



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 29 225 T2** 2007.07.05

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 196 559 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 29 225.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/18256**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 943 373.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/002559**

(86) PCT-Anmeldetag: **30.06.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **11.01.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.04.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **05.07.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **05.07.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/11 (2006.01)**

C12N 15/10 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

142072 P 02.07.1999 US

(73) Patentinhaber:

Invitrogen Corp., Carlsbad, Calif., US

(74) Vertreter:

**Bosch, Graf von Stosch, Jehle
Patentanwalts-gesellschaft mbH, 80639 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**ASTATKE, Mekbib, Germantown, MD 20874, US;
CHATTERJEE, Deb, North Potomac, MD 20878,
US; GERARD, Gary, Frederick, MD 21704, US**

(54) Bezeichnung: **ZUSAMMENSETZUNGEN UND VERFAHREN ZU HÖHERE EMPFINDLICHKEIT UND SPEZIFITÄT
VON NUKLEINSÄURESYNTHESE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Erhöhen der Sensitivität und Spezifität der Nukleinsäure-Synthese durch Reduzieren nicht-spezifischer Nukleinsäure-Synthese, die bei der Umgebungstemperatur auftritt. Die Erfindung betrifft ebenfalls neue Nukleinsäuren, welche hohe Affinität zu Polymerasen aufweisen. Die Verfahren und Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können in DNA-Sequenzierungs-, -Amplifikations-Reaktionen, Nukleinsäure-Synthese und cDNA-Synthese verwendet werden.

[0002] Die Erfindung betrifft ebenfalls Nukleinsäuren und -Zusammensetzungen, welche in der Lage sind, die Nukleinsäure-Synthese, -Sequenzierung, -Amplifikation und cDNA-Synthese, zum Beispiel durch Binden eines oder mehr Polypeptids/e mit Polymerase-Aktivität, zu inhibieren oder zu verhindern. Zusätzlich können die Materialien und Verfahren der vorliegenden Erfindung als Therapeutika zum Inhibieren der Replikation von Organismen, die von einer reverse Transkriptase-Aktivität zur Vervollständigung deren Lebenszykluses abhängen, wie zum Beispiel Retroviren, verwendet werden. Die Erfindung betrifft ebenfalls Vektoren und Wirtszellen, die solche Nukleinsäure-Moleküle umfassen. Die Erfindung betrifft ebenfalls Kits, die Zusammensetzungen oder Nukleinsäuren der vorliegenden Erfindung umfassen.

Hintergrund der Erfindung

[0003] DNA-Polymerasen synthetisieren die Bildung von DNA-Molekülen, welche zu einer DNA-Matrize komplementär sind. Nach der Hybridisierung eines Primers an die einzel-strängige DNA-Matrize synthetisieren Polymerasen die DNA in die 5'-nach-3'-Richtung, wobei Nukleotide an die 3'-Hydroxyl-Gruppe des wachsenden Stranges sukzessiv hinzugefügt werden. Somit kann in Gegenwart von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) und eines Primers ein neues zu der einzel-strängigen DNA-Matrize komplementäres DNA-Molekül synthetisiert werden.

[0004] Sowohl mesophile als auch thermophile DNA-Polymerasen werden verwendet, um Nukleinsäuren zu synthetisieren. Verwendung thermostabiler Polymerasen wird gegenüber der Verwendung mesophiler Polymerasen bevorzugt, da die bei thermostabilen Polymerasen verwendeten hohen Annealing-Temperaturen zu weniger nicht-spezifischer DNA-Amplifikation aus Verlängerung „fehl-annealter“ Primer führen. Jedoch können sogar mit thermostabilen Polymerasen gewisse Primer-Sequenzen und bestimmte experimentelle Bedingungen zur Synthese einer signifikanten Menge nicht-spezifischer DNA-Produkte führen. Diese nicht-spezifischen Produkte können die Sensitivität von Polymerase-basierten Assays reduzieren und können umfangreiche Optimierung für jeden Primer-Satz erfordern. Zusätzlich wird dieses Problem verstärkt, wenn Polymerasen, die ein hohes Aktivitäts-Niveau bei der Umgebungstemperatur aufweisen, eingesetzt werden (zum Beispiel, DNA-Polymerase aus *Thermotoga neapolitana*).

[0005] Beim Untersuchen der Struktur und Physiologie eines Organismus, eines Gewebes oder einer Zelle ist es oft wünschenswert, dessen/deren genetischen Inhalt zu bestimmen. Das genetische Gerüst eines Organismus wird in der doppel-strängigen Sequenz von Nukleotid-Basen in der Desoxyribonukleinsäure (DNA) kodiert, welche in den Körper- und Keim-Zellen des Organismus enthalten ist. Der genetische Inhalt eines bestimmten DNA-Segments oder Gens offenbart sich nur nach der Herstellung des Proteins und der RNA, für welche das Gen kodiert. Um ein Protein herzustellen, wird eine komplementäre Kopie eines Stranges der DNA-Doppelhelix (der „kodierende“ Strang) durch Polymerase-Enzyme hergestellt, was zu einer spezifischen Sequenz der Ribonukleinsäure (RNA) führt. Diese bestimmte Art der RNA wird als Boten-RNA („messenger RNA“, mRNA) bezeichnet, da sie die genetische Botschaft („message“) aus der DNA zur Herstellung eines Proteins enthält.

[0006] In einer gegebenen Zelle, einem Gewebe oder Organismus kommen viele mRNA-Arten vor, wobei jede für ein separates und spezifisches Protein kodiert. Diese Tatsache stellt ein leistungsfähiges Werkzeug für die Forscher bereit, die am Untersuchen der genetischen Expression in einem Gewebe oder einer Zelle interessiert sind. mRNA-Moleküle können isoliert und durch verschiedene molekularbiologische Techniken weiter manipuliert werden, wobei damit die Aufklärung des voll funktionsfähigen genetischen Inhalts einer Zelle, eines Gewebes oder Organismus ermöglicht wird.

[0007] Ein üblicher Ansatz zur Untersuchung der Genexpression ist die Herstellung komplementärer DNA(cDNA)-Klone. Bei dieser Technik werden die mRNA-Moleküle eines Organismus aus dem Extrakt der Zellen oder Gewebe des Organismus isoliert. Die Isolierung setzt oft Chromatographie-Matrizen ein, wie zum

Beispiel Cellulose oder Agarose, an welche Thymidin(T)-Oligomere komplexiert wurden. Da die 3'-Termini an den meisten eukaryontischen mRNA-Molekülen eine Folge aus Adenosin(A)-Basen enthalten und da A an T bindet, können die mRNA-Moleküle von anderen Molekülen und Substanzen in dem Gewebe oder Zellextrakt schnell aufgereinigt werden. Aus diesen aufgereinigten mRNA-Molekülen können cDNA-Kopien unter Verwendung des Enzyms reverse Transkriptase (RT) oder der DNA-Polymerasen mit RT-Aktivität hergestellt werden, was zur Herstellung einzel-strängiger cDNA-Moleküle führt. Die einzel-strängigen cDNAs können danach durch die Wirkung einer DNA-Polymerase in eine vollständige doppel-strängige DNA-Kopie (d.h., eine doppel-strängige cDNA) der Original-mRNA (und somit der doppel-strängigen Original-DNA-Sequenzen, die für diese mRNA kodieren, die in dem Genom des Organismus enthalten ist) umgewandelt werden. Die Protein-spezifischen doppel-strängigen cDNAs können danach in einen Vektor eingebaut werden, welcher danach in eine Bakterien-, Hefe-, Lebewesen- oder Pflanzen-Wirtszelle eingeführt wird, ein Verfahren, das als Transformation oder Transfektion bezeichnet wird. Die Wirtszellen werden danach in Kulturmedien gezüchtet, was zu einer Population an Wirtszellen führt, die das interessierende Gen oder Teile des interessierenden Gens enthalten (oder in vielen Fällen exprimieren).

[0008] Dieses gesamte Verfahren, ab der Isolierung der mRNA, über den Einbau der cDNA in einen Vektor (z.B. Plasmid, viraler Vektor, Cosmid, etc.), bis zum Züchten der Wirtszellenpopulationen, die das isolierte Gen oder die Genteile enthalten, wird als „cDNA-Klonieren“ bezeichnet. Sofern die cDNAs aus einer Anzahl an unterschiedlichen mRNAs präpariert werden, wird der resultierende Satz an cDNAs als eine „cDNA-Bibliothek“ bezeichnet, was ein geeigneter Term ist, da der Satz an cDNAs eine „Population“ an Genen oder Gen-Teilen darstellt, die die funktionsfähige genetische Information umfasst, die in der Zelle, dem Gewebe oder dem Organismus der Quelle vorhanden ist.

[0009] Die Synthese eines cDNA-Moleküls beginnt bei oder nahe den 3'-Termini der mRNA-Moleküle und prozessiert in die 5'-nach-3'-Richtung, wobei Nukleotide in den wachsenden Strang sukzessiv hinzugefügt werden. Primen der cDNA-Synthese an den 3'-Termini am Poly-A-Ende unter Verwendung eines Oligo-(dT)-Primers stellt sicher, dass die 3'-Botschaft der mRNAs in den hergestellten cDNA-Molekülen dargestellt wird. Die Fähigkeit, die Sensitivität und Spezifität während der cDNA-Synthese zu erhöhen, stellt repräsentativere cDNA-Bibliotheken bereit und kann die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass die cDNA-Bibliothek cDNA-Moleküle mit voller Länge (z.B. Gene mit voller Länge) aufweist. Solche Fortschritte würden die Wahrscheinlichkeit zum Finden interessierender Gene mit voller Länge stark verbessern.

[0010] Zusätzlich zu ihrer Bedeutung zu Forschungszwecken spielen reverse Transkriptase-Enzyme eine kritische Rolle im Lebenszyklus vieler bedeutender pathogener Viren, insbesondere der humanen Immunschwäche-Viren („human immunodeficiency viruses“, HIV). Um ihren Lebenszyklus zu vervollständigen, müssen HIV- und andere ähnliche Viren ein reverse Transkriptase-Enzym verwenden, um das virale RNA-Genom in die DNA zur Integration in das genomische Wirts-Material umzuwandeln. Da dieser Schritt für den viralen Lebenszyklus kritisch ist und Wirtszellen kein ähnliches Erfordernis nach der Aktivität der reversen Transkriptase aufweisen, wurde das reverse Transkriptase-Enzym als ein chemotherapeutisches Target intensiv untersucht. Im Allgemeinen war der Großteil der therapeutischen Reagenzien, die auf das reverse Transkriptase-Enzym gerichtet waren, Nukleotid-Analoga, zum Beispiel AZT. Andere therapeutische Modalitäten, die Oligonukleotid-basierte Reagenzien, z.B. „Antisense“-Oligonukleotide und Ribozyme, verwenden, wurden verwendet, um die virale Replikation zu inhibieren. Diese Reagenzien sind jedoch nicht spezifisch gegen die Aktivität der reversen Transkriptase gerichtet, stattdessen waren sie gegen die Nukleinsäure des viralen Genoms gerichtet. Siehe, zum Beispiel, Goodchild et al., „Inhibition of human immunodeficiency virus replication by antisense oligodeoxynucleotides“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5507–5511 (1988), Matsukara et al., „Regulation of viral expression of human immunodeficiency virus in vitro by an antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide against rev (art/trs) in chronically infected cells“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4244–4248 (1989), Rossi et al., „Ribozymes as Anti-HIV-1 Therapeutic Agents: Principles, Applications, and Problems“, *Aids Research and Human Retroviruses* 8: 183:189 (1992), Goodchild, „Enhancement of ribozyme catalytic activity by a contiguous oligodeoxynucleotide (facilitator) and by 2'-O-methylation“, *Nucleic Acids Research* 20: 4607–4612 (1992) und Kinchington et al., „A comparison of gag, pol and rev antisense oligodeoxynucleotides as inhibitors of HIV-1“, *Antiviral Research* 17: 53–62 (1992), welche hier ausdrücklich durch Bezugnahme aufgenommen werden. Oligonukleotide, die am 3'-Ende blockiert wurden, um deren Verlängerung durch die reverse Transkriptase zu verhindern, wurden ebenfalls als Inhibitoren in Betracht gezogen (siehe zum Beispiel Austermann et al., „Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by 3'-blocked oligonucleotides“, *Biochemical Pharmacology* 43(12): 2581–2589 (1992). Jede der oben zitierten Referenzen wird hier in seiner Gesamtheit ausdrücklich aufgenommen.

[0011] Oligonukleotide wurden auf ihre Anti-HIV-Aktivität erforscht. Zum Beispiel offenbaren Idriss et al.,

(1994), Journal of Enzyme Inhibition 8(2) 97–112, DNA-Oligonukleotide in einer Haarnadelschleifen („hairpin“-Struktur als Inhibitoren der HIV RT-Aktivität, während Kuwasaki et al., (1996), Biochemical and Biophysical Research Communications 228: 623–631, „Anti-Sense“-Haarnadelschleifen-Oligonukleotide offenbaren, die eine Mischung aus Desoxy- und 2'-Methoxynukleotiden mit Anti-HIV-Aktivität enthalten.

