemente sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt und beispielsweise beschrieben in Cullen, *Mol Cell Biol.* 20 (2000), 4181-4187 oder in Pederson, *FASEB J.* 13 Suppl 2 (1999), 238-242. So ist beispielsweise bekannt, dass das RRE („rev responsive element“), ein hochstrukturierten Abschnitt des viralen RNA-Genoms mit dem viralen Rev-Protein interagiert, das am Transport der viralen RNAs vom Zellkern ins Zytoplasma beteiligt ist (Malim et al., *Nature* 338 (1989), 254-257; Cochrane et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990), 1198-1202). Oder es ist bekannt, dass tRNAs Komplexe mit den Exportfaktoren Xpo-t und dem kleinen G-Protein Ran in seiner GTP-gebundenen Form (Ran-GTP) (Hutay et al., *Mol. Cell.* 1 (1998), 359-369, *Mol. Cell. Biol.* 18 (1998), 6374-6386), und durch die Kernporen ins Zytoplasma transportiert werden. War oben erwähnt worden, dass es für die Funktionsfähigkeit der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz (die man auch als Nukleinsäure bezeichnen könnte) bzw. des erfindungsgemäßen Expressionssystems im wesentlichen auf die Strukturmerkmale ankommt, so kommt doch der Sequenz der einzelnen Abschnitte der Nukleinsäuresequenz bzw. des Expressionssystems insoweit eine Bedeutung zu, als dass sie, wie vorstehend ausgeführt, für das Lokalisationssignal von Bedeutung sein können oder die Sequenz einen intragenen Promotor oder Promotorelement umfassen kann. Ebenfalls von Bedeutung ist die Sequenz in so weit, wie sie, insbesondere im Zusammenspiel mit anderen Elementen und der diese aufbauenden Sequenzen, auf die Ausbildung der erforderlichen Sekundärstruktur Auswirkungen hat. Die Auswahl einer geeigneten Sequenz mit dem Ziel der Erzeugung der Sekundärstruktur, wie sie für die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz bzw. Expressionssystem erforderlich ist, kann mittels eines geeigneten Computerprogramms bestimmt werden, bzw. bei Vorliegen einer bestimmten Sequenz deren wahrscheinliche Sekundärstruktur berechnet werden.

Das vorstehend zu den Elementen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz, wie A1-Box, A2-Box, A3-Box, C1-Motiv, C2-Motiv, Terminator und Promotor, Gesagte gilt auch für die das erfindungsgemäße Expressionssystem ausbildenden Elemente.

Geeignete Vektoren für die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz und insbesondere für das erfindungsgemäße Expressionssystem sind den Fachleuten bekannt. Häufig benutzte virale Vektoren sind Retroviren, deren RNA-Genom nach der reversen Transcription als DNA stabil in das Genom des Wirts integriert. Am häufigsten werden auf MoMuLV basierende Vektoren

eingesetzt, die allerdings nur proliferierende Zellen infizieren können. Daher wurden auch auf Lentiviren (u.a. HIV) basierende Systeme entwickelt, mit denen auch sich nicht-teilende Zellen infiziert werden können (Übersichtsartikel: Miller, Hum Gene Ther. 1 (1990), 5-14; Gordon und Anderson, Curr. Opin. Biotechnol. 5 (1994), 611-616). Eine andere häufig verwendete Klasse sind adeno-assoziierte Viren (AAV). Diese ssDNA-Viren zeichnen sich unter anderem durch den Vorteil aus, dass sie genetisches Material an einer definierten Stelle im Chromosom 19 integrieren können (Übersichtsartikel: Grimm und Kleinschmidt, Hum. Gene. Ther. 10 (1999), 2445-2450).

Neben viralen Systemen existieren auch diverse Vektoren, die direkt in Zellen transfiziert werden. Unter anderem werden Plasmide und Cosmide verwendet, die durch Elektroporation, Lipofektion oder CaPO₄-Präzipitation in die Zellen eingeschleust werden (Übersichtsartikel: Gregoriadis, Pharm. Res. 15 1998, 661-670). Eine Erweiterung dieser Methode ist die Verwendung episomal replizierender Plasmide, die den „origin of replication“ des Epstein-Barr Virus (OriP) tragen und das EBNA-1-Antigen exprimieren. Diese Vektoren replizieren extrachromosomal in Primaten- und Hund-Zelllinien und können dort dauerhaft persistieren (Yates et al., Nature 313 (1985), 812-815; Chittenden et al., J. Virol. 63 (1989), 3016-3025).

Eine andere Methode, fremdes genetisches Material in eukaryontischen Zellen dauerhaft zu replizieren, ist die Verwendung von sogenannten Minichromosomen. Diese großen DNA-Moleküle tragen wie natürliche Chromosomen Zentromer- und Telomersequenzen und werden in der Mitose dupliziert und an die Tochterzellen weitergegeben. Ihre Größe (im Megabasenbereich) erlaubt zudem die Klonierung sehr großer DNA-Fragmente von mehreren 100 000 Basen. Minichromosomen wurden für Hefe- und Säugerzellen entwickelt (YACs und BACs, siehe: Grimes und Cooke, Hum. Mol. Genet. 7 (1998), 1635-1640; Amemiya et al., Methods Cell. Biol. 60 (1999),:235-258; Brown et al., Trends Biotechnol. 18 (2000), 218-223). Die hier aufgeführten Vektoren sind nicht limitierende Beispiele für Vektorsysteme, die in der Literatur beschrieben und den Fachleuten bekannt sind.

Bei den Vektoren handelt es sich um solche, die für den jeweiligen Verwendungszweck und den dazu erforderlichen oder gewählten Zelltyp geeignet sind. Bei den Vektoren handelt es sich bevorzugt um solche, die geeignet sind, die Expression in eukaryontischen Zellen und

insbesondere in Säugetierzellen zu steuern. Die Vektoren können auch gewebespezifisch sein bzw. die Expression der Nukleinsäureliganden gewebespezifisch steuern.

Bei den erfindungsgemäßen Zellen handelt es sich bevorzugt um eukaryontische Zellen und ganz besonders um Säugetierzellen. Weiterhin kann es sich bei den Zellen um gewebespezifische, undifferenzierte, umdifferenzierte, pluripotente oder um Stammzellen handeln. Auch hier entscheidet die letztendliche Verwendung über die Art der zu verwendenden Zellen. So ist beispielsweise bei der Gentherapie in Abhängigkeit von dem zu therapierenden Gewebe die Zelle auszuwählen, wobei es sich bevorzugt um menschliche Zellen handelt und ganz besonders um solche menschliche Zellen, die ursprünglich dem Organismus entnommen wurden, dem sie – wieder – zugeführt werden.

Bei den Zellen kann es sich beispielsweise um solche von Maus, Ratte, Hund, Kaninchen, Affe und Mensch handeln.

Eine Anwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen bzw. Expressionssysteme ist beispielsweise die Erzeugung transgener Tiere und Pflanzen, die bspw. beschrieben ist bei Dunwell, J. Exp. Bot. 51.(2000), 487-496 oder . Niemann H, et al., Anim. Reprod. Sci. 60-61.(2000), 277-293. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ist diese Anwendung nicht auf eine bestimmte Tier- oder Pflanzenart, insbesondere nicht eine bestimmte Säugetierart beschränkt, was darin begründet liegt, dass die Expressions- und Transkriptionsmaschinerie bei eukaryontischen Zellen praktisch immer gleich aufgebaut ist und nach den gleichen Mechanismen funktioniert.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen können in vielen Bereichen verwendet werden, so z.B. als Medikament, bei der Target-Validierung, bei der Target-Identifizierung, bei Screening-Programmen und/oder der Gentherapie. Ebenso ist der Einsatz in Three-Hybridsystemen in eukaryontischen Zellen zur Untersuchung von Nukleinsäure/Proteininteraktionen denkbar (SenGupta et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996), 8496-8501). Gleiches gilt für das erfindungsgemäße Expressionssystem, die erfindungsgemäßen Vektoren und/oder die erfindungsgemäßen Zellen. Die Verwendung der erfindungsgemäßen transgenen Tiere kann z.B. im Bereich des Screenens erfolgen.

Beispielsweise kann ein Screeningprogramm auf Zellkulturebene zum Gegenstand haben, einen Antagonisten zu einem Nukleinsäureliganden zu. Dies könnte in einem kompetitiven Assay erfolgen, bei dem ein mittels des erfindungsgemäßen Expressionssystems bevorzugt in einer Zelle exprimierter Nukleinsäureligand die Wirkung seines Zielmoleküls beeinflusst und diese Beeinflussung in Abhängigkeit eines Kandidatenantagonisten untersucht wird. Ähnlich Ansätze können für Agonisten entwickelt werden und sind insgesamt den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt.

Im Fall von transgenen Pflanzen könnten inhibitorische Nukleinsäuren beispielsweise genutzt werden, um Enzyme zu inhibieren und so den Gehalt an Nahrungsstoffen in Nutzpflanzen zu manipulieren. So konnte in einem Antisensmodell der Stärkegehalt von Reispflanzen durch gegen das Wx Gen gerichtete, in den Zellen exprimierte Antisensnukleinsäuren manipuliert werden (Terada et al., *Plant Cell Physiol.* 41 (2000), 881-888). Ähnliche Experimente könnten auch mit Nutztieren zur Produktion verbesserter Lebensmittel oder der Bereitstellung von optimierten Xenotransplantaten durchgeführt werden.

Unter Target-Validierung versteht man hierin insbesondere die Inaktivierung eines bevorzugterweise zellulären Moleküls in transgenen Zellen, Pflanzen oder Tieren, bei denen die mittels der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen exprimierten Nukleinsäureliganden das zelluläre Molekül binden und dessen Funktion blockieren. Durch Untersuchung der entsprechenden Phänotypen können dann Aussagen getroffen werden, ob das zelluläre Molekül ursächlich mit dem untersuchten Phänotyp, z.B. in einem Krankheitsmodell, in Zusammenhang steht. Diese Methoden der reversen Genetik wurden zum Beispiel mit Protein- oder Peptidliganden gegen intrazelluläre Zielmoleküle erfolgreich durchgeführt. Intrazellulär exprimierte Antikörper (auch intrabodies genannt) wurden gegen das Onkogen p53 in H1299-Zellen exprimiert. Durch Inhibition der transaktivierenden Funktion von p53 konnte sein onkogenes Potential blockiert werden. (Cohen et al., *Oncogene*, 17 (1998), 2445-2456). Ebenso konnte mit Intrabodies gegen das virale Tat-Protein von HIV die Tat-induzierte Gen-Aktivierung blockiert werden (Mhashilkar et al., *J. Virol.* 71 (1997):6486-6494). Mit intrazellulären Aptameren konnte die Aktivierung von CD18-Integrinen in Leukozyten blockiert und damit die Adhäsion der Immunzellen an den CD18-Liganden ICAM-1 blockiert werden (Blind et al. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 96 (1999), 3606-3609;

Kann dabei ein intrazelluläres Zielmolekül beispielsweise einem mit einer bestimmten Krankheit assoziierten Phänotyp zugeordnet werden, kann dieses Zielmolekül als Ausgangspunkt für die Entwicklung eines Medikaments benutzt werden.