[0012] Ungeachtet dieser und anderer Anstrengungen, die Aktivität der Polymerasen zu modulieren, verbleibt ein Bedarf im Stand der Technik nach Materialien und Verfahren, die unerwünschte Aktivität der Polymerasen zu verhindern, während die Synthese der Nukleinsäuren durch die Polymerase gestattet wird, sobald solche Synthese erwünscht ist. Diese und andere Bedürfnisse werden durch die folgende Erfindung erfüllt.

Zusammenfassung der Erfindung

[0013] Die vorliegende Erfindung stellt Materialien und Verfahren zum Inhibieren, Reduzieren, wesentlichen Reduzieren oder Eliminieren der Nukleinsäure-Synthese unter bestimmten Bedingungen (vorzugsweise bei Umgebungstemperaturen und/oder innerhalb einer Zelle) bereit, während die Synthese gestattet wird, sobald solche Synthese erwünscht ist.

[0014] In einem bevorzugten Aspekt betrifft die Erfindung Verfahren zur Prävention oder Inhibition der Nukleinsäure-Synthese während des Reaktionsaufbaus (z.B. in vitro) und vorzugsweise bevor optimale Reaktionsbedingungen für die Nukleinsäure-Synthese erreicht werden. Solche Synthese-Inhibition bei sub-optimalen Bedingungen oder während des Reaktionsaufbaus verhindert oder reduziert die nicht-spezifische Nukleinsäure-Synthese. Wenn der Reaktionsaufbau vollständig ist und die optimalen Bedingungen erreicht werden, kann die Nukleinsäure-Synthese initiiert werden.

[0015] In einem anderen Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein In-Vitro-Verfahren zum Inhibieren eines Polymerase-Enzyms innerhalb einer Zelle durch Einbringen eines Oligonukleotids in die Zelle, wobei das Oligonukleotid ein 5'-Ende und 3'-Ende aufweist, wobei das 3'-Ende eine Folge von aufeinanderfolgenden Desoxyribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst und das 5'-Ende eine Folge von aufeinanderfolgenden Ribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst und wobei das gesamte oder ein Teil des 3'-Endes in der Lage ist, mit dem gesamten oder einem Teil des 5'-Endes Basenpaarung/en einzugehen, wodurch die Inhibition der Polymerase mit diesem Oligonukleotid bewirkt wird. In einigen Ausführungsformen bildet das 5'-Ende des Oligonukleotids, welches Ribonukleotide umfasst, einen 5'-Überhang. In einem anderen Aspekt besteht das Oligonukleotid in der Form einer Haarnadelschleife („hairpin“) und der Stamm der Haarnadelschleife umfasst vorzugsweise eine Folge von aufeinanderfolgenden Ribonukleotiden, die mit einer Folge von aufeinanderfolgenden Desoxyribonukleotiden Basen-gepaart oder hybridisiert sind. In einigen Ausführungsformen ist die Polymerase eine reverse Transkriptase und kann vorzugsweise eine HIV-reverse Transkriptase sein.

[0016] In einem anderen Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein In-Vitro-Verfahren zum Inhibieren einer oder mehr reversen/r Transkriptase/n, welches das In-Kontakt-Bringen einer Probe oder einer Zelle mit einem oder mehr Oligonukleotid/en umfasst, wobei diese/s eine oder mehr Oligonukleotid/e ein 5'-Ende umfassen, das eine Folge von aufeinanderfolgenden Ribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst, und ein 3'-Ende umfasst/en, das eine Folge von aufeinanderfolgenden Desoxyribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst, und wobei das gesamte oder ein Teil des 3'-Endes mit dem gesamten oder einem Teil des 5'-Endes Basenpaarung/en eingeht, um ein Haarnadelschleifen-förmiges oder ein doppel-strängiges Nukleinsäure-Molekül zu bilden, und wobei diese/s eine oder mehr Oligonukleotid/e an eine oder mehr reverse Transkriptase/n bindet/n oder Affinität zu dieser/n aufweist/en, was bewirkt, dass das/die Oligonukleotid/e die Polymerase-Aktivität der reversen Transkriptasen inhibieren.

[0017] In einem anderen Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein In-Vitro-Verfahren zum Inhibieren der Replikation eines Virus durch Bereitstellen eines Virus bereit, wobei das Virus eine reverse Transkriptase umfasst und die Aktivität der reversen Transkriptase zur Replikation erfordert, und In-Kontakt-Bringen der reversen Transkriptase mit einem Oligonukleotid der Erfindung, das die Aktivität der reversen Transkriptasen inhibiert, wobei die Replikation des Virus inhibiert wird. Das Oligonukleotid umfasst ein 5'-Ende und ein 3'-Ende, wobei das 3'-Ende eine Folge von aufeinanderfolgenden Desoxyribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst und wobei der 5'-Teil eine Folge von aufeinanderfolgenden Ribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst und wobei das gesamte oder ein Teil des 3'-Endes mit dem gesamten oder einem Teil des 5'-Endes Basenpaarung/en eingeht, um ein Haarnadelschleifen-förmiges oder ein doppel-strängiges Nukleinsäure-Molekül zu bilden. In einigen Ausführungsformen bildet das 5'-Ende des Oligonukleotids, welches Ribonukleotide umfasst, einen 5'-Überhang. In einem anderen Aspekt besteht das Oligonukleotid in der Form einer Haarnadelschleife und der Stamm der Haarnadelschleife umfasst eine Folge von aufeinanderfolgenden Ribonukleo-

tiden, die mit einer Folge von aufeinanderfolgenden Desoxyribonukleotiden Basenpaarung/en eingehen oder hybridisiert sind. In einigen Ausführungsformen ist das Virus ein HIV. In einigen Ausführungsformen umfasst das In-Kontakt-Bringen das Einführen des Oligonukleotids in eine Zelle.

[0018] Spezifischer betrifft die Erfindung das Kontrollieren der Nukleinsäure-Synthese durch Einführen einer inhibitorischen Nukleinsäure oder eines Oligonukleotids, welche/s an das Polypeptid mit Polymerase-Aktivität bindet oder damit interagiert (z.B. DNA-Polymerasen, reverse Transkriptasen, etc.). Dementsprechend können solche inhibitorischen Nukleinsäuren oder Oligonukleotide die Polymerase binden und mit der Nukleinsäure-Synthese durch Verhindern der Bindung oder Interaktion der Polymerase oder der reversen Transkriptase mit dem/der Primer/Matrize interferieren. Vorzugsweise sind solche inhibitorischen Nukleinsäure-Moleküle doppel-strängige Moleküle, obwohl jede Form des Nukleinsäure-Moleküls verwendet werden kann, so lange das Molekül an das interessierende Polymerisations-Enzym binden oder damit interagieren kann. Solche Moleküle können DNA/RNA-Hybride und doppel-strängige DNA/RNA-Moleküle sein. Derivatisierte Nukleinsäure-Moleküle können ebenfalls verwendet werden, wie zum Beispiel Protein-Nukleinsäuren (PNAs), verknüpfte Nukleinsäuren („linked nucleic acids“, LNA, erhältlich von Prologo, Boulder Co.) und modifizierte Nukleotide-umfassende Nukleinsäure-Moleküle. Darüber hinaus können die Nukleinsäure-Moleküle in jeder Form oder Topologie vorkommen, wie zum Beispiel linear, zirkulär, „supercoiled“, doppel-strängig mit einem oder mehr einzel-strängigen Teil/en, Haarnadelschleifen-Struktur oder mit anderen Molekülen, wie zum Beispiel Peptiden oder Proteinen und Ähnlichem, komplexiert sein. Solche inhibitorischen Nukleinsäuren beinhalten vorzugsweise doppel-strängige Nukleinsäure-Moleküle (welche einen oder mehr interne/n, 5'- und/oder 3'-einzel-strängige/n Teil/e umfassen können), oder einzel-strängige Nukleinsäure-Moleküle, die in der Lage sind, sich in eine doppel-strängige Form zu falten, d.h., einen oder mehr Haarnadelschleifen-Loop/s zu bilden, so dass mindestens ein doppel-strängiger Teil des Nukleinsäure-Moleküls in der Lage ist, an ein Polypeptid mit Polymerase-Aktivität zu binden. In einem Aspekt binden die in der Erfindung verwendeten Nukleinsäure-Moleküle das Polypeptid mit Polymerase-Aktivität (z.B. DNA-Polymerase, reverse Transkriptase, etc.) mit hoher Aktivität. Nachdem die Polymerase oder reverse Transkriptase mit der inhibitorischen Nukleinsäure komplexiert ist, ist sie für das Annealing an das Primer/Matrize-Substrat nicht verfügbar, was zu reduzierter, wesentlich reduzierter oder zu keiner Polymerase- oder reverse Transkriptase-Aktivität führt. Die Oligonukleotide der vorliegenden Erfindung umfassen ein 5'-Ende und ein 3'-Ende, wobei das 3'-Ende eine Folge von aufeinanderfolgenden Desoxyribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst und wobei das 5'-Ende eine Folge von aufeinanderfolgenden Ribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst und wobei das gesamte oder ein Teil des 3'-Endes in der Lage ist, mit dem gesamten oder mit einem Teil des 5'-Endes Basenpaarung/en einzugehen. In einigen Ausführungsformen können die Oligonukleotide der Erfindung ein 5'-Ende umfassen, wobei das 5'-Ende, das Ribonukleotide umfasst, einen 5'-Überhang bildet. In einigen Ausführungsformen kann ein Oligonukleotid der Erfindung eine oder mehr Modifikation/en umfassen, so dass es nicht-verlängerbar ist. In einigen Ausführungsformen kann diese Modifikation am äußersten 3'-Nukleotid sein. In einigen Ausführungsformen ist die Modifikation Phosphorylierung des äußersten 3'-Nukleotids am 3'-Hydroxyl. Ein Oligonukleotid der vorliegenden Erfindung kann eine oder mehr Modifikation/en umfassen, so dass es gegenüber dem Verdau oder dem Abbau durch, zum Beispiel, eine oder mehr Nuklease/n resistent ist. In einigen Ausführungsformen kann diese Modifikation der Einbau eines oder mehr Phosphorthioat-Reste/s sein. In einigen Ausführungsformen kann die Modifikation Alkylierung einer oder mehr Hydroxyl-Gruppe/n umfassen.

[0019] Somit wird die inhibitorische Nukleinsäure vorzugsweise in die Reaktionsmischung eingeführt, wo sie kompetitiv an die Polymerase bindet oder mit dieser interagiert, wobei sie die Synthese durch die Polymerase unter bestimmten Reaktionsbedingungen inhibiert. Somit führt die Interaktion oder Bindung des Inhibitors und der Polymerase vorzugsweise zur Bildung eines Inhibitor/Polymerase-Komplexes.

[0020] Die Inhibition der Polymerase-Aktivität oder der Nukleinsäure-Synthese durch die Nukleinsäuren der Erfindung wird vorzugsweise reduziert, wesentlich reduziert, inhibiert oder eliminiert, so dass die Nukleinsäure-Synthese prozessieren kann, wenn die Reaktionsbedingungen geändert werden, zum Beispiel, wenn die Temperatur erhöht wird. In einem bevorzugten Aspekt beeinflussen die geänderten Bedingungen die Fähigkeit der inhibitorischen Nukleinsäuren, mit der Polymerase zu interagieren, was die Freisetzung der Polymerase und/oder Denaturierung oder Inaktivierung der inhibitorischen Nukleinsäuren bewirkt, was die Polymerase verfügbar macht und somit der Nukleinsäure-Synthese ermöglicht zu prozessieren. In einem Aspekt interagieren die inhibitorischen Nukleinsäuren und das Primer/Matrize-Substrat kompetitiv mit der Polymerase, um die Synthese zu verhindern. Unter den geänderten Bedingungen wird die kompetitive Interaktion so reduziert, dass Nukleinsäure-Synthese auftritt. In einem anderen Aspekt bewirken die geänderten Bedingungen, dass das/die doppel-strängige/n inhibitorische/n Nukleinsäure-Molekül/e (einschließlich Haarnadelschleifen) denaturiert oder schmilzt, so dass einzel-strängige Moleküle gebildet werden, welche nicht wesentlich an die Polymerase binden oder mit dieser interagieren. In einem anderen Aspekt ermöglicht eine zweite Änderung der Bedingun-

gen (d.h., Absenkung der Temperatur auf, zum Beispiel, die Umgebungstemperatur), dass die inhibitorischen Nukleinsäure-Moleküle der Erfindung die Nukleinsäure-Synthese reaktivieren oder erneut inhibieren. Das heißt, dass die Inhibitoren erneut mit der Polymerase oder reversen Transkriptase unter den geänderten Bedingungen interagieren oder an diese binden können. Zum Beispiel können die geänderten Bedingungen dem Inhibitor das Bilden doppel-strängiger Moleküle ermöglichen, was dessen Binde- oder Interaktions-Fähigkeit mit der Polymerase oder reversen Transkriptasen wirksam verstärkt. Somit können gemäß der Erfindung die Inhibitoren wiederverwendet werden oder während der (einfachen oder mehrfachen) Synthese-Reaktionen recyclebar sein, was mehrere Anpassungen oder Änderungen in den Reaktionsbedingungen (d.h., Temperaturänderungen) erfordern kann, ohne die Notwendigkeit, einen zusätzlichen Inhibitor hinzuzugeben.

[0021] Die Erfindung betrifft deshalb ein Verfahren zum Synthetisieren eines oder mehr Nukleinsäure-Moleküls/e, umfassend (a) Mischen einer oder mehr Nukleinsäure-Matrize/n (welche ein DNA-Molekül, wie zum Beispiel ein cDNA-Molekül, oder ein RNA-Molekül, wie zum Beispiel ein mRNA-Molekül, sein kann/können) mit einem oder mehr Primer/n und einer oder mehr inhibitorischen Nukleinsäure/n oder -Zusammensetzung/en der vorliegenden Erfindung, die in der Lage ist/sind, ein Enzym mit Polymerase-Aktivität zu binden oder damit zu interagieren, und (b) Inkubieren der Mischung in Gegenwart eines oder mehr Enzyms/e mit Nukleinsäure-Polymerase-Aktivität (z.B. DNA-Polymerasen oder reverse Transkriptasen) unter Bedingungen, die ausreichend sind, um ein oder mehr erste Nukleinsäure-Molekül/e zu synthetisieren, das/die komplementär zu den gesamten oder einem Teil der Matrizen ist/sind.

[0022] Alternativ kann das Verfahren Mischen einer oder mehr Inhibitor-Nukleinsäure/n mit mindestens einem Enzym mit Polymerase-Aktivität und einer oder mehr Matrize/n und Inkubieren solcher Mischungen unter Bedingungen, die ausreichend sind, um ein oder mehr erste Nukleinsäure-Molekül/e zu synthetisieren, das/die zu den gesamten oder einem Teil der Matrizen komplementär ist/sind, umfassen. Solche Bedingungen können die Verwendung eines oder mehr Nukleotids/e und eines oder mehr Nukleinsäure-Synthese-Puffer/s einbeziehen. Solche Verfahren der Erfindung können optional eine oder mehr zusätzliche Stufe/n umfassen, wie zum Beispiel das Inkubieren des synthetisierten ersten Nukleinsäure-Moleküls unter Bedingungen, die ausreichend sind, um ein zweites Nukleinsäure-Molekül zu dem gesamten oder einem Teil des ersten Nukleinsäure-Moleküls komplementär zu machen. Die zusätzliche/n Stufe/n kann/können ebenfalls die Verwendung der inhibitorischen Nukleinsäure-Moleküle der Erfindung umfassen. Die Erfindung betrifft ebenfalls Nukleinsäure-Moleküle, die durch diese Verfahren synthetisiert werden.

[0023] In einem verwandten Aspekt kann das Nukleinsäure-Synthese-Verfahren (a) Mischen einer oder mehr Polymerase/n mit einem oder mehr der inhibitorischen Nukleinsäure-Molekül/e der Erfindung und (b) Inkubieren solcher Mischung unter Bedingungen, die ausreichend sind, um die Polymerase-Aktivität solcher Polymerasen zu inaktivieren oder wesentlich zu inhibieren oder zu reduzieren, umfassen. In einem anderen Aspekt findet solche Inkubation unter Bedingungen statt, die ausreichend sind, um solche Nukleinsäure-Synthese zu inhibieren oder zu verhindern.

[0024] Die Erfindung betrifft ebenfalls ein Verfahren zum Amplifizieren eines oder mehr Nukleinsäure-Moleküls/e, umfassend (a) Mischen einer oder mehr Nukleinsäure-Matrize/n mit einem oder mehr Primer/n und einem/einer oder mehr inhibitorischen Nukleinsäure-Molekül/en oder -Zusammensetzung/en der vorliegenden Erfindung, das/die in der Lage ist/sind, an ein Enzym mit Polymerase-Aktivität zu binden oder damit zu interagieren, und (b) Inkubieren der Mischung in Gegenwart eines oder mehr Enzyms/e mit Nukleinsäure-Polymerase-Aktivität (z.B. DNA-Polymerasen) unter Bedingungen, die ausreichend sind, um ein oder mehr Nukleinsäure-Molekül/e zu amplifizieren, das/die zu den gesamten oder einem Teil der Matrizen komplementär ist/sind. Spezifischer betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Amplifizieren eines doppel-strängigen DNA-Moleküls, umfassend: (a) Bereitstellen eines ersten und zweiten Primers, wobei der erste Primer komplementär zu einer Sequenz innerhalb oder bei oder nahe den 3'-Termini des ersten Stranges des DNA-Moleküls ist und der zweite Primer zu einer Sequenz innerhalb oder bei oder nahe den 3'-Termini des zweiten Stranges des DNA-Moleküls komplementär ist, und eines oder mehr Nukleinsäure-Inhibitors/en der Erfindung (z.B. einer Nukleinsäure, die Affinität zu einem Enzym mit Polymerase-Aktivität aufweist); (b) Hybridisieren des ersten Primers an den ersten Strang und des zweiten Primers an den zweiten Strang, um hybridisierte Moleküle zu bilden; (c) Inkubieren der hybridisierten Moleküle unter Bedingungen, die ausreichend sind, um die Synthese eines dritten DNA-Moleküls zu ermöglichen, das zu dem gesamten oder einem Teil des ersten Stranges komplementär ist, und eines vierten DNA-Moleküls, das komplementär zu dem gesamten oder einem Teil des zweiten Stranges ist; (d) Denaturieren des ersten und dritten Stranges und der zweiten und vierten Stränge und (e) Wiederholen der Stufen (a) bis (c) oder (d) einmal oder mehrmals. Solche Bedingungen können Inkubation in Gegenwart einer oder mehr Polymerase/n, eines oder mehr Nukleotids/e und/oder eines oder mehr puffernden/r Salze beinhalten. Die Erfindung betrifft ebenfalls Nukleinsäure-Moleküle, die durch diese Verfahren am-

plifiziert werden.

[0025] In einem verwandten Aspekt kann das Nukleinsäure-Amplifikations-Verfahren (a) Mischen einer oder mehr Polymerase/n mit einem oder mehr der inhibitorischen Nukleinsäure-Moleküle der Erfindung und (b) Inkubieren solcher Mischungen unter Bedingungen, die ausreichend sind, um die Polymerase-Aktivität solcher Polymerasen zu inaktivieren oder wesentlich zu inhibieren oder zu reduzieren, umfassen. In einem anderen Aspekt findet die Inkubation unter Bedingungen statt, die ausreichend sind, um solche Nukleinsäure-Amplifikation zu inhibieren oder zu verhindern.

[0026] Die Erfindung betrifft ebenfalls Verfahren zum Sequenzieren eines Nukleinsäure-Moleküls, umfassend (a) Mischen eines zu sequenzierenden Nukleinsäure-Moleküls mit einem oder mehr Primer/n, einer oder mehr der inhibitorischen Nukleinsäure/n oder -Zusammensetzungen der Erfindung, einem oder mehr Nukleotid/en und einem oder mehr Terminations-Mittel/n, um eine Mischung zu bilden; (b) Inkubieren der Mischung unter Bedingungen, die ausreichend sind, um eine Population an Molekülen zu synthetisieren, die zu dem gesamten oder einem Teil des zu sequenzierenden Moleküls komplementär sind, und (c) Separieren der Population, um die Nukleotid-Sequenzen des gesamten oder eines Teil des zu sequenzierenden Moleküls zu bestimmen. Die Erfindung betrifft spezifischer ein Verfahren zum Sequenzieren eines Nukleinsäure-Moleküls, umfassend: (a) Bereitstellen einer inhibitorischen Nukleinsäure oder -Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung (zu welcher ein Enzym mit Polymerase-Aktivität Affinität aufweist), eines oder mehr Nukleotids/e und eines oder mehr Terminations-Mittel/s; (b) Hybridisieren eines Primers an ein erstes Nukleinsäure-Molekül; (c) Inkubieren der Mischung von Stufe (b) unter Bedingungen, die ausreichend sind, um eine zufällige Population an Nukleinsäure-Molekülen, die zum ersten Nukleinsäure-Molekül komplementär sind, zu synthetisieren, wobei die synthetisierten Moleküle in der Länge kürzer sind als das erste Molekül und wobei die synthetisierten Moleküle ein Terminator-Nukleotid an deren 3'-Termini umfassen, und (d) Separieren der synthetisierten Moleküle nach der Größe, so dass mindestens ein Teil der Nukleotid-Sequenzen des ersten Nukleinsäure-Moleküls bestimmt werden kann. Solche Terminator-Nukleotide beinhalten Didesoxyribonukleosidtriphosphate, wie zum Beispiel ddNTP, ddATP, ddGTP, ddITP oder ddCTP. Solche Bedingungen können die Inkubation in Gegenwart einer oder mehr Polymerase/n und/oder eines oder mehr puffernden/r Salze/s beinhalten.

[0027] In einem verwandten Aspekt kann das Nukleinsäuren-Sequenzierungs-Verfahren (a) Mischen einer oder mehr Polymerase/n mit einem oder mehr inhibitorischen Nukleinsäure-Molekül/en der Erfindung und (b) Inkubieren solcher Mischungen unter Bedingungen, die ausreichend sind, um die Polymerase-Aktivität solcher Polymerasen zu inaktivieren oder wesentlich zu inhibieren, umfassen. In einem anderen Aspekt findet solche Inkubation unter Bedingungen statt, die ausreichend sind, um solche Nukleinsäure-Sequenzierung zu inhibieren oder zu verhindern.

[0028] In einem verwandten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Amplifizieren eines Nukleinsäure-Moleküls, umfassend Mischen mindestens eines Nukleinsäure-Inhibitors der Erfindung mit einem oder mehr Enzym/en mit Polymerase-Aktivität und einer oder mehr Matrize/n und Inkubieren der Mischung unter Bedingungen, die ausreichend sind, um ein oder mehr Nukleinsäure-Molekül/e zu amplifizieren, das/die zu den gesamten oder einem Teil der Matrizen komplementär ist/sind.

[0029] Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls ein Verfahren zur Sequenzierung eines Nukleinsäure-Moleküls, umfassend Mischen mindestens eines zu sequenzierenden Nukleinsäure-Moleküls mit einem oder mehr Nukleinsäure-Inhibitor/en der Erfindung, einem oder mehr Enzym/en mit Polymerase-Aktivität und einem oder mehr Terminations-Mittel/n; Inkubieren der Mischung unter Bedingungen, die ausreichend sind, um eine Population an Molekülen zu synthetisieren, die zu den gesamten oder einem Teil der zu sequenzierenden Moleküle komplementär sind; und Separieren der Population, um die Nukleotid-Sequenz des gesamten oder eines Teils des zu sequenzierenden Moleküls zu bestimmen.

[0030] Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zum Präparieren von cDNA aus mRNA, umfassend Mischen einer oder mehr mRNA-Matrize/n, einer oder mehr reversen/r Transkriptase/n mit einem oder mehr Nukleinsäure-Inhibitor/en der Erfindung und Inkubieren der Mischung unter Bedingungen, die ausreichend sind, um ein oder mehr cDNA-Molekül/e zu synthetisieren, das/die zu den gesamten oder einem Teil der Matrizen komplementär ist/sind.

[0031] Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zum Inhibieren oder Verhindern der Nukleinsäure-Synthese, -Amplifikation oder -Sequenzierung, umfassend Mischen eines oder mehr Nukleinsäure-Inhibitors/en der Erfindung mit einem oder mehr Enzym/en mit Polymerase-Aktivität und Inkubieren der Mischung unter Bedingungen, die ausreichend sind, um die Nukleinsäure-Synthese, -Amplifikation

und/oder -Sequenzierung zu inhibieren oder zu verhindern.

[0032] Die Erfindung betrifft ebenfalls inhibitorische Nukleinsäuren der Erfindung und Zusammensetzungen, die die inhibitorischen Nukleinsäuren der Erfindung umfassen, Vektoren (welche Expressions-Vektoren sein können), die diese Nukleinsäure-Moleküle umfassen, und Wirtszellen, die diese Nukleinsäure-Moleküle oder Vektoren umfassen. Zusammensetzungen der Erfindung können ebenfalls solche Zusammensetzungen beinhalten, welche zum Durchführen der Verfahren der Erfindung hergestellt werden oder welche während des Durchführens solcher Verfahren hergestellt werden. Die Erfindung betrifft ebenfalls pharmazeutische Zusammensetzungen. Solche Zusammensetzungen können ein oder mehr inhibitorische Nukleinsäure-Molekül/e oder Oligonukleotid/e der Erfindung und mindestens eine andere Komponente, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem oder mehr Nukleotid/en, einer oder mehr Polymerase/n (z.B. thermophiler oder mesophiler DNA-Polymerasen und/oder reverser Transkriptasen), einem oder mehr geeigneten Puffer/n oder Puffersalz/en, einem oder mehr Primer/n, einem oder mehr Terminations-Mittel/n, einem oder mehr Virus/Viren, einer oder mehr Zelle/n und einem oder mehr amplifizierten oder synthetisierten Nukleinsäure-Molekül/en, das/die durch das Verfahren der Erfindung hergestellt wird/werden, umfassen. Die Erfindung betrifft ebenfalls Verfahren zum Herstellen einer inhibitorischen Nukleinsäure, umfassend Kultivieren der oben beschriebenen Wirtszellen unter Bedingungen, die die Herstellung der Nukleinsäure durch die Wirtszellen begünstigen, und Isolieren der Nukleinsäure. Die Erfindung betrifft ebenfalls durch die synthetischen Verfahren hergestellte Nukleinsäure. Solche inhibitorischen Nukleinsäure-Moleküle der Erfindung können ebenfalls durch chemische Standard-Synthese-Techniken hergestellt werden.