Unter Target-Identifizierung versteht man hierin insbesondere die Einführung einer kombinatorischen Bibliothek (von unterschiedlichen) der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen oder Expressionssystemen, die unterschiedliche Nukleinsäureliganden inseriert tragen, wobei bevorzugt verschiedene Nukleinsäureliganden in ein und dasselbe Expressionssystem inseriert sind. Durch Screening von beispielsweise transgenen Zellen nach der Veränderung eines bestimmten Phänotyps können dann individuelle Nukleinsäuresequenzen und damit Nukleinsäureliganden isoliert werden, die den beobachteten Phänotyp beeinflussen. Diese individuellen Nukleinsäuresequenzen können dann benutzt werden, um das intrazelluläre Zielmolekül zu isolieren, dessen Manipulation zur Veränderung des Phänotyps führte und das folglich an der Ausbildung des unveränderten Phänotyps beteiligt war. Analoge Experimente wurden mit kombinatorischen Bibliotheken von Peptiden durchgeführt, die zur Identifizierung intrazellulärer Zielmoleküle eingesetzt wurden. So konnten beispielsweise Inhibitoren des Enzyms Thymidilat Kinase aus kombinatorischen Peptidbibliotheken in Zellen isoliert werden (Blum et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 97 (2000), 2241-2246). Die prinzipielle Durchführung dieser Methoden der Target-Validierung und Target-Identifizierung sind den Fachleuten bekannt und beispielsweise in Colas, Curr. Opin. Chem. Biol. 4 (2000) 54-59 beschrieben.

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Figuren und Beispielen erläutert, aus denen sich weitere Merkmale, Ausführungsformen und Vorteile der verschiedenen Aspekte der Erfindung ergeben, dabei zeigt

- Fig. 1 eine schematische Darstellung des erfindungsgemäßen Expressionssystems,
- Fig. 2 eine vergleichende Übersicht des Aufbaus verschiedener Expressionssysteme,
- Fig. 3 die Sekundärstrukturen zweier Aptamere, nämlich D 28 und N3,
- Fig. 4 die Sekundärstruktur von D 28, das in einem erfindungsgemäßen Pol-III-Helix-Expressionssystem (PH1) inseriert ist,
- Fig. 5 die Sekundärstruktur von N 3 , das in einem erfindungsgemäßen Pol-III-Helix-

- Expressionskonstrukt (PH1) inseriert ist,
- Fig. 6 die Sekundärstruktur von D 28, das in einem Expressionskonstrukt nach dem Stand der Technik inseriert ist (D1),
- Fig. 7 die Sekundärstruktur von N 3, das in einem Expressionskonstrukt nach dem Stand der Technik inseriert ist (D1),
- Fig. 8 insgesamt vier mit PH1 bis PH4 bezeichnete erfindungsgemäße Expressionssysteme oder –konstrukte, die jeweils ein Insert tragen, wobei die verschiedenen Elemente des Expressionssystems abgegeben sind,
- Fig. 9 insgesamt drei mit PH5 bis PH7 bezeichnete erfindungsgemäße Expressionssysteme oder –konstrukte, die jeweils ein Insert tragen, wobei die verschiedenen Elemente des Expressionssystems abgegeben sind, und
- Fig. 10 ein weiteres als PH8 bezeichnetes erfindungsgemäßes Expressionssystem oder –konstrukt, das jeweils ein Insert trägt, wobei die verschiedenen Elemente des Expressionssystems abgegeben sind

Hierin werden die Begriffe Pol-III-Helix-Expressionskonstrukt, Polymerase III-Helix-Expressionskonstrukt oder Polymerase III-Helix-System synonym benutzt

Fig. 1 zeigt eine schematische Darstellung des erfindungsgemäßen Expressionssystems, das beginnend mit dem 5'-Ende ein C1-Motiv umfasst, dem sich eine A1-Box anschließt. Der A1-Box folgt die in Fig. 1 als Insert-RNA bezeichnete inserierte Nukleinsäure, genauer RNA, bei der es sich um eine funktionale Nukleinsäure, genauer einen Nukleinsäureliganden, nämlich ein Aptamer handelt. Dem Nukleinsäureliganden, genauer dessen Sequenz, schließt sich eine A2-Box an, der wiederum ein C2-Motiv und eine A3-Box folgt. 3'-terminal endet das Expressionskonstrukt mit einem Terminator.

Bedingt durch die Komplementarität der Motive C1 und C2 kommt es zur Ausbildung einer terminal gelegenen Doppelhelix, die eine Stammstruktur definiert, an deren Ende, abgetrennt durch die A1-Box und die A2-Box die Nukleinsäuresequenz des Nukleinsäureliganden angeordnet ist. Infolge der Doppelhelix wird die Stabilität des Konstruktes gegenüber Nuklease-Aktivität in einem zellulären System erhöht. Gezielte Variationen der Struktur der terminal gelegenen Helix erlauben die Lokalisation der Transkripte im Zellkern oder Zytoplasma. So ist beispielsweise die Basenpaarung des 5'-Endes mit dem 3'-Ende wichtig für den Export der

Transkripte ins Zytoplasma. Bleiben beispielsweise 3 Nukleotide des 5'-Endes ungepaart, werden die Transkripte im Zellkern zurückgehalten. 3'-seitig des C1-Motivs und 5'-seitig des C2-Motivs liegen die A1- bzw. A2-Boxen, die präferentiell zwischen 0 und 100 Nukleotide umfassen. Diese Sequenzabschnitte können beispielsweise Restriktionsschnittstellen zur Klonierung der Insert-RNA oder intragene Promotorelemente für RNA-Polymerasen enthalten. Die A3-Box kann bei Bedarf als Sequenzabstandshalter zwischen der terminal gelegenen Helix und dem Terminator für die RNA-Polymerase dienen, um die Strukturausbildung der Helix zu garantieren. Zusätzlich kann auch durch die Länge der A3-Box die Lokalisierung der Transkripte gesteuert werden. So können beispielsweise Transkripte mit einer 8 Nukleotide langen A3-Box ins Zytoplasma exportiert werden während Transkripte mit einer 18 Nukleotide langen Sequenz präferentiell im Zellkern verbleiben.

Fig. 2 zeigt eine vergleichende Übersicht des Aufbaus verschiedener Expressionssysteme, wobei des Expressionssystem A das erfindungsgemäße Expressionssystem ist, das eine zu exprimierende Sequenz, dort als Insert-RNA bezeichnet, enthält und die Konstrukte B bis E, die aus dem Stand der Technik bekannt sind. Im übrigen sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass der Begriff Expressionssystem und Expressionskassette hierin synonym verwendet werden. Zur Vereinfachung wurden die in der Literatur beschriebenen Expressionskassetten konsekutiv mit D1 bis D4 (Abb. 2B-E) bezeichnet.

- A: die erfindungsgemäße Pol-III-Helix Expressionskassette ,
- B: Expressionskassette D1: tRNA-Expressionskassette (Good et al., Gene Ther. 4 (1997), 45-54): Die Expressionskassette besteht aus einem tRNA-Promotor und den ersten drei Vierteln der tRNA^{met} in 5'-Position von der Insert-RNA und einem 3'-seitig gelegenen, stabilisierenden Stemloop vor dem Pol-III-Terminator.
- C: Expressionskassette D2: tRNA-Expressionskassette (z. B. Cotton und Birmstiel, Embo J. 8 (1989), 3861).
- D: Expressionskassette D2: Hefe „Three Hybrid“-Expressionskassette. Die Expressionskassette wird benutzt, um RNA-Hybridmoleküle in Hefen zu exprimieren, um in den Zellen RNA-Proteinwechselwirkungen analog zu den auf Proteininteraktionen basierenden „Two-Hybrid“- oder Three-Hybrid“-Systemen nachzuweisen (SenGupta et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996), 8496-8501). Das RNA-Transkript besteht aus einer 5'-seitig gelegenen RnaseP-RNA-Sequenz (RNP-leader), einer MS2-RNA-Sequenz, der Insert-RNA und einem

Terminator für die RNA-Polymerase III. Plasmide zur Klonierung der Insert-RNA und Expression im „Three-Hybrid“-System sind auch kommerziell erhältlich (z.B. pRH5' oder pRH3', Invitrogen BV, NV Leek, The Netherlands).

E : Expressionskassette D4: lacZ-Expressionskassette. Diese Expressionskassette wurde zur Expression von Aptameren gegen kleine organische Moleküle in eukaryontischen CHO-Zellen eingesetzt (Werstuck und Green, Science 282 (1998), 296-298). Die für das Aptamer kodierende DNA wurde in den 5'-UTR eines -Galaktosidasereportergens in das Plasmid Sv gal (Promega) kloniert und über einen RNA-Polymerase-II-Promotor exprimiert.

Fig. 3 zeigt die Sekundärstrukturen zweier funktionaler Nukleinsäureliganden (Aptamere) D 28 und N3, die in den Beispielen detaillierter beschrieben sind. Für die weitere Diskussion und zum Aufzeigen der Vorteile des erfindungsgemäßen Expressionssystems sei auf die Sekundärstrukturen dieser Nukleinsäureliganden hingewiesen und insbesondere die von den eingekreisten Basen ausgebildeten Sekundärstrukturen oder Motive, die für die Bindung der Nukleinsäureliganden an ihr jeweiliges Target-Molekül erforderlich sind.

Fig. 4 zeigt das Aptamer D28 in ein erfindungsgemäßes Expressionssystem (PH1) inseriert. Das 5'-Ende und das 3'-Ende des Aptamers sind in der Gesamtsequenz durch Pfeile markiert. Es ist dabei beachtlich, dass der für die Bindung des Nukleinsäureliganden D 28 relevante Bereich, dessen Basen eingekreist sind (siehe hierzu auch Fig. 3), auch nach der Insertion in das erfindungsgemäße Expressionssystem die erforderliche Sekundärstruktur / Motiv ausbildet.

Fig. 5 zeigt, analog Fig. 4 für das Aptamer D 28, das Aptamer N 3 in ein erfindungsgemäßes Expressionssystem inseriert (PH1). Das 5'-Ende und das 3'-Ende des Aptamers sind in der Gesamtsequenz durch Pfeile markiert. Es ist dabei beachtlich, dass der für die Bindung des Nukleinsäureliganden N 3 relevante Bereich, dessen Basen eingekreist sind (siehe hierzu auch Fig. 3), auch nach der Insertion in das erfindungsgemäße Expressionssystem die erforderliche Sekundärstruktur / Motiv ausbildet.

Fig. 6 zeigt das Aptamer D 28 in ein Expressionskonstrukt nach dem Stand der Technik (D1) inseriert. Bei dem Expressionskonstrukt handelt es sich um die Struktur D1, wie sie in Fig. 2 als Konstrukt B dargestellt ist. Deutlich ist zu erkennen, dass unter dem Einfluß der Sequenzen und Strukturmerkmale des Expressionssystems nach dem Stand der Technik sich die von den Basen,

die für die Bindung des Aptamers an sein Target wichtig sind, ausgebildete Sekundärstruktur bzw. das Motiv deutlich unterscheidet und somit eine Bindung des Aptamers an sein Target-Molekül nicht mehr möglich ist und somit das nach dem Stand der Technik bekannte Expressionskonstrukt für die Expression einer funktionalen Nukleinsäure nicht geeignet ist.

Fig. 7 zeigt das Aptamer N3 in ein Expressionskonstrukt nach dem Stand der Technik (D1) inseriert. Bei dem Expressionskonstrukt handelt es sich um die Struktur, wie sie in Fig. 2 als Konstrukt B dargestellt ist. Auch hier ergibt sich das oben zu Fig. 6 Gesagte: Das Expressionssystem nach dem Stand der Technik ist nicht geeignet das Aptamer N 3 als funktionale Nukleinsäure so zu exprimieren, dass es funktional aktiv ist, da diese funktionale Aktivität das Vorliegen einer bestimmten Sekundärstruktur oder eines bestimmten Motivs zur Voraussetzung hat und diese bei Insertion in das Expressionssystem nach dem Stand der Technik nicht vorliegt.

Fig 8: Verschiedene Pol-III-Helix-Expressionskonstrukte im Sinne dieser Erfindung. Dargestellt sind jeweils die Sekundärstrukturen der C1- C2-Motive mit den A 1-3 Boxen und dem RNA-Polymerase-III-Terminator. Die Insert –RNA ist schematisch wiedergegeben. Die Sequenzen der Pol-III-Helix-Expressionskonstrukte wurden konsekutiv mit a) PH1 b) PH2 c) PH3 d) PH4) bezeichnet.

PH1 weist eine aus dem C1-Motiv und dem C2-Motiv ausgebildete Doppelhelix auf, die insgesamt zwei Fehlpaarungen zeigen, die durch einen Bereich aus 9 Basenpaarungen voneinander getrennt sind. Die A1-Box umfasst 13 Basen, an die sich schematisch dargestellt das Insert anschließt. Die A2-Box umfasst insgesamt 12 Basen, an die sich das C2-Motiv anschließt. Die A3-Box umfasst im vorliegenden Fall lediglich eine Base, an die sich der aus fünf U bestehende Terminator anschließt.

PH 2 weist eine aus dem C1-Motiv und C2-Motiv gebildete terminal gelegene Doppelhelix auf, die lediglich eine Fehlpaarungsstelle umfasst. Die sich an die Helix anschließende A1-Box umfasst 13 Basen. Die A2-Box umfasst insgesamt 12 Basen, an die sich das C2-Motiv anschließt. Die A3-Box umfasst 8 Basen, an die sich der aus fünf U bestehende Terminator anschließt.

PH 3 weist eine Doppelhelix auf, die insgesamt zwei Basenpaarungsfehlstellen aufweist, die durch sieben Basenpaarungen getrennt sind. Die A1-Box, A2-Box und A3-Box sowie der Terminator sind identisch zu der entsprechenden Strukturen von PH2.

PH 4 weist ebenfalls eine Doppelhelix mit zwei Basenfehlpaarungsstellen auf, wobei eine der Basenpaarungsfehlstellen dabei so ausgebildet ist, dass gegenüber der komplementären Sequenz zwei zusätzliche Basen vorhanden sind (U – G). Die A1- und A2-Box entsprechen der von PH 2, und die A3-Box sowie der Terminator denjenigen Strukturen von PH1.

Fig. 9 zeigt die Sekundärstrukturen von weiteren Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Expressionssysteme, die als PH5, PH 6 und PH 7 bezeichnet sind.

PH5 weist eine Doppelhelix aus insgesamt 18 Basenpaaren auf, wobei $n = 21$ und $p = 18$. Es fehlen sowohl die A1- als auch die A2-Box. Das C1-Motiv weist 5'-terminal drei überhängende Basen auf, die nicht mit den Basen des C2-Motivs basenpaaren. Die A3-Box besteht aus einer Base (C), der sich der aus fünf U bestehende Terminator anschließt. Eine der Besonderheiten von PH 5 besteht darin, dass die Helix an 3 Basen des 5'-Endes nicht gepaart sind und das Konstrukt somit im Zellkern verbleibt.

PH6 weist eine zu PH 5 sehr ähnliche Struktur auf, wobei die Doppelhelix aus 21 Basenpaaren besteht und $n = 21$ und $p = 21$, die durch keine Basenfehlpaarungsstellen unterbrochen sind und keinerlei überhängende Enden aufweisen. Die Struktur der A3-Box und des Terminators entsprechen derjenigen von PH 5. Eine Besonderheit von PH 6 besteht darin, dass die Helix am 5'Ende gepaart ist und somit ins Cytoplasma exportiert wird.

PH 7 weist eine terminal angeordnete Doppelhelix mit insgesamt vier Basenfehlpaarungen auf, die unterschiedlich weit von einander abgesetzt sind. Dabei umfasst das C1-Motiv 34 Basen und das C2-Motiv 31 Basen. Die A1-Box umfasst 14 Basen und die A2-Box ebenfalls 14 Basen. Der Aufbau der A3-Box sowie des Terminators entsprechen demjenigen von PH 5. Die Helix ist am 5'Ende gepaart und wird exportiert. Desweiteren weist die Helix nicht basengepaarte Bereiche auf: einen internen Mismatch (A:C und A:G). Weiterhin weist die Helix interne Bulges auf mit G und UU.

Fig. 10 schließlich zeigt die Sekundärstruktur eines weiteren erfindungsgemäßen Expressionskonstruktes, wobei hier besonders auffällt, dass die A1-Box mit 5 Basen vergleichsweise sehr groß ist und sowohl mit sich als auch mit der 7 Basen umfassenden A2-Box eine Doppelhelixstruktur ausbildet. Der aus dem 26 Basen umfassenden C1- und dem 25 Basen umfassenden C2-Motiv gebildete Doppelhelixstamm weist insgesamt bzw. drei Fehlpaarungsstellen auf, wohingegen die A3-Box sowie der Terminator denjenigen Strukturen von PH 5 entsprechen. Die Besonderheiten von PH 8 sind darin zu sehen, dass die Helix am 5'ende gepaart ist und das Konstrukt somit exportiert wird. Die Helix aus dem C1- und C2-Motiv weist nicht basengepaarte Bereiche in Form eines internen mismatches (A:C und A:G) und einen Bulge (G) auf. Des weiteren ist beachtlich, dass die A1Box und die A2-Box deutlich asymmetrisch ausgebildet sind.

Die genauen Sequenzen der Expressionskonstrukte bzw. der diese ausbildenden Elemente können direkt aus den abgelesen werden, so dass diese Sequenzen durch die Figuren offenbart sind.

Unter Fehlpaarungsstellen sollen hierin solche Stellen verstanden werden, bei denen in der Helix zwei nicht komplementäre Basen gegenüber liegen (engl. „mismatch“), mehrere nicht-komplementäre Basen gegenüberliegen (engl. „internal loop“) oder Basen, denen im komplementären Strang keine Basen gegenüberliegen (engl. „bulge“).

Beispiel 1: Aufbau eines erfindungsgemäßen *Polymerase -III-Helix-Systems*

Im folgenden soll ein Beispiel für ein erfindungsgemäßes Polymerase III-Helix-Expressionssystem für intrazelluläre Aptamere angegeben werden.

Für die Expression der Aptamerkonstrukte D 28 und N3 (Beschreibung siehe unten) wurde der RNA-Polymerase III-Promotor (Pol-III-Promotor) des humanen U6 snRNA-Gens gewählt. Dieser Promotor gehört zur Familie der Typ 3 Pol-III-Promotoren, bei denen alle in cis agierenden Sequenzelemente (z.B. eine konventionelle TATA-Box oder Transkriptionsfaktorbindungsstellen) 5'-seitig von der Transkriptionsinitiationsstelle liegen (Mattaj et al., Cell 55 (1988), 435-442; Lobo et al., Nucleic Acid Res. 18 (1990), 2891-9899).

Ein Vorteil der Verwendung des U6 snRNA-Promotors liegt in seiner äußerst hohen Transkriptionsrate. So werden von nur wenigen aktiven U6 Genen unter etwa 200 oder mehr Pseudogenen in humanen Zellen (Hayashi, *Nucleic Acid Res.* 9 (1981), 3379-3389) bis zu 400 000 Kopien der U6 snRNA pro Zelle produziert (Weinberg et al., *J. Mol. Biol.* 38 (1968), 289-304).

Grundsätzlich können aber auch alle anderen RNA-Polymerase-III-Promotoren, die dem Fachleuten bekannt und in der Literatur bspw. in Paule and White, *Nucleic Acid Res.* 28 (2000), 1283-1298) beschrieben sind, zur Transkription von Aptameren benutzt werden, solange sie mit den strukturellen und funktionellen Voraussetzungen des Pol-III-Helix-Expressionssystems kompatibel sind.

Zur Expression der intrazellulären Aptamere (hierin auch als Intramere bezeichnet) D28 und N3 wurden von den Erfindern eine Expressionskassette entwickelt (Pol-III-Helix-Kassette), die schematisch in Abbildung 1 dargestellt ist. Das C1- und C2-Motiv bilden eine Helix zwischen dem 5'-Ende und dem 3'-Ende des Expressionskonstrukts aus. Dabei sind die C1-Box und die C2-Box präferentiell größer 16 Basenpositionen und bilden die terminale Helix durch mindestens 14 komplementäre Watson-Crick oder nicht Watson-Crick-Basenpaare. Die terminal gelegene Helix dient der Stabilisierung der Transkripte im intrazellulären Milieu. Abhängig von der Struktur der Helix können die Transkripte in das Zytoplasma exportiert werden oder im Zellkern verbleiben (vgl. auch Beispiel 4). Die Sequenz der zu exprimierenden Nukleinsäure, hier der RNA, z. B. des Aptamers, wird von den C1- und C2- Motiven durch 2 Sequenzabschnitte getrennt (A1- und A2-Box), die präferentiell zwischen 0 und 100 Nukleotide lang sind, und Restriktionsschnittstellen für die Klonierung der zu inserierenden Nukleinsäuren oder intragene Promotorelemente tragen können. Am 3'-Ende des Transkripts ist ein Terminator für die RNA-Polymerase-III gelegen, der präferentiell aus 5 konsekutiven Uridinen besteht. Zwischen diesem Terminator und dem C2-Motiv liegt die A3-Box, die präferentiell 0 bis 20 Nukleotide umfasst. Die A3-Box kann beispielsweise bei Bedarf als Abstand zu der terminal gelegenen Helix und dem Terminator für die RNA-Polymerase vermitteln, um die Strukturausbildung der Helix zu garantieren.

Alle nachfolgend in den weiteren Beispielen beschriebenen Experimente wurden, falls nicht anders angegeben, nach in der Literatur beschriebenen Protokollen durchgeführt (Ausubel et al.

(eds.), Current Protocols in Molecular Biology (1987), Wiley & Sons Inc., New York, USA; andere), deren Offenbarung, wie auch diejenige aller hierin des weiteren angeführten Literaturstellen, hiermit durch Bezugnahme aufgenommen ist.

Beispiel 2: Erhaltung der Bindungseigenschaften von in einem erfindungsgemäßen Expressionssystem exprimierten Aptameren

Der Einfluss der zusätzlichen Sequenzen der Pol-III-Helix-Expressionskassette auf die Bindungseigenschaften von Aptameren wurden mit einem gegen die intrazelluläre Domäne (CD18cyt) der CD18-Integrin-Untereinheit Proteine selektierte Aptamere (D28) getestet (Blind et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999), 3606-3610). Das Aptamer D28 wurde in eine Pol-III-Helix-Expressionskassette (PH1, vgl. Abb. 4) gemäß der vorliegenden Erfindung und vier in der Literatur beschriebene Expressionskassetten (D1, D2, D3, D4: Good et al., Gene Ther. 4 (1997), 45-54; . Cotton und Birnstiel, Embo J. 8 (1989), 386-; pRH3', Invitrogen BV, NV Leek, The Netherlands; Werstuck und Green, Science 282 (1998), 296-298) entsprechend den Konstrukten B bis E von Fig. 2 kloniert und die Dissoziationskonstanten der unterschiedlichen Konstrukte untereinander verglichen. Das ursprüngliche Aptamer bindet ein der zytoplasmatischen Domäne des CD18-Proteins entsprechendes Peptid mit einer Dissoziationskonstante von ca. 500 nM. (Blind et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999), 3606-3610))

Die Dissoziationskonstanten des CD18cyt-spezifischen Aptamers D28 und seines Pol-III-Helix-Konstrukts (PH1) für das an eine Sepharose-Matrix immobilisierte synthetische Peptid (CD18cyt: NH₃⁺-KLLITIHDRK .EFAKFEEERA .RAKWDTANNP .LYKEATSTFT NITYRGT-COO⁻) wurden durch zonale Elutions-Affinitätschromatographie ermittelt. (Blind et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999), 3606-3610; Aberchrombie und Chaiken, (1991) Zonal elution quantitative affinity chromatography and analysis of molecular interactions, in Affinity Chromatography: a practical approach, ed. Dean, P. D. G., Johnson, W. S. & Middle, F. A., IRL PRESS, Oxford, Washington DC, USA, pp. 169-189). Die Konzentration des Peptids CD18cyt auf der Sepharosematrix betrug zwischen 160 und 200 µM. Zur Herstellung von radioaktiv markierter RNA der unterschiedlichen Expressionskonstrukte wurden DNA-Template, die zur in vitro Transkription zusätzlich einen T7-RNA-Polymerase-Promotor enthalten, durch PCR-Reaktionen hergestellt. Die jeweiligen DNA-Template wurden durch Standard-PCR amplifiziert,

wobei der 5'-Primer die Sequenz für den T7-RNA-Polymerase-Promotor enthielt. Die RNA wurde anschließend durch eine in vitro Transkriptionsreaktion mit T7-RNA-Polymerase hergestellt. Im nächsten Schritt wurde die RNA des Aptamers D28 und der Expressionskonstrukte, welche die Sequenz des Aptamers D28 enthalten, mittels alkalischer Phosphatase am 5'-Ende dephosphoryliert und durch Kinasierung mit T4-Polynukleotid-Kinase und $[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ am 5'-Ende radioaktiv markiert.