[0033] Die Erfindung betrifft somit eine Zusammensetzung zum Inhibieren der Nukleinsäure-Synthese, umfassend einen Nukleinsäure-Inhibitor, der in der Lage ist, ein Enzym mit Polymerase-Aktivität zu binden, oder er weist Affinität zu einem solchen Enzym auf, wobei der Nukleinsäure-Inhibitor ein 5'-Ende und ein 3'-Ende umfasst, wobei das 3'-Ende eine Folge von aufeinanderfolgenden Desoxyribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst und wobei das 5'-Ende eine Folge von aufeinanderfolgenden Ribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst und wobei das gesamte oder ein Teil des 3'-Endes mit dem gesamten oder einem Teil des 5'-Endes Basenpaarung/en eingeht, wobei ein Haarnadelschleifen-förmiges oder ein doppel-strängiges Nukleinsäure-Molekül gebildet wird. In einem verwandten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Oligonukleotid, welches an eine oder mehr reverse Transkriptase/n bindet oder Affinität zu dieser/n aufweist, wobei das Oligonukleotid ein 5'-Ende umfasst, das eine Folge von aufeinanderfolgenden Ribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst, und ein 3'-Ende umfasst, das eine Folge von aufeinanderfolgenden Desoxyribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst, und wobei das gesamte oder ein Teil des 3'-Endes mit dem gesamten oder einem Teil des 5'-Endes Basenpaarung/en eingeht, um ein Haarnadelschleifen-förmiges oder ein doppel-strängiges Nukleinsäure-Molekül zu bilden.

[0034] In einem verwandten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung Materialien und Verfahren zur In-Vivo-Inhibition der Polymerase-Aktivität bereit. In einigen Ausführungsformen sieht die vorliegende Erfindung die Einführung der inhibitorischen Oligonukleotide der vorliegenden Erfindung in einen Organismus vor, wobei eine innerhalb eines Organismus vorkommende Polymerase inhibiert wird. In einigen Ausführungsformen kann die Polymerase eine reverse Transkriptase sein, vorzugsweise eine virale reverse Transkriptase. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Inhibition einer viralen reversen Transkriptase bereit, umfassend In-Kontakt-Bringen einer Zelle oder eines Virus, die/das eine virale reverse Transkriptase exprimiert, mit einem inhibitorischen Oligonukleotid unter Bedingungen, die bewirken, dass das Oligonukleotid die reverse Transkriptase inhibiert. Vorzugsweise wird das Oligonukleotid mit der Zelle unter Bedingungen in Kontakt gebracht, die ausreichend sind, dass das Oligonukleotid von der Zelle durch gut bekannte Techniken aufgenommen wird. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Inhibieren des Wachstums eines Virus bereit, umfassend In-Kontakt-Bringen einer Zelle, die mit einem Virus infiziert wird, das die reverse Transkriptase-Aktivität erfordert, um seinen Lebenszyklus zu vervollständigen, mit einem inhibitorischen Oligonukleotid unter Bedingungen, die bewirken, dass das Oligonukleotid von der Zelle aufgenommen wird, und bewirken, dass die reverse Transkriptase inhibiert wird, wobei das Wachstum des Virus inhibiert wird. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Behandeln eines Organismus oder Lebewesens, der/das mit einem Virus infiziert wurde, das die reverse Transkriptase-Aktivität erfordert, um seinen Lebenszyklus zu vervollständigen, umfassend In-Kontakt-Bringen einer infizierten Zelle des Organismus oder des Lebewesens mit einer Zusammensetzung, die ein inhibitorisches Oligonukleotid umfasst, unter Bedingungen, die bewirken, dass das Oligonukleotid durch die Zelle aufgenommen wird, und bewirken, dass die reverse Transkriptase inhibiert wird, wodurch der Organismus behandelt wird.

[0035] Die Erfindung betrifft ebenfalls Kits zur Verwendung in der Synthese, Sequenzierung und Amplifikation

von Nukleinsäure-Molekülen, umfassend ein oder mehr Behälter, der/die ein oder mehr inhibitorische Nukleinsäuren oder -Zusammensetzungen der Erfindung enthält/enthalten. Diese Kits der Erfindung können optional eine oder mehr zusätzliche Komponente/n, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem oder mehr Nukleotid/en, einer oder mehr Polymerase/n (z.B. thermophilen oder mesophilen DNA-Polymerasen und/oder reversen Transkriptasen), einem oder mehr geeigneten Puffer/n, einem oder mehr Primer/n und einem oder mehr Terminations-Mittel/n (wie zum Beispiel einem oder mehr Didesoxynukleotid/en), umfassen. Die Erfindung betrifft ebenfalls Kits zum Inhibieren viraler Replikation oder Kits zum Behandeln viraler Infektionen, die die inhibitorischen Nukleinsäuren der Erfindung umfassen. Solche Kits können ebenfalls Anleitungen oder Protokolle zum Durchführen der Verfahren der Erfindung umfassen.

[0036] Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls ein Kit zur Verwendung in der Synthese, Amplifikation oder Sequenzierung eines Nukleinsäure-Moleküls, wobei das Kit ein oder mehr der Nukleinsäure-Inhibitor/en der Erfindung umfasst.

[0037] In einem anderen Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung eines Oligonukleotids zur Herstellung eines Medikaments zum Inhibieren eines Polymerase-Enzyms innerhalb einer Zelle, wobei das Oligonukleotid ein 5'-Ende und ein 3'-Ende umfasst, wobei das 3'-Ende eine Folge von aufeinanderfolgenden Desoxyribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst und wobei das 5'-Ende eine Folge von aufeinanderfolgenden Ribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst und wobei das gesamte oder ein Teil des 3'-Endes in der Lage ist, mit dem gesamten oder einem Teil des 5'-Endes Basenpaarung/en einzugehen.

[0038] Die Erfindung betrifft ebenfalls die Verwendung eines Oligonukleotids zum Herstellen eines Medikaments zum Inhibieren der Replikation eines Virus, wobei das Virus eine reverse Transkriptase umfasst und die Aktivität der reversen Transkriptase zur Replikation erfordert, wobei das Oligonukleotid die Aktivität der reversen Transkriptase inhibiert und wobei das Oligonukleotid ein 5'-Ende umfasst, das eine Folge von aufeinanderfolgenden Ribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst, und ein 3'-Ende umfasst, das eine Folge von aufeinanderfolgenden Desoxyribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst, und wobei das gesamte oder ein Teil des 3'-Endes mit dem gesamten oder einem Teil des 5'-Endes Basenpaarung/en eingeht, um ein Haarnadelschleifen-förmiges oder ein doppel-strängiges Nukleinsäure-Molekül zu bilden.

[0039] In einem verwandten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung einer Zusammensetzung, umfassend ein Oligonukleotid zum Herstellen eines Medikaments zum Behandeln einer viralen Infektion in einem Lebewesen, wobei das Oligonukleotid ein 5'-Ende und ein 3'-Ende umfasst, wobei das 3'-Ende eine Folge von aufeinanderfolgenden Desoxyribonukleotiden und Derivaten davon umfasst und wobei das 5'-Ende eine Folge von aufeinanderfolgenden Ribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst und wobei das gesamte oder ein Teil des 3'-Endes in der Lage ist, mit dem gesamten oder einem Teil des 5'-Endes Basenpaarung/en einzugehen.

[0040] In einem anderen Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung eines oder mehr Oligonukleotids/e zum Herstellen eines Medikaments zum Inhibieren einer oder mehr reversen/r Transkriptase/n, wobei ein oder mehr Oligonukleotid/e ein 5'-Ende umfassen, das eine Folge von aufeinanderfolgenden Ribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst, und ein 3'-Ende umfasst, das eine Folge von aufeinanderfolgenden Desoxyribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst, und wobei das gesamte oder ein Teil des 3'-Endes mit dem gesamten oder einem Teil des 5'-Endes Basenpaarung/en eingeht, um ein Haarnadelschleifen-förmiges oder ein doppel-strängiges Nukleinsäure-Molekül zu bilden, und wobei diese/s eine oder mehr Oligonukleotid/e an eine oder mehr reverse Transkriptasen bindet/n oder Affinität zu dieser/n aufweist/en, was bewirkt, dass diese Oligonukleotide die Polymerase-Aktivität der reversen Transkriptasen inhibieren.

[0041] Andere bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden dem Durchschnittsfachmann aus den folgenden Zeichnungen und der Beschreibung der Erfindung und aus den Ansprüchen offensichtlich.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0042] **Fig. 1.** Die Aktivität der Tne-DNA-Polymerase wurde qualitativ bestimmt. Feld A: Bestimmung in Abwesenheit des Inhibitors A, Feld B: Bestimmung in Gegenwart des Inhibitors. Die fünf Spuren jedes Feldes sind, von links nach rechts, Zeitpunkte von 15 s, 30 s, 1 min, 2 min und 5 min, die verstrichen sind, bevor die Reaktion gestoppt wurde. P und C zeigen die Primer-Position bzw. die Kontrollspur. Inhibitor A enthielt kein Didesoxynukleotid an seinen Enden.

[0043] Fig. 2. Amplifikation einer Target-DNA-Sequenz (pUC19) von 2,7 kb wurde bei 5 unterschiedlichen Verdünnungen der Matrize („template“) durchgeführt. Das Target wurde durch die Tne-DNA-Polymerase amplifiziert. Zwei unterschiedliche Konzentrationen der Tne-Polymerase (85 nM (z.B. 1 Einheit) und 42,5 nM (z.B. 0,5 Einheiten)) und die jeweiligen Inhibitor-B-Komplexe (unter Verwendung eines 150-fachen Überschusses an Haarnadelschleife („hairpin“) B gegenüber die Polymerase-Konzentration) wurden für jede einzelne Amplifizierungs-Bedingung verwendet. Die Konzentration der Target-DNA in Spuren 1, 2, 3, 4 & 5 beträgt 100 pg, 20 pg, 2 pg, 0,2 pg bzw. 0,02 pg. Inhibitor B enthielt kein Didesoxynukleotid an seinen Termini.

[0044] Fig. 3. Eine Target-DNA-Sequenz (humane genomische Quelle) von 1 kb, 3 kb und 5 kb wurde durch die Tne(85 nM (z.B. 1 Einheit)- und Taq(z.B. 1 Einheit)-DNA-Polymerasen, wie in den Feldern A, B bzw. C dargestellt, amplifiziert. Die vier Spuren jedes einzelnen Feldes, die durch a, b, c und d dargestellt werden, sind Tne (+ 125-facher Überschuss an Inhibitor A), Tne (+ 50-facher Überschuss an Inhibitor A), Tne (kein Inhibitor) bzw. Taq (kein Inhibitor). Inhibitor A enthielt ein 3'-terminales Didesoxynukleotid (d.h., ddT).

[0045] Fig. 4. Die Amplifikation einer Target-DNA-Sequenz (humane genomische Quelle) von 5 und 15 kb wurde mit der Tne-DNA-Polymerase (8,5 nM (z.B. 0,1 Einheiten)) durchgeführt. Die fünf Felder A, B, C, D und E stellen die Reaktionsbedingung dar: Tne (kein Inhibitor), Tne (+ 50-facher Überschuss des Inhibitors), Tne (+ 150-facher Überschuss des Inhibitors), Tne (+ 300-facher Überschuss des Inhibitors) bzw. Tne (+ 750-facher Überschuss des Inhibitors). Die zwei Spuren (a und b) stellen für jedes einzelne Feld die Amplifikation einer Target-Größe von 5 und 15 kb dar. Für diesen Assay wurde der Inhibitor B verwendet, welcher kein terminales Didesoxynukleotid enthielt.

[0046] Fig. 5. Die Amplifikation einer Target-DNA-Sequenz (humane genomische Quelle) von 3 kb wurde mit 1 Einheit Taq-DNA-Polymerase durchgeführt. Die drei Spuren A, B und C stellen die Reaktionsbedingungen dar: für A und B wurden die gleichen Primer-Sequenzen verwendet – I), die PCR-Mischung wurde für 1 min bei 94°C inkubiert und wurde auf Eis gestellt, um Fehl-Primen zu erzwingen. Alle PCR-Reaktionen wurden für 30 min auf 25°C gestellt, um nicht-spezifische DNA-Synthese zu erhöhen. Jede einzelne Bedingung weist vier Spuren auf – Spur a (Taq-Kontrolle), b (Taq + 16 nM Inhibitor), c (Taq + 32 nM Inhibitor) und c (Taq + 64 nM Inhibitor). Inhibitor B wurde verwendet, welcher kein terminales Didesoxynukleotid enthielt.

[0047] Fig. 6A ist ein Diagramm, das die Ergebnisse der Polymerase-Aktivitäts-Assays von ThermoScript™ I in Abwesenheit oder Gegenwart der Nukleinsäure-Inhibitoren bei der Umgebungstemperatur (linker Balken), 37°C (mittlerer Balken) und 55°C (rechter Balken) zeigt. TS zeigt die Polymerase-Reaktion, die durch ThermoScript™ I initiiert wurde, TS-D zeigt die Polymerase-Reaktion, die durch ThermoScript™ I in Gegenwart des Nukleinsäure-Inhibitors D initiiert wurde, TS-E zeigt die Polymerase-Reaktion, die durch ThermoScript™ I in Gegenwart des Nukleinsäure-Inhibitors E initiiert wurde, und TS-H zeigt die Polymerase-Reaktion, die durch ThermoScript™ I in Gegenwart des Nukleinsäure-Inhibitors H initiiert wurde.

[0048] Fig. 6B ist ein Diagramm, das die Ergebnisse der Polymerase-Aktivitäts-Assays von ThermoScript™ I in Abwesenheit oder Gegenwart der Nukleinsäure-Inhibitoren bei der Umgebungstemperatur (linker Balken), 37°C (mittlerer Balken) und 55°C (rechter Balken) zeigt. TS zeigt die Polymerase-Reaktion, die durch ThermoScript™ I initiiert wurde, TS-C zeigt die Polymerase-Reaktion, die durch ThermoScript™ I in Gegenwart des Nukleinsäure-Inhibitors C initiiert wurde, TS-H zeigt die Polymerase-Reaktion, die durch ThermoScript™ I in Gegenwart des Nukleinsäure-Inhibitors H initiiert wurde, TS-E zeigt die Polymerase-Reaktion, die durch ThermoScript™ I in Gegenwart des Nukleinsäure-Inhibitors E initiiert wurde, TS-F zeigt die Polymerase-Reaktion, die durch ThermoScript™ I in Gegenwart des Nukleinsäure-Inhibitors F initiiert wurde, und TS-G zeigt die Polymerase-Reaktion, die durch ThermoScript™ I in Gegenwart des Nukleinsäure-Inhibitors G initiiert wurde.

[0049] Fig. 7 ist eine Ablichtung eines Agarose-Gels, die die Ergebnisse der Amplifikations-Reaktion unter Verwendung eines Fragments des NF2-Gens von 1,6 kb (A), 2 kb (B) und 2,6 kb (C) zeigt. In jedem einzelnen Feld ist Spur a die Amplifikation unter Verwendung der Taq-Polymerase allein, Spur b die Amplifikations-Reaktion in Gegenwart des Inhibitors HPHH4Sspa3 bei einem molaren Verhältnis von 1,2:1 Inhibitor:Polymerase und Spur c die Amplifikation unter Verwendung von Platinum-Taq.

[0050] Fig. 8 ist ein Balkendiagramm, das die Ergebnisse eines dNTP-Einbau-Assays bei den gezeigten Temperaturen zeigt. Bei jeder einzelnen Temperatur zeigt das geschlossene schwarze Rechteck die Ergebnisse an, die mit der Taq-Polymerase allein erhalten wurden, das gestreifte Rechteck zeigt die Ergebnisse an, die mit dem Inhibitor HPHH4Sspa3 bei einem molaren Verhältnis von 2:1 Inhibitor:Polymerase erhalten wurden, das weiße Rechteck zeigt die Ergebnisse an, die mit dem gleichen Inhibitor bei einem molaren Verhältnis von 7,5:1 Inhibitor:Polymerase erhalten wurden.

[0051] [Fig. 9](#) ist ein Diagramm, das die dosisabhängige Inhibition der Taq-Polymerase durch den bei den angegebenen molaren Verhältnissen vorliegenden Inhibitor HPHH4Sspa3 zeigt.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Definitionen

[0052] In der Beschreibung, die folgt, wird eine Anzahl an Termen, die in der rekombinanten DNA-Technologie verwendet werden, weitreichend verwendet. Um ein klareres und konsistentes Verständnis der Spezifikation und der Ansprüche bereitzustellen, einschließlich des Umfangs, der solchen Termen gegeben wird, werden die folgenden Definitionen bereitgestellt.

[0053] Primer. Wie hier verwendet, verweist „Primer“ auf ein einzel-strängiges Oligonukleotid, das durch kovalente Bindung von Nukleotid-Monomeren während der Amplifikation oder Polymerisation eines DNA-Moleküls verlängert wird.

[0054] Matrize. Der Term „Matrize“ („template“), wie hier verwendet, verweist auf doppel-strängige oder einzel-strängige Nukleinsäure-Moleküle, welche amplifiziert, synthetisiert oder sequenziert werden sollen. Im Fall eines doppel-strängigen Moleküls wird die Denaturierung dessen Stranges zum Bilden eines ersten und eines zweiten Stranges vorzugsweise durchgeführt, bevor diese Moleküle amplifiziert, synthetisiert oder sequenziert werden können, oder das doppel-strängige Molekül kann direkt als eine Matrize verwendet werden. Für einzel-strängige Matrizen wird ein Primer, der zu einem Teil der Matrize komplementär ist, unter geeigneten Bedingungen hybridisiert und eine oder mehr Polymerase/n kann/können danach ein Nukleinsäure-Molekül, das zu der gesamten oder einem Teil der Matrize komplementär ist, synthetisieren. Alternativ können für doppel-strängige Matrizen ein oder mehr Promotor/en (z.B. SP6-, T7- oder T3-Promotoren) in Kombination mit einer oder mehr Polymerase/n verwendet werden, um Nukleinsäure-Moleküle zu der gesamten oder einem Teil der Matrize komplementär zu machen. Die neu synthetisierten Moleküle können, gemäß der Erfindung, gleich oder kürzer in der Länge als die Original-Matrize sein.

[0055] Einbauen. Der Term „Einbauen“, wie hier verwendet, bedeutet ein Teil eines DNA- oder RNA-Moleküls oder -Primers Werden.

[0056] Amplifikation. Wie hier verwendet, verweist „Amplifikation“ auf jedes beliebige In-Vitro-Verfahren zum Erhöhen der Anzahl an Kopien einer Nukleotid-Sequenz unter Verwendung einer Polymerase. Die Nukleinsäure-Amplifikation führt zum Einbau von Nukleotiden in ein DNA- und/oder RNA-Molekül oder -Primer, wobei ein neues Molekül, das zu einer Matrize komplementär ist, gebildet wird. Das gebildete Nukleinsäure-Molekül und deren Matrize kann als Matrizen zum Synthetisieren zusätzlicher Nukleinsäure-Moleküle verwendet werden. Wie hier verwendet, kann eine Amplifikations-Reaktion aus vielen Replikations-Runden bestehen. DNA-Amplifikations-Reaktionen beinhalten, zum Beispiel, Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR, „polymerase chain reactions“). Eine PCR-Reaktion kann aus 5 bis 100 „Zyklen“ aus Denaturierung und Synthese eines DNA-Moleküls bestehen.

[0057] Nukleotid. Wie hier verwendet, verweist „Nukleotid“ auf eine Base-Zucker-Phosphat-Kombination. Nukleotide sind monomere Einheiten einer Nukleinsäure-Sequenz (DNA und RNA). Nukleotide können ebenfalls Mono-, Di- und Triphosphat-Formen solcher Nukleotide beinhalten. Der Term Nukleotid beinhaltet Ribonukleosidtriphosphate ATP, UTP, CTP, GTP und Desoxyribonukleosidtriphosphate, wie zum Beispiel dATP, dCTP, dITP, dUTP, dGTP, dTTP, oder Derivate davon. Solche Derivate beinhalten, zum Beispiel [αS]dATP, 7-Deaza-dGTP und 7-Deaza-dATP und Nukleotid-Derivate, die dem Nukleinsäure-Molekül, das diese enthält, Nukleare-Resistenz verleihen. Der Term Nukleotid, wie hier verwendet, verweist ebenfalls auf Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs) und deren Derivate. Veranschaulichende Beispiele von Didesoxyribonukleosidtriphosphaten beinhalten, ohne darauf beschränkt zu sein, ddATP, ddCTP, ddGTP, ddITP und ddTTP. Gemäß der vorliegenden Erfindung kann ein „Nukleotid“ unmarkiert oder mit gut bekannten Techniken detektierbar markiert sein. Detektierbare Marker beinhalten, zum Beispiel, radioaktive Isotope, fluoreszente Marker, chemilumineszente Marker, biolumineszente Marker und Enzym-Marker.

[0058] Blockmittel. „Blockmittel“ verweist auf ein Nukleotid (oder Derivate davon), modifizierte Oligonukleotide und/oder ein oder mehr andere Modifikation/en, welche in die Nukleinsäure-Inhibitoren der Erfindung eingebaut wird/werden, um den Abbau oder Verdau solcher Nukleinsäure-Moleküle durch Nukleare-Aktivität zu verhindern oder zu inhibieren. Ein oder mehrere Blockmittel kann/können in die Nukleinsäure-Inhibitoren der Erfindung intern, bei oder nahe den 3'-Termini und/oder bei oder nahe den 5'-Termini der Nukleinsäure-Inhibi-

toren eingebaut werden. Vorzugsweise sind solche Blockmittel bei linearen Inhibitor-Nukleinsäure-Molekülen bei oder nahe den 3'-Termini und/oder bei oder nahe den 5'-Termini und/oder bei den bevorzugten Spaltungsstellen der 5'-nach-3'-Exonuklease solcher Moleküle untergebracht (Lyamichev, V., Brow, M. A. D., und Dahlberg, J. E., (1993) Science, 260, 778–783). Vorzugsweise verhindern oder inhibieren solche Blockmittel den Abbau oder Verdau der Inhibitor-Nukleinsäure-Moleküle durch Exonuklease-Aktivität, die mit der Polymerase oder reversen Transkriptase assoziiert ist, die verwendet wird oder die in der Synthese-Reaktion vorhanden sein kann. Zum Beispiel verhindern die Blockmittel der Erfindung den Abbau oder Verdau von Inhibitor-Nukleinsäure-Molekülen durch 3'-Exonuklease-Aktivität und/oder 5'-Exonuklease-Aktivität, die mit einer Polymerase (z.B. einer DNA-Polymerase) assoziiert ist. Bevorzugte Blockmittel in Übereinstimmung mit der Erfindung beinhalten Didesoxynukleotide und deren Derivate, wie zum Beispiel ddATP, ddCTP, ddGTP, ddITP und ddTTP. Andere Blockmittel zur Verwendung in Übereinstimmung mit der Erfindung beinhalten, ohne darauf beschränkt zu sein, AZT, Phosphamid-Gerüste (z.B. PNAs), 3'-dNTPs (z.B. Condycepin) oder jedes beliebige Nukleotid, das eine Blockgruppe, vorzugsweise an dessen 3'-Position, enthält. Solche Blockmittel agieren vorzugsweise so, dass sie die Exonuklease-Aktivität (z.B. 3'-Exonuklease-Aktivität) inhibieren oder verhindern, dass diese die inhibitorische Nukleinsäure der Erfindung verändert oder verdaut. In einigen Ausführungsformen kann der 5'-Terminus der Oligonukleotide der vorliegenden Erfindung modifiziert werden, um diese gegenüber der 5'-nach-3'-Exonuklease-Aktivität resistent zu machen. Eine solche Modifikation kann sein, ein zusätzliches Nukleotid an das 5'-Ende des Oligonukleotids in eine 5'-5'-Verknüpfung hinzuzufügen (siehe Koza, M., et al., Journal of Organic Chemistry 56: 3757). Dies führt zum 5'-Ende des Oligonukleotids, welches zum 5'-Ende, das ein 3'-Ende aufweist, führt. In einem anderen Aspekt inhibieren oder verhindern solche Blockmittel vorzugsweise die Polymerase-Aktivität der Polymerasen vor dem Verändern oder Umwandeln (z.B. Einbauen von Nukleotiden) der inhibitorischen Nukleinsäuren der Erfindung.

[0059] Oligonukleotid. Wie hier verwendet, verweist „Oligonukleotid“ auf ein synthetisches oder biologisch hergestelltes Molekül, das eine kovalent verknüpfte Sequenz aus Nukleotiden umfasst, welche über eine Phosphordiester-Bindung zwischen der 3'-Position der Pentose eines Nukleotids und der 5'-Position der Pentose des benachbarten Nukleotids verbunden sein können. Oligonukleotid, wie hier verwendet, wird so verstanden, als dass es natürliche Nukleinsäure-Moleküle (d.h., DNA und RNA) genauso wie nicht-natürliche oder derivatisierte Moleküle, wie zum Beispiel Peptid-Nukleinsäuren, Phosphothioat-enthaltende Nukleinsäuren, Phosphonat-enthaltende Nukleinsäuren und Ähnliches, beinhaltet. Zusätzlich können Oligonukleotide der vorliegenden Erfindung modifizierte oder nicht-natürlich vorkommende Zucker-Reste (d.h., Arabinose) und/oder modifizierte Basen-Reste enthalten. Oligonukleotid wird so verstanden, als dass es derivatisierte-Moleküle, wie zum Beispiel Nukleinsäure-Moleküle, umfasst, die verschiedene natürliche Nukleotide, derivatisierte Nukleotide, modifizierte Nukleotide oder Kombinationen davon, umfassen. Somit wird jedes beliebige Oligonukleotid oder anderes Molekül, das für das Verfahren der Erfindung geeignet ist, über diese Definition berücksichtigt. Oligonukleotide der vorliegenden Erfindung können ebenfalls Blockgruppen umfassen, welche die Interaktion des Moleküls mit bestimmten Proteinen, Enzymen oder Substraten verhindern.