Die prinzipiellen Schritte des Experiments wurden folgendermaßen durchgeführt. 2 – 5 pMol $[5'\text{-}^{32}\text{P}]$ -radioaktiv markierter RNA wurden in einem Volumen von 20 μl Bindungspuffer (Puffer B: K_2HPO_4 4,3 mM NaH_2PO_4 , 1,4 mM, NaCl 150 mM, MgCl_2 1,0 mM, CaCl_2 0,1 μM) auf 400 μl mit dem Zielpeptid derivatisierte CNBr-Sepharose 4B (nach Angaben des Herstellers, Pharmacia) mit einem Säulendurchmesser von 7 mm aufgetragen. Nach der Bindung der RNA-Moleküle an die Säule wurden sie durch kontinuierliches Waschen mit Bindungspuffer in Fraktionen von 1000 μl wieder eluiert. Die radioaktiven Fraktionen wurden in einem Scintillationszähler durch Cherenkov-Bestimmung vermessen. Die Elutionsprofile wurden danach durch Addition der radioaktiven Werte (y-Achse) gegen das entsprechende Elutionsvolumen (x-Achse) in einem Diagramm aufgetragen. Anhand der Elutionsprofile wurde das Elutionsvolumen (V) bestimmt, bei dem die Hälfte der RNA-Moleküle, die an das immobilisierte Peptid (L_f) gebunden hatten, wieder von der Affinitätsmatrix durch fraktioniertes Waschen mit Bindungspuffer eluiert werden konnte.

Die Berechnung der Dissoziationskonstanten erfolgte nach folgender Gleichung:

$$\frac{1}{V - V_0} = \frac{K_{L_f}}{(V - V_m) [L_f]}$$

$[L_f]$ = Konzentration des auf der Affinitätsmatrix immobilisierten Rezeptors (CD18cyt).

V = Das Elutionsvolumen der RNA-Liganden (Aptamer D28 und die unterschiedlichen Expressionskonstrukte) entspricht dem Waschvolumen mit Bindungspuffer, bei dem die Hälfte der an die Affinitätsmatrix gebundenen RNA-Liganden wieder von der Säule eluiert wurden.

V_0 = Totales penetrierbares Volumen der Säule. Die Elutionsspitze eines Moleküls, das die Matrix wie die untersuchten, für CD18cyt spezifischen Aptamere penetrieren kann, wurde anhand des Elutionsvolumens von nicht an das Peptid bindenden RNA-Sequenzen der gleichen Länge ermittelt.

V_m = Das Gel-ausgeschlossene Volumen wurde anhand der Elutionsspitze eines die Sepharose-Matrix nicht penetrierenden Moleküls (Dextran Blau) ermittelt.

K_{Lf} = Dissoziationskonstante der Liganden (Aptamer D28 und die unterschiedlichen Expressionskonstrukte) an das auf der Matrix immobilisierte Zielmolekül (Peptid CD18cyt).

Es zeigte sich, dass das getestete erfindungsgemäße Pol-III-Helix-Konstrukt (PH1) des Aptamers MD28 CD18cyt mit vergleichbaren Affinitäten band wie das unveränderte Aptamer. Bei den Expressionskonstrukten nach dem Stand der Technik (D1, D2, D3, D4) dagegen erhöhte sich die Dissoziationskonstante drastisch um mindestens mehr als eine Größenordnung. Die Erfinder konnten somit hier zeigen, dass üblicherweise für die Expression von z.B. Ribozymen verwendeten Konstrukte für die Anwendung bei Aptameren nicht geeignet sind, da sie die Bindungseigenschaften verschlechtern. Dagegen wurde gefunden, dass das erfindungsgemäße Polymerase-III-Helix-System besonders zur Expression von Aptameren geeignet ist, da die Funktion der Moleküle nur wenig beeinträchtigt wird.

Dieses Ergebnis kann, ohne im folgenden darauf festgelegt sein zu wollen, mit der starken Tendenz von einzelsträngigen Nukleinsäuren zu intramolekularen Wechselwirkungen erklärt werden. Die relativ kompakte Helix der Pol-III-Helix-Konstrukte wird kaum mit der Sequenzen und damit der Bindungsdomäne des Aptamers interferieren. Bei den Konstrukten nach dem Stand der Technik, wie sie in Fig. 2 als Konstrukte B bis E beispielhaft angegeben wurden, wurden große Bereiche natürlich vorkommender RNA-Moleküle in die Expressionskassetten integriert, um z.B. im Gen liegende cis-aktivierende Sequenzen einzuschließen, die für die Transkription durch RNA-Polymerase-III-Promotoren des Typs 1 und 2 benötigt werden. In diesen Sequenzen befinden sich allerdings viele Bereiche die über Basenpaarung mit der Sequenz der funktionalen RNA interagieren können und so die Ausbildung der Struktur der funktionalen RNA stören. Gerade aber Aptamere, als funktionale Nukleinsäure-Moleküle und insbesondere RNA-Moleküle, sind auf die Ausbildung einer definierten Sekundär- und

Tertiärstruktur zur Ausformung von dreidimensionalen Interaktionsflächen für ihre Zielmoleküle angewiesen. Diese Tatsache wird durch die zunehmende Aufklärung von Röntgen- oder NMR-Strukturen der Aptamer/Zielmolekülkomplexe untermauert (siehe z.B. Zimmermann et al., Nature Struct. Biol. 4 (1997), 644-649; Rowsell et al., Nature Struct. Biol. 5 (1998), 970-974). Bislang wurde der Einfluss des Expressionskontexts auf die Affinitäten von Nukleinsäuren für andere Moleküle kaum untersucht (Klug et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997), 6676-6681; Thomas et al., J. Biol. Chem. 272 (1997), 27980-27986; Werstuck und Green, Science 282 (1998), 296-298). Die Erfinder konnten in dieser Arbeit zeigen, dass die erfindungsgemäße Polymerase-III-Helix-Kassette gegenüber anderen bisher verwendeten Expressionskassetten, die zelluläre Promotoren benutzen, die Bindungseigenschaften optimal erhält.

Beispiel 3: Sekundärstrukturanalyse der Polymerase-III-Helixkonstrukte

Um den Einfluss der Expressionskassetten auf die Sekundärstruktur von funktionalen Nukleinsäuren wie Aptamern zu untersuchen, wurden Energieminima von zwei gut charakterisierten Sequenzen durch computerunterstützte Sekundärstrukturvorhersagen untersucht. Für diese Experimente wurden die Sequenzen des gegen die zytoplasmatische CD18-Integrinuntereinheit gerichteten Aptamers D28 (Blind et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999), 3606-3610) und des gegen den Transkriptionsfaktor NF κ B gerichteten Aptamers N3 (Lebruska und Maher, Biochemistry 38 (1999), 3168-3174) verwendet, da die minimalen Bindungsmotive und -strukturen dieser beiden Aptamere experimentell genau bestimmt wurden. Die Analyse der Sekundärstrukturen der Aptamere D28 und (Abb. 3) und der Pol-III-Helix Konstrukte (Abb. 4 und 5) wurden durch Berechnung der minimalen freien Energie (G) bei 37°C mit dem Programm RNADraw1.1 erstellt wurden ("RNADraw: an integrated program for RNA secondary structure calculation and analysis under 32-bit Microsoft Windows", Ole Matzura and Anders Wennborg, Computer Applications in the Biosciences (CABIOS), Vol. 12 no. 3 1996, 247-249.).

Deutlich ist aus den Figuren 4 und 5 zu erkennen, dass das eingezeichnete minimale Bindungsmotiv, also die Interaktionsdomäne der Aptamere mit ihrem Zielmolekül, im Pol-III-Helix-Kontext erhalten bleiben. Im Gegensatz dazu werden sie in der Expressionskassette D1 (Abb. 6 und 7) durch Interaktion mit den Sequenzen der Expressionskassetten gestört. Die Pol-

III-Expressionskassette scheint also durch ihre kompakte Struktur besser zur Erhaltung von Aptamerstrukturen geeignet zu sein, als bislang meist zur Expression von Ribozymen verwendete (Expressions-) Konstrukte.

Beispiel 4: Umfang der Expression von in erfindungsgemäßen [der] Pol-III-Helixkassetten enthaltenen bzw. durch diese exprimierte funktionalen Nukleinsäuren

COS-1-Zellen wurden transient mit dem Plasmid pU6+1 (Bertrand et al., RNA 3 (1997), 75-88) durch Lipofektion transfiziert, indem die Pol-III-Helixkassetten durch die Restriktionsschnittstellen Sal I und Hind III direkt hinter den U6 snRNA-Promotor kloniert wurden. 24 h nach der Transfektion wurde die RNA aus den Zellen isoliert. Gesamt-RNA wurde durch Extraktion mittels der Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroformmethode isoliert. Zur Präparation von zytoplasmatischer RNA wurden 4×10^6 Zellen transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen abzentrifugiert und einmal mit kaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 400 μ l Northern-Lysispuffer (10 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 1,5 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, pH 8,0, 0,5 % NP40) 5 min auf Eis inkubiert und die Zellkerne durch Zentrifugation (14 000 rpm, 2 min, RT) entfernt. Dem Überstand wurden 16 μ l 10 %-iges SDS und 2,5 μ l Proteinase K-Stocklösung (20 mg/ml) zugesetzt. Nach der Proteasebehandlung bei 37°C für 15 min wurde die Reaktion zweimal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) und einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) extrahiert, und anschließend die RNA mit Ethanol präzipitiert. Das Pellet wurde in 100 μ l RNA-Puffer (150mM NaCl, 10mM Tris-Cl (pH 8,0), 1mM MgCl₂, 1mM EDTA (pH 8,0)) aufgelöst und zur Entfernung kontaminierender DNA mit 10 U DNase I für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach einer weiteren Phenol- und Chloroformextraktion wurde die präzipitierte RNA in 50 μ l H₂O gelöst. Die Integrität der isolierten RNA wurde durch Agarosegelelektrophorese von ca. 2 μ g zellulärer RNA und Visualisierung der 28S- und 18S-RNA-Banden mit Ethidiumbromid überprüft. Für weitere Experimente wurden nur Proben verwendet, die keine offensichtliche Degradation der zellulären RNA zeigten. RNA aus dem Zellkern wurde wie folgt isoliert. 10^7 Zellen wurden resuspendiert und zweimal mit PBS (4°C) gewaschen und danach in 7 ml kaltem Puffer H (15 mM NaCl, 60mM KCl, 1 mM EDTA, 10mM Tris, 0,2% NP40, 5% Sucrose, pH7,5) aufgenommen. Die Zelllysate wurden dann in einen Zellzerkleinerer aufgenommen und durch viermaliges Auf- und Abbewegen des Pistills [aufgeschlossen. Die Zellkerne wurden durch Zentrifugation (3500 g, 20 min) durch eine

Sucroselösung (Puffer H ohne NP40, mit 10% Sucrose) gereinigt. Die RNA aus den Zellkernen wurde dann durch die gleiche Prozedur, wie die Gesamt-RNA extrahiert.