[0060] Haarnadelschleife. Wie hierin verwendet, wird der Term „Haarnadelschleife“ verwendet, um auf die Struktur eines Oligonukleotids, in welchem ein oder mehr Teil/e des Oligonukleotids mit einem oder mehr anderen Teil/en des Oligonukleotids Basenpaare bilden, hinzuweisen. Wenn die zwei Teile Basenpaarung/en eingehen, um einen doppel-strängigen Teil des Oligonukleotids zu bilden, kann auf dem doppel-strängigen Teil als auf einen Stamm verwiesen werden. Somit kann, abhängig von der Anzahl der verwendeten komplementären Teile eine Anzahl an Stämmen (vorzugsweise 1–10) gebildet werden. Zusätzlich ermöglicht die Bildung eines oder mehr Stammes/Stämme vorzugsweise die Bildung einer oder mehr Loop-Struktur/en in dem Haarnadelschleifen-Molekül. In einem Aspekt kann jede beliebige oder mehr der Loop-Strukturen an einer oder mehr Stellen innerhalb des Loops oder der Loops geschnitten („cut“) oder angeschnitten („nicked“) sein, aber vorzugsweise ist mindestens ein Loop nicht auf diese Weise geschnitten oder angeschnitten. Die Sequenz des Oligonukleotids kann so gewählt werden, dass die Anzahl der Nukleotide, welche eine Basenpaarung eingehen, um den Stamm zu bilden, von etwa 3 Nukleotiden bis etwa 100 oder mehr Nukleotiden, von etwa 3 Nukleotiden bis etwa 50 Nukleotiden, von etwa 3 Nukleotiden bis etwa 25 Nukleotiden und von etwa 3 bis etwa 10 Nukleotiden variiert. Zusätzlich kann die Sequenz des Oligonukleotids so variiert werden, dass die Anzahl der Nukleotide, welche keine Basenpaare bilden, von 0 Nukleotiden bis etwa 100 oder mehr Nukleotiden, von 0 Nukleotiden bis etwa 50 Nukleotiden, von 0 Nukleotiden bis etwa 25 Nukleotiden oder von 0 Nukleotiden bis etwa 10 Nukleotiden variiert. Die zwei Teile des Oligonukleotids, welche Basenpaarung/en eingehen, können überall oder an jeder beliebigen Anzahl an Stellen in der Sequenz des Oligonukleotids untergebracht sein. In allen Ausführungsformen beinhaltet ein Teil des Oligonukleotids, der Basenpaarung/en eingeht, das 3'-Ende des Oligonukleotids und ein Teil, der Basenpaarung/en eingeht, beinhaltet das 5'-Ende des Oligonukleotids. In einigen Ausführungsformen beinhaltet ein Teil des Oligonukleotids, der Basenpaarung/en eingeht, das 3'-Ende, während der andere Teil, der Basenpaarung/en eingeht, das 5'-Ende beinhaltet, und der Stamm des Oli-

gonukleotids endet stumpf („blunt“), wenn er Basenpaarung/en eingeht. In anderen Ausführungsformen kann die Lage der Basen-gepaarten Teile des Oligonukleotids so gewählt werden, dass ein 3'-Überhang, ein 5'-Überhang gebildet wird, und/oder kann so gewählt werden, dass weder die äußersten 3'- noch die äußersten 5'-Nukleotide in die Basenpaarung/en einbezogen werden.

[0061] Hybridisierung. Die Terme „Hybridisierung“ und „Hybridisieren“ verweisen auf die Basenpaarung/en zweier komplementärer einzel-strängiger Nukleinsäure-Moleküle (RNA und/oder DNA und/oder PNA), um ein doppel-strängiges Molekül zu ergeben. Wie hier verwendet, können zwei Nukleinsäure-Moleküle hybridisiert werden, wenngleich die Basenpaarung/en nicht vollständig komplementär ist. Demgemäß verhindern fehl-gepaarte Basen nicht die Hybridisierung zweier Nukleinsäure-Moleküle, vorausgesetzt, dass geeignete Bedingungen, die aus dem Stand der Technik gut bekannt sind, verwendet werden. In einem bevorzugten Aspekt werden die doppel-strängigen inhibitorischen Moleküle unter bestimmten Bedingungen denaturiert, so dass die komplementären einzel-strängigen Moleküle, welche hybridisiert sind, voneinander separieren können. Die gebildeten einzel-strängigen Moleküle interagieren nicht mit oder binden keine Polymerase oder interagieren mit oder binden die Polymerasen mit reduzierter Wirksamkeit, im Vergleich zu dem entsprechenden doppel-strängigen Molekül.

[0062] Einheit. Der Term „Einheit“, wie hier verwendet, verweist auf die Aktivität eines Enzyms. Eine Aktivitäts-Einheit ist, wenn diese, zum Beispiel, auf eine DNA-Polymerase verweist, die Enzym-Menge, die 10 nanomol dNTPs in Säure-unlösliches Material (d.h., DNA oder RNA) in 30 Minuten unter nach dem Standard präparierten DNA-Synthese-Bedingungen einbauen wird.

[0063] Viren. Wie hier verwendet, werden Viren, die eine reverse Transkriptase-Aktivität zum Vervollständigen deren Lebenszykluses erfordern, so verstanden, dass sie jedes beliebige Mitglied der Familie der Retroviridae, einschließlich humanen Immunschwäche-Viren („human immunodeficiency viruses“), Rinder-Immunschwäche-Virus, Rinder-Leukämie-Virus, humanen T-lymphotrophe Viren, Ziegen-Arthritis-Encephalitis-Virus, infektiöses Pferde-Anämie-Virus, Katzen-Immunschwäche-Virus, Katzen-Sarkom- und Leukämie-Viren, Maedi/Visna-Virus des Schafes, Maus-Brusttumor-Virus, Affen-Immunschwäche-Virus und anderen Retroviren, die dem Fachmann bekannt sind, beinhalten, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0064] Vektor. Der Term „Vektor“, wie hier verwendet, verweist auf ein Plasmid, Phagemid, Cosmid oder Phagen-Nukleinsäure oder ein anderes Nukleinsäure-Molekül, welches in der Lage ist, sich autonom in einer Wirtszelle zu replizieren. Vorzugsweise ist ein Vektor durch eine oder eine kleine Anzahl an Restriktions-Endonuklease-Erkennungsstellen charakterisiert, an welchen solche Nukleinsäure-Sequenzen in einer bestimmaren Weise ohne den Verlust einer essentiellen biologischen Funktion des Vektors geschnitten werden können und in welche Nukleinsäure-Moleküle „gespleißt“ („spliced“) werden können, um deren Replikation und Klonierung zu bewirken. Der Klonierungs-Vektor kann weiterhin einen oder mehr Marker enthalten, der/die für die Verwendung in der Identifizierung von mit dem Klonierungs-Vektor transformiert Zellen geeignet ist/sind. Marker sind, zum Beispiel, Antibiotikum-Resistenz-Austausch-Gene, einschließlich, ohne darauf beschränkt zu sein, Tetracyclin-Resistenz oder Ampicillin-Resistenz.

[0065] Expressions-Vektor. Der Term „Expressions-Vektor“, wie hier verwendet, verweist auf einen Vektor, der zu einem Klonierungs-Vektor ähnlich ist, aber welcher in der Lage ist, die Expression eines Gens, welches in ihn hineinkloniert wurde, nach der Transformation in einen Wirt zu verstärken. Das klonierte Gen steht gewöhnlich unter der Kontrolle bestimmter Kontroll-Sequenzen, wie zum Beispiel Promotor-Sequenzen, (d.h., ist operabel mit diesen verknüpft).

[0066] Rekombinanter Wirt. Der Term „rekombinanter Wirt“, wie hier verwendet, verweist auf jeden beliebigen prokaryontischen oder eukaryontischen Mikroorganismus, welcher die gewünschten klonierten Gene in einem Expressions-Vektor, Klonierungs-Vektor oder jedem beliebigen anderen Nukleinsäure-Molekül enthält. Der Term „rekombinanter Wirt“ bedeutet ebenfalls, dass dieser solche Wirtszellen beinhaltet, welche genetisch so konstruiert wurden, dass sie das gewünschte Gen auf einem Wirtschromosom oder in dem Wirtsgenom enthalten.

[0067] Wirt. Der Term „Wirt“, wie hier verwendet, verweist auf jeden beliebigen prokaryontischen oder eukaryontischen Mikroorganismus, der Empfänger jedes replizierbaren Expressions-Vektors, Klonierungs-Vektors oder jedes beliebigen Nukleinsäure-Moleküls, einschließlich der inhibitorischen Nukleinsäure-Moleküle der Erfindung, ist. Das Nukleinsäure-Molekül kann ein Struktur-Gen, einen Promotor und/oder einen Ursprung der Replikation („origin of replication“) enthalten, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0068] Promotor. Der Term „Promotor“, wie hier verwendet, verweist auf eine DNA-Sequenz, die allgemein als die 5'-Region eines Gens beschrieben wird, das, um das Kodon zu starten, in dessen Nähe untergebracht ist. In der Promotor-Region wird die Transkription eines benachbarten Gens/e initiiert.

[0069] Gen. Der Term „Gen“, wie hier verwendet, verweist auf eine DNA-Sequenz, die die für die Expression eines Polypeptids oder Proteins notwendige Information enthält. Er beinhaltet den Promotor und die Struktur-Gene, genauso wie andere Sequenzen, die in die Expression des Proteins einbezogen sind.

[0070] Struktur-Gen. Der Term „Struktur-Gen“, wie hier verwendet, verweist auf eine DNA-Sequenz, die in die Boten-RNA umgeschrieben („transkribiert“) wird, die danach in eine für ein spezifisches Polypeptid charakteristische Sequenz aus Aminosäuren übersetzt („translatiert“) wird.

[0071] Operabel verknüpft. Der Term „operabel verknüpft“, wie hier verwendet, bedeutet, dass der Promotor so positioniert ist, dass er die Initiierung der Expression des Polypeptids, das durch das Struktur-Gen kodiert wird, kontrolliert.

[0072] Expression. Der Term „Expression“, wie hier verwendet, verweist auf ein Verfahren, durch welches ein Gen ein Polypeptid herstellt. Er beinhaltet die Transkription (Umschreibung) des Gens in die Boten-RNA („messenger RNA“, mRNA) und die Translation (Übersetzung) einer solchen mRNA in das/die Polypeptid(e).

[0073] Wesentlich rein. Wie hier verwendet, bedeutet „wesentlich rein“, dass das gewünschte aufgereinigte Molekül, wie zum Beispiel ein Protein oder ein Nukleinsäure-Molekül (einschließlich des inhibitorischen Nukleinsäure-Moleküls der Erfindung) wesentlich frei von Kontaminanten ist, welche mit dem gewünschten Molekül typischerweise assoziiert sind. Kontaminierende Komponenten können Verbindungen oder Moleküle beinhalten, ohne darauf beschränkt zu sein, welche mit den Inhibitions- oder Synthese-Reaktionen der Erfindung interferieren können und/oder die die inhibitorischen Nukleinsäure-Moleküle der Erfindung (wie zum Beispiel Nukleasen, einschließlich Exonukleasen und Endonukleasen) abbauen oder verdauen oder die die synthetisierten oder amplifizierten Nukleinsäure-Moleküle, die durch die Verfahren der Erfindung hergestellt werden, abbauen oder verdauen.

[0074] Thermostabil. Wie hier verwendet, verweist „thermostabil“ auf eine DNA-Polymerase, welche gegenüber der Inaktivierung durch Wärme resistenter ist. DNA-Polymerasen synthetisieren die Bildung eines zu einer einzel-strängigen DNA-Matrize komplementären DNA-Moleküls durch Verlängern eines Primers in die 5'-3'-Richtung. Diese Aktivität kann bei mesophilen DNA-Polymerasen durch Wärmebehandlung inaktiviert werden. Zum Beispiel wird die Aktivität der T5-DNA-Polymerase durch das Exponieren des Enzyms einer Temperatur von 90°C für 30 Sekunden vollständig inaktiviert. Wie hier verwendet, ist die Aktivität einer thermostabilen DNA-Polymerase resistenter gegenüber Wärme-Inaktivierung als eine mesophile DNA-Polymerase. Jedoch bedeutet eine thermostabile DNA-Polymerase nicht, dass auf ein Enzym verwiesen wird, das gegenüber Wärme-Inaktivierung vollständig resistent ist, und somit kann Wärmebehandlung die DNA-Polymerase-Aktivität teilweise reduzieren. Eine thermostabile DNA-Polymerase wird typischerweise ebenfalls eine höhere optimale Temperatur aufweisen als mesophile DNA-Polymerasen.

[0075] 3'-nach-5'-Exonuklease-Aktivität. „3'-nach-5'-Exonuklease-Aktivität“ ist eine aus dem Stand der Technik gut bekannte enzymatische Aktivität. Diese Aktivität ist oft mit DNA-Polymerasen assoziiert und es wird angenommen, dass diese in einen DNA-Replikations-„Editier“- oder -Korrektur-Mechanismus einbezogen ist.