Zur Quantifizierung der erfindungsgemäßen Pol-III-Helix-Transkripte wurden Dot-Blot-Analysen wie beschrieben (Blind et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999), 3606-3610) mit einigen Modifikationen durchgeführt. Für jedes Transkript wurden komplementäre synthetische Oligonukleotide (Länge ca. 30 Basen) *in vitro* mit T4-Oligonukleotidkinase am 5'-Ende radioaktiv markiert. Zur Quantifizierung der RNA-Mengen wurden definierte Mengen an *in vitro* transkribierter RNA als Mengenstandards auf den gleichen Nylonmembranen wie die zellulären Präparationen immobilisiert. Die Auswertung der Hybridisierungssignale erfolgte mittels eines Phosphorimagers.

Die Quantifizierung der Gesamt-RNA erbrachte für die erfindungsgemäßen Pol-III-Helix-Expressionskonstrukte Werte von 2×10^5 bis über 4×10^5 Kopien pro Zelle. Die Kopienzahl wurde anhand der aufgetragenen Mengen an zellulärer RNA und den darin enthaltenen Signalen für die jeweiligen Transkripte abgeschätzt. Im Vergleich zu anderen beschriebenen RNA-Expressionssystemen sind diese intrazellulären Konzentrationen sehr hoch. Mit anderen Expressionskassetten nach dem Stand der Technik, die in Verbindung mit RNA-Polymerase III Promotoren verwendet werden, werden meist Expressionsniveaus erreicht, die um ein bis zwei Größenordnungen unter den hier vorgestellten Werten liegen (vgl. beispielsweise Good et al., Gene Ther. 4 (1997), 45-54; Bertrand et al., RNA 3 (1997), 75-88). Die erfindungsgemäßen Pol-III-Helix-Konstrukte reichen in ihrer Transkriptionseffektivität an die höchstprozessiven viralen Expressionssysteme heran, die beispielsweise rekombinante Vacciniaviren als Vektoren in Verbindung mit Transkriptionseinheiten unter der Kontrolle von T7-RNA-Polymerasepromotoren aus dem T7-Bakteriophagen nutzen (Fuerst und Moss, J. Mol. Biol. 206 (1989), 333-348; Blind et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999), 3606-3610). Damit vereint das erfindungsgemäße Pol-III-Helix Expressionssystem überraschenderweise einerseits sehr hohe Transkriptionsausbeuten mit Strukturelementen, die eine optimale Funktionalität von Aptameren garantieren. Darüberhinaus eignen sich die ubiquitär in Eukaryonten vorkommenden RNA-Polymerase-III-Promotoren zur Expression von funktionalen RNA-Molekülen in allen eukaryontischen Zellen. Virale Systeme sind dagegen oft auf das jeweilige Wirtsspektrum limitiert.

Beispiel 5: Lokalisation der Pol-III-Helix-Transkripte

Um die Lokalisierung der unter Verwendung der erfindungsgemäßen Expressionssysteme hergestellten Pol-III-Helixtranskripte zu untersuchen, wurden transiente Transfektionen in COS-1-Zellen mit unterschiedlichen Konstrukten durchgeführt. Hierzu wurden verschiedene Variationen der aus den C1- und C2-Motiven gebildeten Helix konstruiert (Fig 8 a, b, c, d: PH1, PH2 PH3 und PH4). Als Insert-RNA wurde die Sequenz des Aptamers D28 gewählt (vgl auch Abb. 5). Zu bemerken ist, dass in Abbildung 4 die komplette Sequenz und Sekundärstruktur des PH1-Konstrukts des Aptamers D28 abgebildet ist. In Abbildung 8 wurden wegen der besseren Übersichtlichkeit nur die terminal gelegenen Helices (C1- und C2-Motiv), die A3-Box und der Terminator für die RNA-Polymerase-III gezeigt.

24h nach der Transfektion wurden die Zellen wie in der Literatur beschrieben einer *in situ* Hybridisierung unterzogen (Barcellini-Couget et al., *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 8 (1998) 379-390, Bertrand, et al., *Genes Dev.* 12 (1998), 2463-2468). Die spezifischen Sonden für die Transkripte wurden durch *in vitro* Transkription mit von komplementären Templaten hergestellt und gleichzeitig mit Digoxigenin markiert. Nach der Hybridisierung wurden die Zellen mit 0,2 X SSC, 50% Formamid bei 50°C gewaschen. Das Signal wurde dann durch einen mit alkaliner Phosphatase gekoppelten anti-Digoxigenin Antikörper nachgewiesen. Die Ergebnisse wurden mittels Mikroskopie ausgewertet und in Tabelle 1 unten dargestellt. Im Durchschnitt wurden ca. hundert Zellen pro Auswertung herangezogen. Mit ++ ist die jeweilige Lokalisation der verschiedenen Pol-III-Helix-Konstrukte in mindestens 80% der ausgewerteten Zellen angegeben. Die Pol-III-Helix-Konstrukte PH1, PH3 und PH4 wurden eindeutig ins Zytoplasma transportiert. Überraschenderweise wurde das Konstrukt PH2 im Zellkern zurückgehalten. Dies legt die Vermutung nahe, dass in diesem Fall die nicht basengepaarten Nukleotide am 5'-Ende für die Lokalisation im Zellkern verantwortlich sind.

Tabelle 1: Lokalisierung der Pol III- Helix-Expressionskonstrukte

	<u>Zytoplasma</u>	<u>Zellkern</u>
PH 1	++	-
PH 2	-	++
PH 3	++	-
PH 4	++	-

Die in der vorstehenden Beschreibung, den Ansprüchen sowie den Zeichnungen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausführungsformen wesentlich sein.

Ansprüche

1. Nukleinsäuresequenz zur Expression einer in die Nukleinsäuresequenz zu inserierenden Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenz in 5'- 3'- Richtung die folgenden Elemente umfasst:

ein C1- Motiv,
eine A1-Box,
eine A2-Box,
ein C2-Motiv,
eine A3-Box, und
einen Terminator,

wobei das C1-Motiv und das C2-Motiv zusammen eine Helix ausbilden;

die A1-Box k Basen umfasst, wobei k unabhängig von l und m eine ganze Zahl von 0 bis 100 ist;

die A2-Box l Basen umfasst, wobei l unabhängig von k und m eine ganze Zahl von 0 bis 100 ist; und

die A3-Box m Basen umfasst, wobei m unabhängig von k und l eine ganze Zahl von 0 bis 20 ist.

2. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass

k unabhängig von l und m eine ganze Zahl von 0 bis 20, bevorzugterweise von 5 bis 15 ist;

l unabhängig von k und m eine ganze Zahl von 0 bis 20, bevorzugterweise von 5 bis 15 ist; und

m unabhängig von k und l eine ganze Zahl von 0 bis 9 ist.

3. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass

das C1-Motiv n Basen umfasst, wobei n unabhängig von p , k , l und m eine ganze Zahl ≥ 10 ist und

das C2-Motiv p Basen umfasst, wobei p unabhängig von n , k , l und m eine ganze Zahl ≥ 10 ist.

4. Nukleinsäure nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass

n unabhängig von p , k , l und m eine ganze Zahl ≥ 16 , bevorzugterweise ≥ 20 ist und

p unabhängig von n , k , l und m eine ganze Zahl ≥ 16 , bevorzugterweise ≥ 20 ist.

5. Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die von C1 und C2 zusammen gebildete Doppelhelix mindestens 10 Basenpaarungen umfasst.

6. Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Terminator ein Terminator für die RNA-Polymerase III ist.

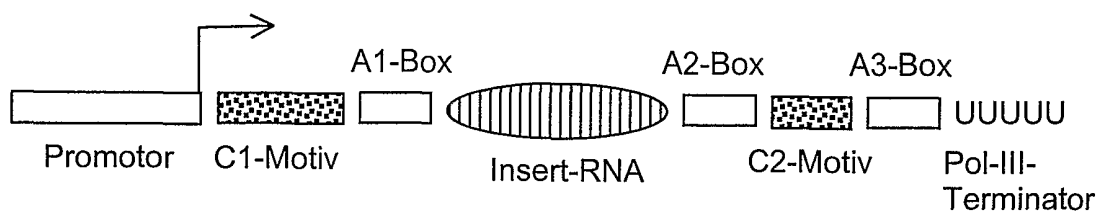
7. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Terminator vier oder mehr aufeinanderfolgende Uridin-Basen für den Fall, dass die Nukleinsäuresequenz eine RNA-Sequenz ist, und vier oder mehr aufeinanderfolgende Thymin-Basen umfasst, für den Fall, dass die Nukleinsäuresequenz eine DNA-Sequenz ist.

8. Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass sie weiter einen Promotor umfasst, insbesondere einen Promotor für RNA-Polymerase III.

9. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Promotor ausgewählt ist aus der Gruppe, die Promotoren von 5S-RNA-Genen, U6 sn RNA-Promotoren, tRNA-Promotoren, 7 SL-RNA-Promotoren und VA-RNA-Promotoren umfasst.

10. Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenz weiter die zu inserierende Nukleinsäure umfasst, wobei die zu inserierende Nukleinsäure bevorzugterweise zwischen der A1-Box und der A2-Box angeordnet ist.

11. Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die zu inserierende Nukleinsäure eine funktionale Nukleinsäure ist.
12. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die funktionale Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Aptamere, Intramere, Aptamzyme, allosterische Zentren von Aptazymen und Ribozyme umfasst.
13. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass die funktionale Nukleinsäure mit einem Zielmolekül, insbesondere einem Nukleinsäure-Zielmolekül über einen Mechanismus in Wechselwirkung tritt, der verschieden ist von komplementärer Basenpaarung.
14. Expressionssystem umfassend eine Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 13.
15. Expressionssystem nach Anspruch 14 für die Expression, bevorzugterweise für die Transkription, einer funktionalen Nukleinsäure.
16. Expressionssystem für die Expression einer funktionalen Nukleinsäure umfassend die folgende Struktur.



wobei das C1-Motiv und das C2-Motiv zusammen eine Helix ausbilden;

die A1-Box k Basen umfasst, wobei k unabhängig von l und m eine ganze Zahl von 0 bis 100 ist;

die A2-Box l Basen umfasst, wobei l unabhängig von k und m eine ganze Zahl von 0 bis 100 ist; und

die A3-Box m Basen umfasst, wobei m unabhängig von k und l eine ganze Zahl von 0 bis 20 ist.

17. Expressionssystem nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass

das C1-Motiv n Basen umfasst, wobei n unabhängig von p, k, l und m eine ganze Zahl ≥ 10 ist und

das C2-Motiv p Basen umfasst, wobei p unabhängig von n, k, l und m eine ganze Zahl ≥ 10 ist.
18. Expressionssystem nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Werte von k, l, m, n und p dieselben sind wie bei der Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 13.
19. Vektor umfassen eine Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 13 oder ein Expressionssystem nach einem der Ansprüche 14 bis 18.
20. Zelle umfassend eine Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 13, oder ein Expressionssystem nach einem der Ansprüche 14 bis 18 oder einen Vektor nach Anspruch 19.
21. Zelle nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Zelle eine eukaryontische Zelle, bevorzugterweise eine Säugetierzelle ist.
22. Zelle nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Zelle eine menschliche Zelle ist.
23. Zelle nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Zelle eine Pflanzenzelle ist.
24. Transgenes Tier umfassend eine Zelle nach einem der Ansprüche 20 bis 22.
25. Transgenes Tier nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass das Tier ausgewählt ist aus der Gruppe, die Säugetiere, Fische, Insekten und Nematoden umfaßt.

26. Transgenes Tier nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass das Tier ein Säugetier ist und bevorzugterweise ausgewählt ist aus der Gruppe, die Mäuse, Ratten, Kaninchen, Hunde, Schweine, Schafe, Kühe, Pferde, Ziege, Esel, Kamele, Hühner und Affen umfasst.
27. Transgene Pflanze umfassend eine Zelle nach Anspruch 23.
28. Transgene Pflanze nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe, die Nutzpflanzen, Gemüsepflanzen, Reis, Weizen, Mais, Maniok, Kartoffel, Hirse, Soja, Tomaten, Baumwolle, Erbsen, Tabak, Bohnen und *Arabidopsis thaliana*.
29. Verwendung der Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 13 für die Targetvalidierung
30. Verwendung der Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 13 für die Targetidentifizierung
31. Verwendung der Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 13 für die Gentherapie.
32. Verwendung nach einem der Ansprüche 29 bis 31, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenz das Expressionssystem nach einem der Ansprüche 14 bis 18 ist.
33. Verfahren zur gentherapeutischen Behandlung eines Organismus, dadurch gekennzeichnet, dass dem Organismus eine Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 13 oder ein Expressionssystem nach einem der Ansprüche 14 bis 18 oder ein Vektor nach Anspruch 19 oder eine Zelle nach einem der Ansprüche 20 bis 22 verabreicht wird.
34. Medikament umfassend eine Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 13 und/oder ein Expressionssystem nach einem der Ansprüche 14 bis 18, einen Vektor nach Anspruch 19 oder eine Zelle nach einem der Ansprüche 20 bis 22.

Fig. 1

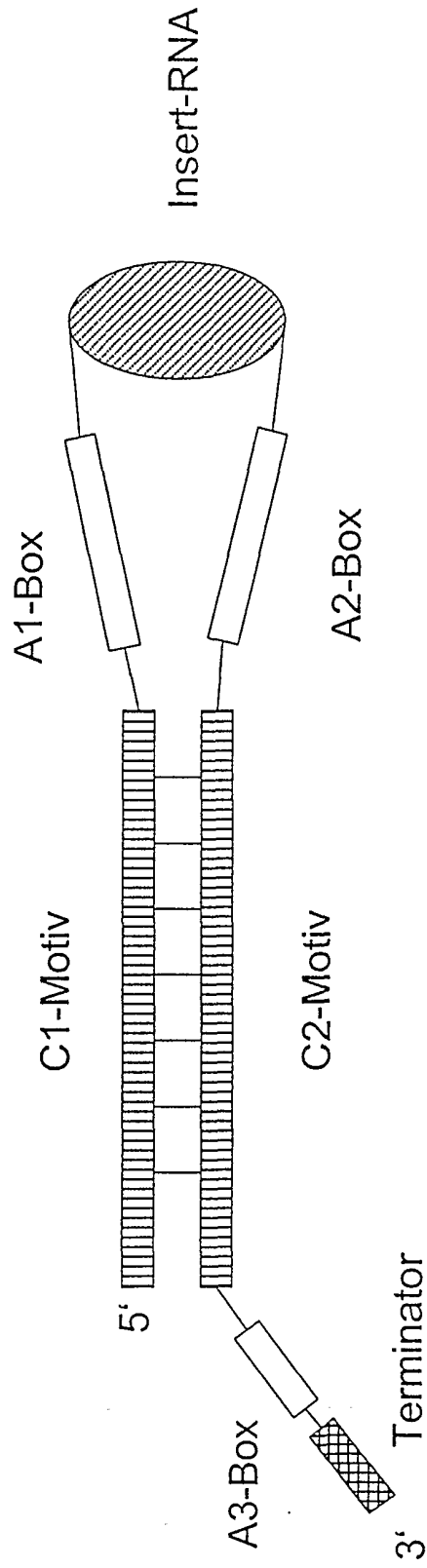


Fig. 2

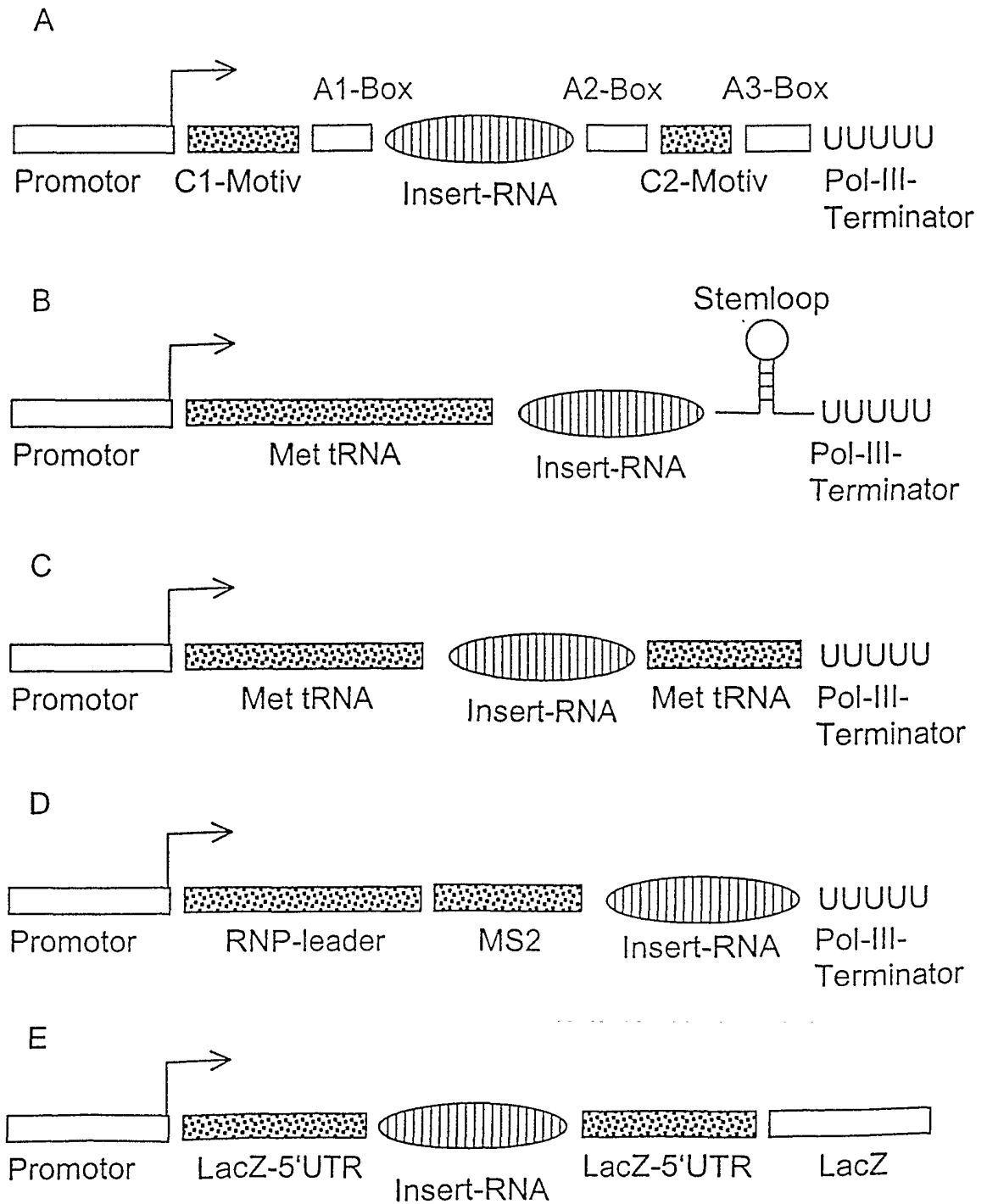


Fig. 5

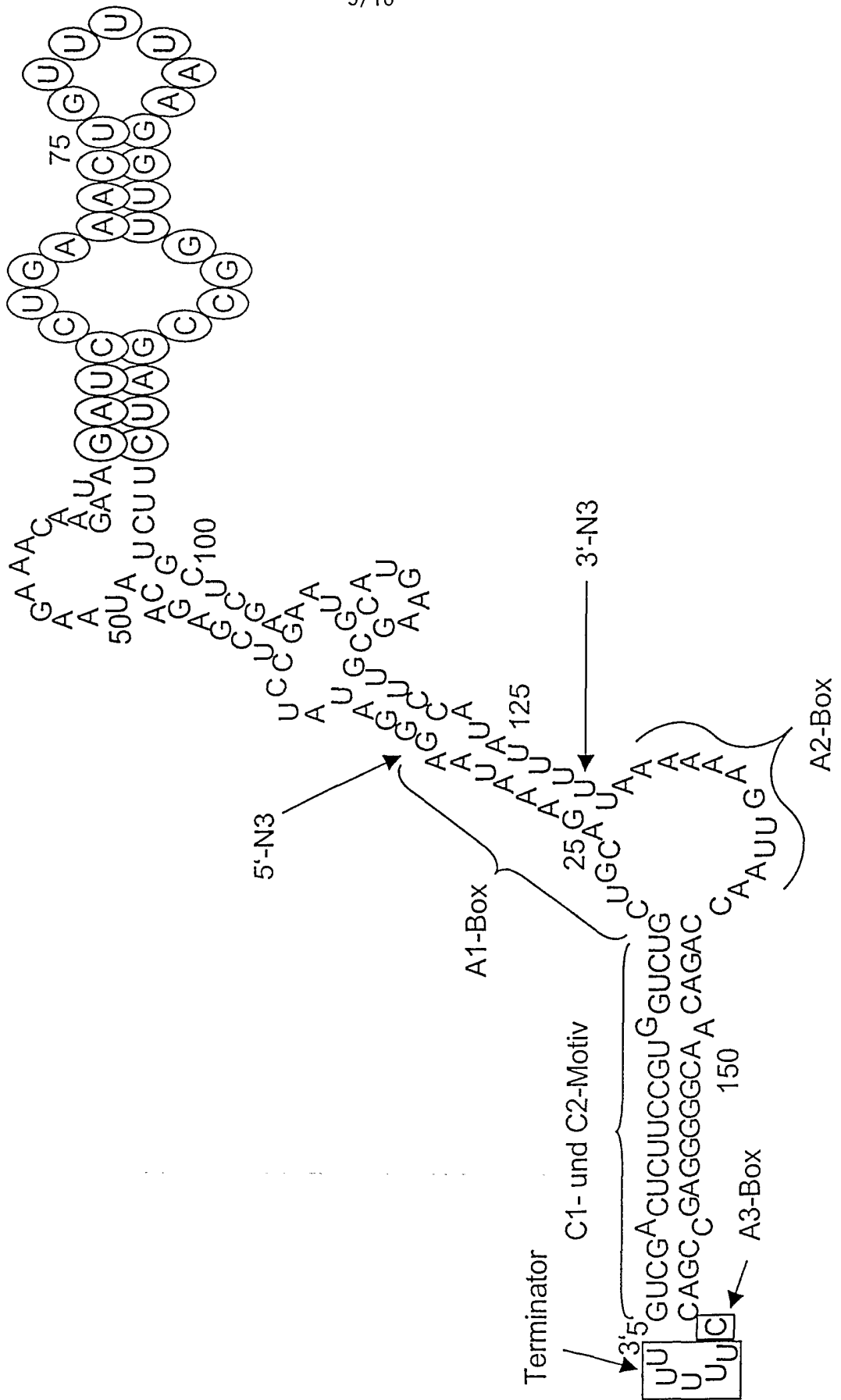
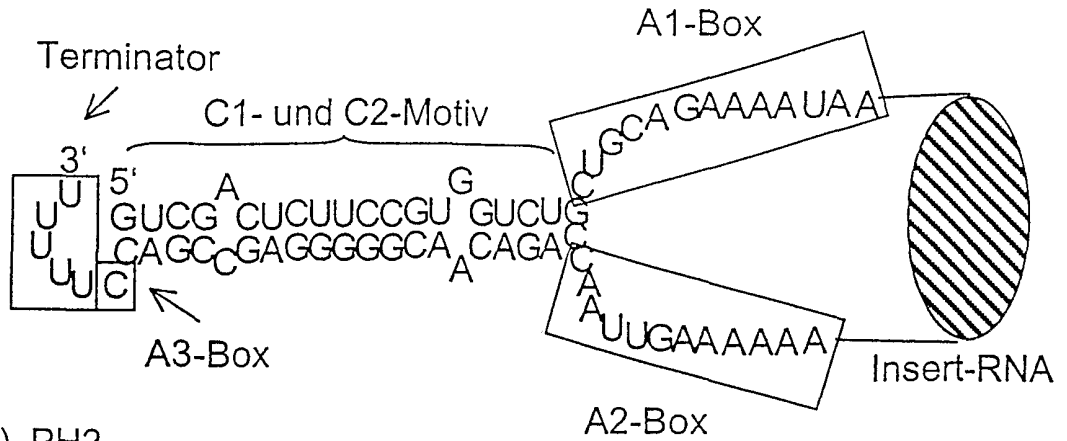
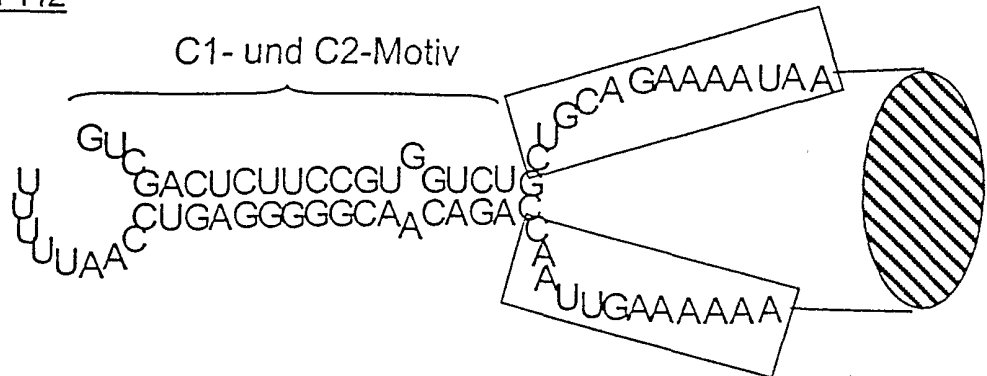