[0076] Eine „DNA-Polymerase, die in der 3'-nach-5'-Exonuklease-Aktivität wesentlich reduziert ist“, wird hier definiert als entweder (1) eine mutierte DNA-Polymerase, die etwa oder weniger als 10% oder vorzugsweise etwa oder weniger als 1% der 3'-nach-5'-Exonuklease-Aktivität des entsprechenden unmutierten, Wild-Typ-Enzyms aufweist, oder (2) eine DNA-Polymerase, die eine 3'-nach-5'-Exonuklease-spezifische Aktivität aufweist, welche weniger als etwa 1 Einheit/mg Protein oder vorzugsweise etwa oder weniger als 0,1 Einheiten/mg Protein beträgt. Eine Aktivitäts-Einheit der 3'-nach-5'-Exonuklease ist definiert als die Aktivitäts-Menge, die 10 nmol an Substrat-Enden in 60 min bei 37°C solubilisiert, wobei, wie in „BRL 1989 Catalogue & Reference Guide“, Seite 5, beschrieben wird, HhaI-Fragmente des Lambda-DNA-3'-Endes, das mit [³H]dTTP durch die terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) markiert war, untersucht werden. Das Protein wird nach dem Verfahren von Brandford, Anal. Biochem. 72: 248 (1976), gemessen. Als ein Mittel zum Vergleich weist die natürliche Wild-Typ-T5-DNA-Polymerase (DNAP) oder die T5-DNAP, die durch pTTQ19-T5-2 kodiert wird, eine spezifische Aktivität von etwa 10 Einheiten/mg Protein auf, während die DNA-Polymerase, die durch pTTQ19-T5-2(Exo-) (U.S. 5,270,179) kodiert wird, eine spezifische Aktivität von etwa 0,0001 Einheiten/mg Protein oder 0,001% der spezifischen Aktivität des unmodifizierten Enzyms, eine 10⁵-fache Reduktion, auf-

weist. Den Polymerasen, die in Übereinstimmung mit der Erfindung verwendet werden, kann die 3'-Exonuklease-Aktivität fehlen oder sie können in der 3'-Exonuklease-Aktivität wesentlich reduziert sein.

[0077] 5'-nach-3'-Exonuklease-Aktivität. „5'-nach-3'-Exonuklease-Aktivität“ ist ebenfalls eine aus dem Stand der Technik gut bekannte enzymatische Aktivität. Diese Aktivität ist oft mit DNA-Polymerasen, wie zum Beispiel E. coli-Poll- und Taq-DNA-Polymerase assoziiert.

[0078] Eine „Polymerase, die in der 5'-nach-3'-Exonuklease-Aktivität wesentlich reduziert ist“, wird hier definiert als entweder (1) mutierte oder modifizierte Polymerase, die etwa oder weniger als 10% oder vorzugsweise etwa oder weniger als 1% der 5'-nach-3'-Exonuklease-Aktivität des entsprechenden unmutierten Wild-Typ-Enzyms aufweist, oder (2) eine Polymerase, die 5'-nach-3'-Exonuklease-spezifische Aktivität aufweist, welche weniger als etwa 1 Einheit/mg Protein oder vorzugsweise etwa oder weniger als 0,1 Einheiten/mg Protein beträgt.

[0079] Sowohl die 3'-nach-5'- als auch die 5'-nach-3'-Exonuklease-Aktivität kann auf Sequenzierungs-Gelen betrachtet werden. Aktive 5'-nach-3'-Exonuklease-Aktivität wird in einem Sequenzierungs-Gel durch Entfernen von Mononukleotiden und längerer Produkte vom 5'-Ende des wachsenden Primers Produkte unterschiedlicher Größe herstellen. 3'-nach-5'-Exonuklease-Aktivität kann durch Verfolgen des Abbaus radiomarkierter Primer in einem Sequenzierungs-Gel gemessen werden. Somit können die relativen Mengen dieser Aktivitäten (z.B. durch Vergleich der Wild-Typ- und mutierten oder modifizierten Polymerasen) mit nicht mehr als Routine-Experimentierung bestimmt werden.

[0080] Inhibitorische Nukleinsäuren. Die Nukleinsäuren der vorliegenden Erfindung beinhalten einzel-strängige und doppel-strängige Nukleinsäuren (jedoch können andere Strang-Multiplizitäten, wie zum Beispiel dreifach-strängige (z.B. Triple-Helix-)Moleküle verwendet werden), einschließlich Nukleinsäuren, die von DNA, RNA, PNA, LNA oder anderen derivatisierten Nukleinsäure-Molekülen oder einer Kombination davon umfasst werden. Die inhibitorische Nukleinsäure umfasst eine Sequenz, welche in der Lage ist, bei einem Bedingungs-Satz (vorzugsweise bei der Umgebungstemperatur) eine Stelle zu bilden, welche mit dem in der Synthese oder Amplifikation verwendeten Matrice/Primer-Substrat mit der Polymerase-Aktivität um die Bindung am Enzym kompetitiert und unter einem zweiten Bedingungs-Satz (vorzugsweise erhöhte Temperaturen) um die Nukleinsäure-Synthese oder -Amplifikation weniger wirksam kompetitiert. Vorzugsweise ist die Sequenz der inhibitorischen Nukleinsäure zu dem Primer, der in der zu inhibierenden Synthese-, Amplifikations- oder Sequenzierungs-Reaktion verwendet wird, nicht komplementär. Wie erkannt wird, können andere Nukleinsäuren (natürliche, unnatürliche, modifizierte, etc.) ausgewählt und in Übereinstimmung mit der Erfindung verwendet werden. Solche Auswahl kann durch Bindungsstudien und/oder Nukleinsäure-Synthese-Inhibitions-Assays erreicht werden. Die Konstruktion der Nukleinsäure-Sequenzen für die Haarnadelschleifen-Bildung kann durch den Fachmann erreicht werden. Siehe z.B. Antao, V. P., und Tinoco, I., Jr., 1992, Nucl. Acids Res. 20: 819–824. Vorzugsweise kann der Nukleinsäure-Inhibitor Nuklease-resistent (3'-nach-5'-Exonuklease und 5'-nach-3'-Exonuklease) und/oder gegenüber Polymerisation inert gemacht werden. Verfahren, um die Nukleinsäure gegenüber Exonukleasen und Polymerisation inert zu machen, sind aus dem Stand der Technik bekannt und beinhalten, zum Beispiel, die Verwendung derivatisierter Nukleinsäure-Moleküle, welche derivatisierte Nukleotide (zum Beispiel die Verwendung von Phosphoamid- und/oder Phosphorthioat-anstelle des Phosphat-Gerüsts) und/oder die Zugabe eines oder mehr Blockmittel zu den inhibitorischen Nukleinsäure-Molekülen der Erfindung beinhalten können. Die inhibitorische Nukleinsäure bildet vorzugsweise eine oder mehr Haarnadelschleifen-Loop-Struktur/en mit einem doppel-strängigen Stamm. Der doppel-strängige Stamm kann blinde („blunt“) Enden und/oder einen einzel-strängigen Überhang (zum Beispiel am 5'- und/oder 3'-Terminus) aufweisen, so konstruiert, dass er das typische Primer/Matrice-Substrat einer Polymerase nachahmt.

[0081] Inhibitorische Nukleinsäuren der vorliegenden Erfindung werden in den vorliegenden Zusammensetzungen und Verfahren in einer Synthese-, Sequenzierungs- oder Amplifikations-Reaktion vorzugsweise bei einer Endkonzentration verwendet, die ausreichend ist, solche Synthese, Sequenzierung oder Amplifikation in Gegenwart eines Polymerase- oder reverse Transkriptase-Enzyms zu verhindern oder zu inhibieren. Das Verhältnis der inhibitorischen Nukleinsäure der Erfindung zur Polymerase oder reversen Transkriptase kann, abhängig von der verwendeten Polymerase oder reversen Transkriptase, variieren. Das molare Verhältnis der inhibitorischen Nukleinsäure zum Polymerase/reverse Transkriptase-Enzym kann sich für eine Synthese-, Sequenzierungs- oder Amplifikations-Reaktion auf etwa 0,001–100:1; 0,01–1.000:1; 0,1–10.000:1; 1–100.000:1; 1–5.000.000:1 oder 1–1.000.000:1 erstrecken. Natürlich werden andere geeignete Verhältnisse solcher inhibitorischer Nukleinsäuren zur Polymerase/reverse Transkriptase, die für die Verwendung in der Erfindung geeignet sind, für einen Durchschnittsfachmann offensichtlich oder werden mit nicht mehr als der Routine-Experimentierung bestimmt.

[0082] Inhibitorische Nukleinsäure-Moleküle der Erfindung können nach chemischen Standard-Oligonukleotid-Synthese-Techniken (zum Beispiel Phosphoramidit- und anderen aus dem Stand der Technik bekannten Techniken, siehe U.S.-Patent Nr. 5,529,756) synthetisiert werden. Alternativ können rekombinante DNA-Techniken verwendet werden, um die inhibitorischen Nukleinsäuren der Erfindung durch Klonieren des interessierenden Nukleinsäure-Moleküls in einen Vektor, Einführen des Vektors in die Wirtszelle, Züchten der Wirtszelle und Isolieren des interessierenden inhibitorischen Nukleinsäure-Moleküls aus der Wirtszelle herzustellen. Inhibitorische Nukleinsäure-Moleküle der Erfindung können ebenfalls aus kommerziellen Quellen für Handels-Oligonukleotide, wie zum Beispiel Life Technologies, Inc., erhalten werden oder können enzymatisch, zum Beispiel durch die Verwendung von Polymerasen in Nukleinsäure-Synthese- oder -Amplifikations-Reaktionen, hergestellt werden.

[0083] In einigen Ausführungsformen können die Oligonukleotide der vorliegenden Erfindung für therapeutische Zwecke verwendet werden. In einer bevorzugten Ausführungsform können die Oligonukleotide der vorliegenden Erfindung verwendet werden, um ein Lebewesen (zum Beispiel einen Menschen oder ein Tier) zu behandeln, das mit einem Virus, das die reverse Transkriptase-Aktivität zum Replizieren erfordert, infiziert wurde. Zur therapeutischen Behandlung können die Oligonukleotide als eine pharmazeutisch verträgliche Zusammensetzung verabreicht werden, in welcher ein oder mehr Oligonukleotid/e der vorliegenden Erfindung mit einem oder mehr Träger/n, Verdickungsmittel/n, Verdünnungsmittel/n, Puffer/n, Konservierungsstoff/en, Oberflächen-aktiven Mittel/n, Exzipient/en und Ähnlichen gemischt sein kann. Pharmazeutische Zusammensetzungen können ebenfalls einen oder mehr zusätzliche/n aktive/n Inhaltsstoff/e, wie zum Beispiel antimikrobiische Mittel, Anti-Entzündungsmittel, Anästhetika und Ähnliche zusätzlich zu den Oligonukleotiden beinhalten.

[0084] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können auf jede Weise verabreicht werden, die gewöhnlich zum Verabreichen pharmazeutischer Zusammensetzungen verwendet werden. Zum Beispiel kann die Verabreichung topisch (einschließlich ophthalmisch, vaginal, rektal, intranasal), oral, durch Inhalation oder parenteral, zum Beispiel durch intravenösen Tropf oder subkutane, intraperitoneale oder intramuskuläre Injektion durchgeführt werden.

[0085] Pharmazeutische Zusammensetzungen, die für topische Verabreichung formuliert werden, können Salben, Lotionen, Cremes, Gele, Tropfen, Zäpfchen, Sprays, Flüssigkeiten und Pulver beinhalten. Jeder kommerzielle pharmazeutische Exzipient, wie zum Beispiel Träger, wässrige, Pulver-förmige oder ölige Basen, Verdickungsmittel und Ähnliche können verwendet werden.

[0086] Pharmazeutische Zusammensetzungen, die für orale Verabreichung formuliert werden, können in der Form eines oder mehr Pulver/n, Granulats/en, Suspension/en oder Lösung/en in Wasser oder nicht-wässrigen Medien, Kapsel/n, Päckchen oder Tablette/n vorliegen. Pharmazeutische Zusammensetzungen, die für orale Verabreichung formuliert werden, können zusätzlich Verdickungsmittel, Aromastoffe, Verdünnungsmittel, Emulgatoren, Dispergierhelfer, Bindemittel oder Ähnliche umfassen.

[0087] Pharmazeutische Zusammensetzungen, die für parenterale Verabreichung formuliert werden, können sterile wässrige Lösungen beinhalten, welche ebenfalls Puffer, Verdünnungsmittel und andere geeignete Additive enthalten können.