Fig. 8

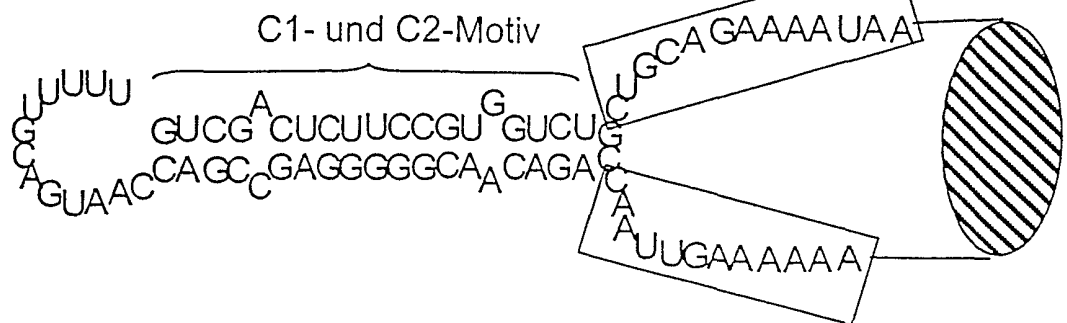
A) PH1



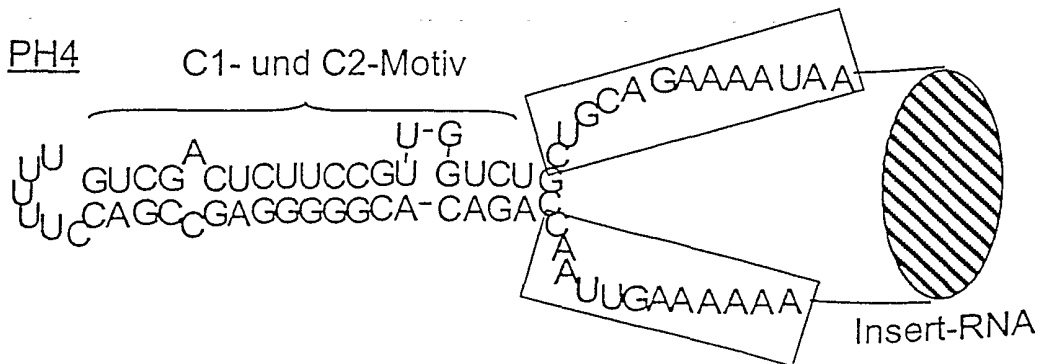
B) PH2



C) PH3



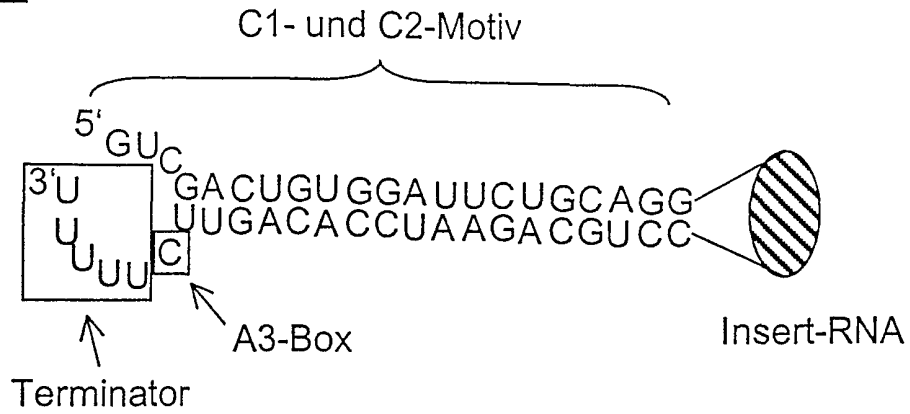
D) PH4



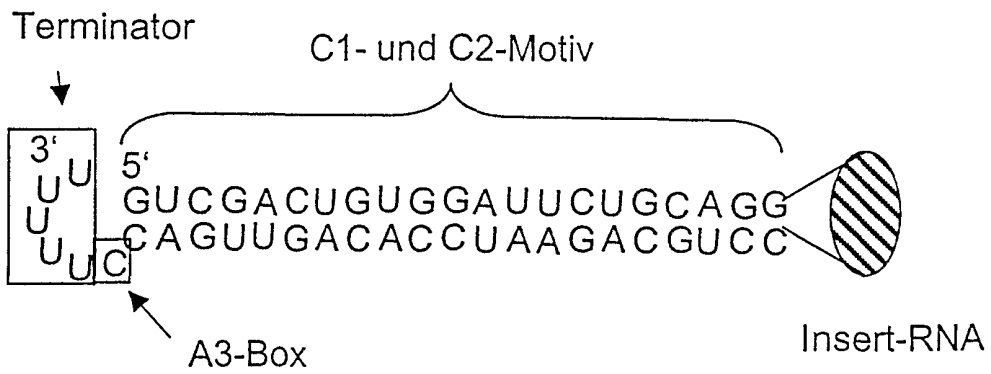
9/10

Fig. 9

A) PH5



B) PH6



C) PH7

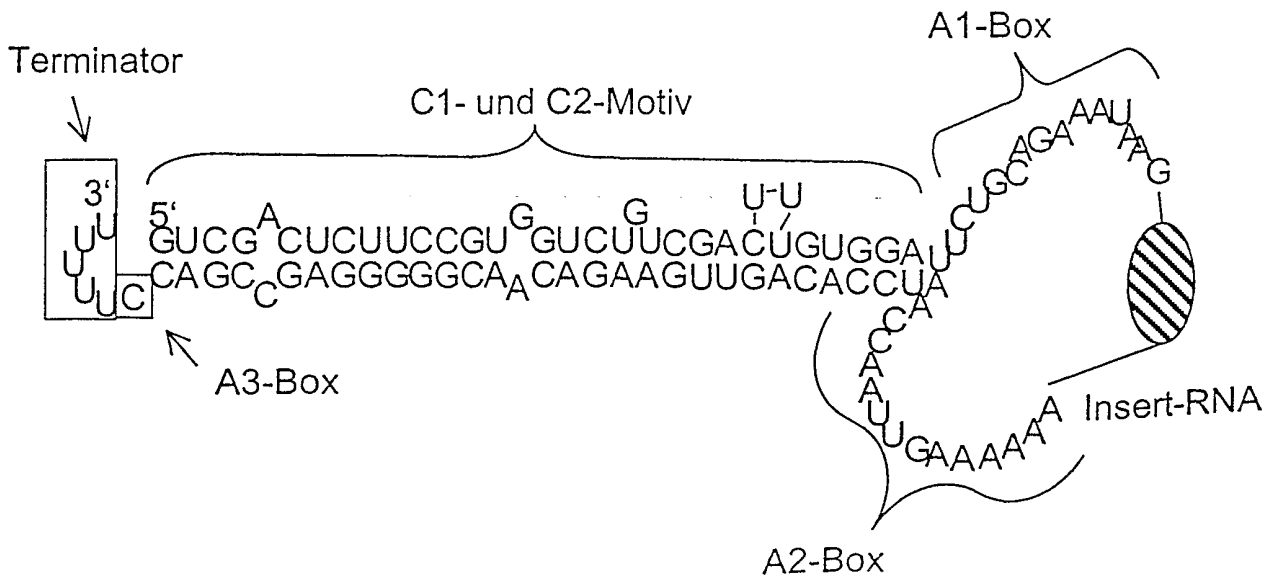
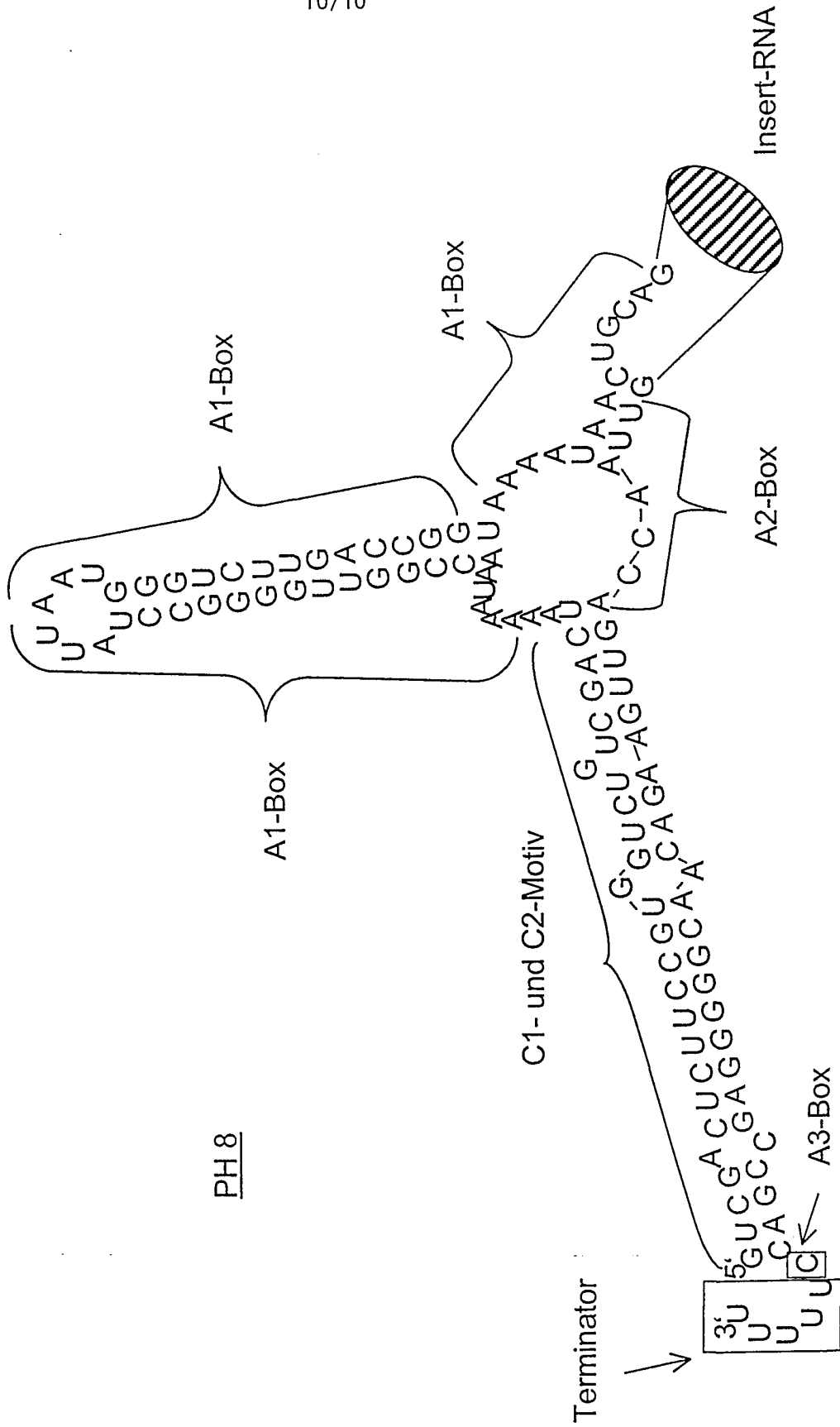


Fig. 10



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/10905

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/85 C12N15/82 C12N15/11 A61K48/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	THOMPSON J D ET AL: "IMPROVED ACCUMULATION AND ACTIVITY OF RIBOZYMES EXPRESSED FROM A TRNA-BASED RNA POLYMERASE III PROMOTER" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 23, no. 12, 1995, pages 2259-2268, XP002033297 ISSN: 0305-1048 page 2264, right-hand column, paragraph 1 -page 2266, right-hand column, paragraph 1; figures 1,3,5,7	1-12, 14-22, 29, 32-34
Y	die gleichen Passagen	1-34
	---	-/--
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 9 January 2002		Date of mailing of the international search report 25/01/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Steffen, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/10905

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 647 716 A (UNIV NICE SOPHIA ANTIPOLIS) 12 April 1995 (1995-04-12) page 3, line 3 - line 20 page 4, line 5 - line 48 page 5, line 10 - line 33; figures 1,2,6,10; examples 1-3,6	1-12, 14-21, 29,32-34
Y	die gleichen Passagen	1-34
X	US 5 695 992 A (LIEBER ANDRE ET AL) 9 December 1997 (1997-12-09) column 2, line 32 -column 3, line 16; figures 1,2A; example 1	1-12, 14-19
A	MA YULIANG ET AL: "Structure, function, and evolution of adenovirus-associated RNA: A phylogenetic approach." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 70, no. 8, 1996, pages 5083-5099, XP002186885 ISSN: 0022-538X abstract; figures 1,6-8	
X	PERRIMAN RHONDA ET AL: "Effective ribozyme delivery in plant cells." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 92, no. 13, 1995, pages 6175-6179, XP002186886 1995 ISSN: 0027-8424 page 6175, right-hand column, paragraph 1 -page 6176, left-hand column, paragraph 3; figure 1	1,6-12, 14-16, 18-21, 23,29,32
X	COTTEN M ET AL: "RIBOZYME MEDIATED DESTRUCTION OF RNA IN VIVO" EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 8, no. 12, 1 December 1989 (1989-12-01), pages 3861-3866, XP000616603 ISSN: 0261-4189 cited in the application page 3866; figure 1	1,6-12, 14-16, 18-21, 29,32
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/10905

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>THOMPSON JAMES D: "Strategies to express structural and catalytic RNAs in mammalian cells." METHODS IN ENZYMOLOGY, vol. 306, 1999, pages 241-260, XP001026501 systems. 1999 Academic Press Inc.; Academic Press Ltd. 525 B Street, Suite 1900, San Diego, CA, 92101-4495, USA; 24-28 Oval Road, London, NW1 7DX, UK ISBN: 0-12-182207-9 page 243, paragraph 2 -page 247, paragraph 1; table II page 252, paragraph 1 -page 257, paragraph 1; figures 4,5 page 257, last paragraph -page 259, paragraph 1</p>	1-34
A	<p>BERTRAND E ET AL: "THE EXPRESSION CASSETTE DETERMINES THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF RIBOZYMES IN MAMMALIAN CELLS BY CONTROLLING THEIR INTRACELLULAR LOCALIZATION" RNA, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, CAMBRIDGE, GB, vol. 3, no. 1, 1997, pages 75-88, XP000646611 ISSN: 1355-8382 page 77, left-hand column, paragraph 2 -right-hand column, last paragraph; figure 2</p>	
A	<p>SYMENSMA ET AL: "RNA aptamers selected to bind human immunodeficiency virus type 1 rev in vitro are rev responsive in vivo" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 70, no. 1, 1996, pages 179-187, XP002094212 ISSN: 0022-538X page 179 -page 180; figure 1</p>	
A	<p>BLIND ET AL: "CYTOPLASMIC RNA MODULATORS OF AN INSIDE-OUT SIGNAL-TRANSDUCTION CASCADE" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 96, March 1999 (1999-03), pages 3606-3610, XP002113353 ISSN: 0027-8424 cited in the application page 3606, right-hand column, last paragraph -page 3607, left-hand column, paragraph 1; figures 1,2</p>	

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/10905

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BECK J ET AL: "EFFICIENT HAMMERHEAD RIBOZYME-MEDIATED CLEAVAGE OF THE STRUCTURED HEPATITIS B VIRUS ENCAPSIDATION SIGNAL IN VITRO AND IN CELL EXTRACTS, BUT NOT IN INTACT CELLS" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 23, no. 24, 25 December 1995 (1995-12-25), pages 4954-4962, XP000647776 ISSN: 0305-1048 page 4957; figure 4 -----	
A	NOONBERG S B ET AL: "IN VIVO GENERATION OF HIGHLY ABUNDANT SEQUENCE-SPECIFIC OLIGONUCLEOTIDES FOR ANTISENSE AND TRIPLEX GENE REGULATION" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 22, no. 14, 1994, pages 2830-2836, XP001038073 ISSN: 0305-1048 abstract; figure 1 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/10905

Patent document cited in search report	A	Publication date	EP	Patent family member(s)	Publication date
EP 0647716	A	12-04-1995	EP	0647716 A1	12-04-1995
US 5695992	A	09-12-1997	DE	4424761 C1	08-06-1995
			WO	9601315 A1	18-01-1996
			EP	0767834 A1	16-04-1997
			US	RE37411 E1	16-10-2001
			US	6130092 A	10-10-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/10905

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/85 C12N15/82 C12N15/11 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	THOMPSON J D ET AL: "IMPROVED ACCUMULATION AND ACTIVITY OF RIBOZYMES EXPRESSED FROM A TRNA-BASED RNA POLYMERASE III PROMOTER" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 23, Nr. 12, 1995, Seiten 2259-2268, XP002033297 ISSN: 0305-1048 Seite 2264, rechte Spalte, Absatz 1 -Seite 2266, rechte Spalte, Absatz 1; Abbildungen 1,3,5,7	1-12, 14-22, 29,32-34
Y	die gleichen Passagen	1-34

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9. Januar 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

25/01/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Steffen, P

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 647 716 A (UNIV NICE SOPHIA ANTIPOLIS) 12. April 1995 (1995-04-12) Seite 3, Zeile 3 - Zeile 20 Seite 4, Zeile 5 - Zeile 48 Seite 5, Zeile 10 - Zeile 33; Abbildungen 1,2,6,10; Beispiele 1-3,6	1-12, 14-21, 29,32-34
Y	die gleichen Passagen	1-34
X	US 5 695 992 A (LIEBER ANDRE ET AL) 9. Dezember 1997 (1997-12-09) Spalte 2, Zeile 32 -Spalte 3, Zeile 16; Abbildungen 1,2A; Beispiel 1	1-12, 14-19
A	MA YULIANG ET AL: "Structure, function, and evolution of adenovirus-associated RNA: A phylogenetic approach." JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 70, Nr. 8, 1996, Seiten 5083-5099, XP002186885 ISSN: 0022-538X Zusammenfassung; Abbildungen 1,6-8	
X	PERRIMAN RHONDA ET AL: "Effective ribozyme delivery in plant cells." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 92, Nr. 13, 1995, Seiten 6175-6179, XP002186886 1995 ISSN: 0027-8424 Seite 6175, rechte Spalte, Absatz 1 -Seite 6176, linke Spalte, Absatz 3; Abbildung 1	1,6-12, 14-16, 18-21, 23,29,32
X	COTTEN M ET AL: "RIBOZYME MEDIATED DESTRUCTION OF RNA IN VIVO" EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 8, Nr. 12, 1. Dezember 1989 (1989-12-01), Seiten 3861-3866, XP000616603 ISSN: 0261-4189 in der Anmeldung erwähnt Seite 3866; Abbildung 1	1,6-12, 14-16, 18-21, 29,32
	-/--	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>THOMPSON JAMES D: "Strategies to express structural and catalytic RNAs in mammalian cells." METHODS IN ENZYMOLOGY, Bd. 306, 1999, Seiten 241-260, XP001026501 systems. 1999 Academic Press Inc.; Academic Press Ltd. 525 B Street, Suite 1900, San Diego, CA, 92101-4495, USA; 24-28 Oval Road, London, NW1 7DX, UK ISBN: 0-12-182207-9 Seite 243, Absatz 2 -Seite 247, Absatz 1; Tabelle II Seite 252, Absatz 1 -Seite 257, Absatz 1; Abbildungen 4,5 Seite 257, letzter Absatz -Seite 259, Absatz 1</p>	1-34
A	<p>BERTRAND E ET AL: "THE EXPRESSION CASSETTE DETERMINES THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF RIBOZYMES IN MAMMALIAN CELLS BY CONTROLLING THEIR INTRACELLULAR LOCALIZATION" RNA, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, CAMBRIDGE, GB, Bd. 3, Nr. 1, 1997, Seiten 75-88, XP000646611 ISSN: 1355-8382 Seite 77, linke Spalte, Absatz 2 -rechte Spalte, letzter Absatz; Abbildung 2</p>	
A	<p>SYMENSMA ET AL: "RNA aptamers selected to bind human immunodeficiency virus type 1 rev in vitro are rev responsive in vivo" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, Bd. 70, Nr. 1, 1996, Seiten 179-187, XP002094212 ISSN: 0022-538X Seite 179 -Seite 180; Abbildung 1</p>	
A	<p>BLIND ET AL: "CYTOPLASMIC RNA MODULATORS OF AN INSIDE-OUT SIGNAL-TRANSDUCTION CASCADE" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, Bd. 96, März 1999 (1999-03), Seiten 3606-3610, XP002113353 ISSN: 0027-8424 in der Anmeldung erwähnt Seite 3606, rechte Spalte, letzter Absatz -Seite 3607, linke Spalte, Absatz 1; Abbildungen 1,2</p>	

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>BECK J ET AL: "EFFICIENT HAMMERHEAD RIBOZYME-MEDIATED CLEAVAGE OF THE STRUCTURED HEPATITIS B VIRUS ENCAPSIDATION SIGNAL IN VITRO AND IN CELL EXTRACTS, BUT NOT IN INTACT CELLS" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 23, Nr. 24, 25. Dezember 1995 (1995-12-25), Seiten 4954-4962, XP000647776 ISSN: 0305-1048 Seite 4957; Abbildung 4 ----</p>	
A	<p>NOONBERG S B ET AL: "IN VIVO GENERATION OF HIGHLY ABUNDANT SEQUENCE-SPECIFIC OLIGONUCLEOTIDES FOR ANTISENSE AND TRIPLEX GENE REGULATION" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 22, Nr. 14, 1994, Seiten 2830-2836, XP001038073 ISSN: 0305-1048 Zusammenfassung; Abbildung 1 -----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/10905

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0647716	A	12-04-1995	EP	0647716 A1	12-04-1995
US 5695992	A	09-12-1997	DE	4424761 C1	08-06-1995
			WO	9601315 A1	18-01-1996
			EP	0767834 A1	16-04-1997
			US	RE37411 E1	16-10-2001
			US	6130092 A	10-10-2000