[0088] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können in einer therapeutisch wirksamen Dosis verabreicht werden. Eine therapeutisch wirksame Dosis ist eine Dosis, welche die Replikation des Virus innerhalb des Wirts inhibiert. Es ist nicht notwendig, dass die Replikation des Virus vollständig eliminiert wird, damit eine Behandlung therapeutisch wirksam ist. Die Reduktion der Replikationsrate des Virus kann eine therapeutische Wirkung sein. Eine oder mehr Dosis/Dosen der pharmazeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können einmal oder mehrmals täglich für eine Dauer der Behandlung verabreicht werden, welche eine einzelne Verabreichung sein kann oder mehrere Verabreichungen pro Tag für eine Dauer von einigen Tagen bis einigen Monaten oder bis eine Heilung bewirkt wird oder eine Minderung des Krankheitszustandes erreicht wird, sein können. Der Durchschnittsfachmann kann die optimalen Dosen, Dosierungswege und Frequenz, mit welcher die Dosen verabreicht werden sollten, leicht bestimmen.

[0089] Polymerasen. Enzyme mit Polymerase-Aktivität, an welche die inhibitorischen Nukleinsäuren der vorliegenden Erfindung binden oder mit denen sie interagieren können, beinhalten jedes beliebige Enzym, das in Nukleinsäure-Synthese-, -Amplifikations- oder -Sequenzierungs-Reaktionen verwendet wird. Solche Polymerasen beinhalten, ohne darauf beschränkt zu sein, Polymerasen (DNA- und RNA-Polymerasen) und reverse Transkriptasen. DNA-Polymerase beinhaltet, ohne darauf beschränkt zu sein, Thermus thermophi-

lus(Tth)-DNA-Polymerase, *Thermus aquaticus*(Taq)-DNA-Polymerase, *Thermotoga neopolitana*(Tne)-DNA-Polymerase, *Thermotoga maritima*(Tma)-DNA-Polymerase, *Thermococcus litoralis*(Tli oder VENTTM)-DNA-Polymerase, *Pyrococcus furiosus*(Pfu)-DNA-Polymerase, DEEPVENTTM-DNA-Polymerase, *Pyrococcus woosii*(Pwo)-DNA-Polymerase, *Pyrococcus* sp KOD2(KOD)-DNA-Polymerase, *Bacillus stearothermophilus*(Bst)-DNA-Polymerase, *Bacillus caldophilus*(Bca)-DNA-Polymerase, *Sulfolobus acidocaldarius*(Sac)-DNA-Polymerase, *Thermoplasma acidophilum*(Tac)-DNA-Polymerase, *Thermus flavus*(Tfl/Tub)-DNA-Polymerase, *Thermus ruber*(Tru)-DNA-Polymerase, *Thermus brockianus*(DYNAZYMETM)-DNA-Polymerase, *Methanobacterium thermoautotrophicum*(Mth)-DNA-Polymerase, *Mycobacterium*(Mtb, Mlep)-DNA-Polymerase, *E. coli*-pol I-DNA-Polymerase, T5-DNA-Polymerase, T7-DNA-Polymerase und allgemein pol I-Typ-DNA-Polymerasen und Mutanten, Varianten und Derivate davon. RNA-Polymerasen, wie zum Beispiel T3, T5 und SP6 und Mutanten, Varianten und Derivate davon können ebenfalls in Übereinstimmung mit der Erfindung verwendet werden.

[0090] Die in der vorliegenden Erfindung verwendeten Nukleinsäure-Polymerasen können mesophil oder thermophil sein und sind vorzugsweise thermophil. Bevorzugte mesophile DNA-Polymerasen beinhalten die pol I-Familie der DNA-Polymerasen (und deren entsprechende Klenow-Fragmente), wobei jede beliebige von ihnen aus einem Organismus, wie zum Beispiel *E. coli*, *H. influenzae*, *D. radiodurans*, *H. pylori*, *C. aurantiacus*, *R. prowazekii*, *T. pallidum*, *Synechococcus* sp., *B. subtilis*, *L. lactis*, *S. pneumoniae*, *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. smegmatis*, Bakteriophage L5, phi-C31, T7, T3, T5, SP01, SP02, mitochondrial aus *S. cerevisiae* MIP-1 und aus eukaryontischem *C. elegans* und *D. melanogaster* (Astatke, M., et al., 1998, *J. Mol. Biol.* 278, 147–165), pol III-Typ-DNA-Polymerase, isoliert aus allen beliebigen Quellen, und Mutanten, Derivaten oder Varianten davon und Ähnliches. Bevorzugte thermostabile DNA-Polymerasen, die in den Verfahren und Zusammensetzungen der Erfindung verwendet werden können, beinhalten Taq-, Tne-, Tma-, Pfu-, KOD-, Tfl-, Tth-Stoffel-Fragment-, VENTTM- und DEEPVENTTM-DNA-Polymerasen und Mutanten, Varianten und Derivate davon (U.S.-Patent Nr. 5,436,149; U.S.-Patent 4,889,818; U.S.-Patent 4,965,188; U.S.-Patent 5,079,352; U.S.-Patent 5,614,365; U.S.-Patent 5,374,553; U.S.-Patent 5,270,179; U.S.-Patent 5,047,342; U.S.-Patent No. 5,512,462; WO 92/06188; WO 92/06200; WO 96/10640; WO 97/09451; Barnes, W. M., *Gene* 112: 29–35 (1992); Lawyer, F. C., et al., *PCR Meth. Appl.* 2: 275–287 (1993); Flaman, J.-M., et al., *Nucl. Acids Res.* 22(15): 3259–3260 (1994)).

[0091] Reverse Transkriptasen zur Verwendung in dieser Erfindung beinhalten jedes beliebige Enzym mit reverse Transkriptase-Aktivität. Solche Enzyme beinhalten, ohne darauf beschränkt zu sein, retrovirale reverse Transkriptase, Retrotransposon-reverse Transkriptase, Hepatitis B-reverse Transkriptase, Blumenkohl-Mosikvirus-reverse Transkriptase, bakterielle reverse Transkriptase, Tth-DNA-Polymerase, Taq-DNA-Polymerase (Saiki, R. K., et al., *Science* 239: 487–491 (1988); U.S.-Patent Nr. 4,889,818 und 4,965,188), Tne-DNA-Polymerase (WO 96/10640 und WO 97/09451), Tma-DNA-Polymerase (U.S.-Patent Nr. 5,374,553) und Mutanten, Varianten oder Derivate davon (siehe z.B. WO 97/09451 und WO 98/47912). Bevorzugte Enzyme zur Verwendung in der Erfindung beinhalten solche Enzyme, die reduzierte, wesentlich reduzierte oder eliminierte Rnase H-Aktivität aufweisen. Einem Enzym, das „in Hinblick auf die Rnase H-Aktivität wesentlich reduziert ist“, bedeutet, dass das Enzym weniger als etwa 20%, bevorzugter weniger als etwa 15%, 10% oder 5% und am meisten bevorzugt weniger als etwa 2% der Rnase H-Aktivität des entsprechenden Wildtyp- oder Rnase H⁺-Enzyms, wie zum Beispiel Wildtyp-Moloney-Maus-Leukämie-Virus(M-MLV, „Moloney Murine Leukemia Virus“)-, Vogel-Myeloblastosis-Virus(AMV, „Avian Myeloblastosis Virus“)- oder Rous-Sarkom-Virus(RSV, „Rous Sarcoma Virus“)-reverse Transkriptasen aufweist. Die Rnase H-Aktivität jedes beliebigen Enzyms kann durch eine Vielfalt an Assays bestimmt werden, wie zum Beispiel solche Assays, die zum Beispiel in U.S.-Patent Nr. 5,244,797, in Kotewicz, M. L., et al., *Nucl. Acids Res.* 16: 265 (1988) und in Gerard, G. F., et al., *FOCUS* 14(5): 91 (1992), beschrieben werden, von denen die Offenbarungen hier vollständig durch Bezugnahme aufgenommen werden. Besonders bevorzugte Polypeptide zur Verwendung in der Erfindung beinhalten, ohne darauf beschränkt zu sein, M-MLV H⁻-reverse Transkriptase, RSV H⁻-reverse Transkriptase, AMV H⁻-reverse Transkriptase, RAV („rouse-associated virus“, Rous-assoziiertes Virus) H⁻-reverse Transkriptase, MAV („myeloblastosis-associated virus“, Myeloblastosis-assoziiertes Virus) H⁻-reverse Transkriptase und HIV H⁻-reverse Transkriptase (siehe U.S.-Patent Nr. 5,244,797 und WO 98/47912). Es wird jedoch von einem Durchschnittsfachmann verstanden, dass jedes beliebige Enzym, das in der Lage ist, ein DNA-Molekül aus einem Ribonukleinsäure-Molekül (d.h., das reverse Transkriptase-Aktivität aufweist), herzustellen, in den Zusammensetzungen, Verfahren und Kits der Erfindung äquivalent verwendet werden kann.

[0092] Die Enzyme mit Polymerase-Aktivität zur Verwendung in der Erfindung, können kommerziell erhalten werden, zum Beispiel von Life Technologies, Inc. (Rockville, Maryland), Perkin-Elmer (Branchburg, New Jersey), New England BioLabs (Beverly, Massachusetts) oder Boehringer Mannheim Biochemicals (Indianapolis, Indiana). Die Enzyme mit reverse Transkriptase-Aktivität zur Verwendung in der Erfindung können kommerziell

erhalten werden, zum Beispiel von Life Technologies, Inc. (Rockville, Maryland), Pharmacia (Piscataway, New Jersey), Sigma (Saint Louis, Missouri) oder Boehringer Mannheim Biochemicals (Indianapolis, Indiana). Alternativ können die Polymerasen oder reverse Transkriptasen mit Polymerase-Aktivität aus deren natürlichen viralen oder bakteriellen Quellen gemäß Standardverfahren zum Isolieren und Aufreinigen natürlicher Proteine, die einem Durchschnittsfachmann gut bekannt sind (siehe z.B. Houts, G. E., et al., J. Virol. 29: 517 (1979)) isoliert werden. Zusätzlich können solche Polymerasen/reverse Transkriptasen durch rekombinante DNA-Techniken, die einem Durchschnittsfachmann bekannt sind (siehe z.B. Kotewicz, M. L., et al., Nucl. Acids Res. 16: 265 (1988); U.S.-Patent Nr. 5,244,797; WO 98/47912; Soltis, D. A., und Skalka, A. M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 3372–3376 (1988)) hergestellt werden. Beispiele für Polymerase-Aktivität- und reverse Transkriptase-Aktivität-aufweisende Enzyme, können jedes beliebige aus den in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Enzymen beinhalten.

Verfahren zur Nukleinsäure-Synthese, -Amplifikation und -Sequenzierung

[0093] Die inhibitorischen Nukleinsäuren und -Zusammensetzungen der Erfindung können in Verfahren zur Synthese von Nukleinsäuren verwendet werden. Insbesondere wurde entdeckt, dass die vorliegenden inhibitorischen Nukleinsäuren und -Zusammensetzungen nicht-spezifische Nukleinsäure-Synthese, insbesondere in Amplifikations-Reaktionen, wie zum Beispiel der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, „polymerase chain reaction“), reduzieren. Die vorliegenden inhibitorischen Nukleinsäuren und -Zusammensetzungen können deshalb in jedem beliebigen Verfahren verwendet werden, das die Synthese von Nukleinsäure-Moleküle, wie zum Beispiel DNA- (einschließlich cDNA-) und RNA-Molekülen erfordert. Verfahren, in welchen die inhibitorischen Nukleinsäuren und Zusammensetzungen der Erfindung vorteilhaft verwendet werden können, beinhalten, ohne darauf beschränkt zu sein, Nukleinsäure-Synthese-Verfahren und Nukleinsäure-Amplifikations-Verfahren (einschließlich „Hot-Start“-Synthese oder -Amplifikation), in welchen die Reaktion bei einer Temperatur aufgebaut wird, bei der die inhibitorische Nukleinsäure die DNA-Synthese oder -Amplifikation kompetitiv inhibieren kann und die Synthese- oder Amplifikations-Reaktion durch Erhöhen der Temperatur, um die kompetitive Inhibition durch den Inhibitor der Polymerasen zu reduzieren, initiiert wird, wobei somit ermöglicht wird, dass die Nukleinsäure-Synthese oder -Amplifikation stattfindet.

[0094] Nukleinsäure-Synthese-Verfahren gemäß diesem Aspekt der Erfindung können eine oder mehr Stufe/n umfassen. Zum Beispiel stellt die Erfindung ein Verfahren zum Synthetisieren eines Nukleinsäure-Moleküls bereit, umfassend (a) Mischen einer Nukleinsäure-Matrize mit einem oder mehr Primer/n und einer oder mehr inhibitorischen Nukleinsäure/n der vorliegenden Erfindung (welche gleich oder unterschiedlich sein können) und einem oder mehr Enzym/en mit Polymerase- oder reverse Transkriptase-Aktivität, um eine Mischung zu bilden; (b) Inkubieren der Mischung unter Bedingungen, die ausreichend sind, um die Nukleinsäure-Synthese zu inhibieren oder zu verhindern; und (c) Inkubieren der Mischung unter Bedingungen, die ausreichend sind, um ein erstes Nukleinsäure-Molekül zu der gesamten oder einem Teil der Matrize komplementär zu machen. Gemäß diesem Aspekt der Erfindung kann die Nukleinsäure-Matrize ein DNA-Molekül, wie zum Beispiel ein cDNA-Molekül oder -Bibliothek, oder ein RNA-Molekül, wie zum Beispiel ein mRNA-Molekül, oder Population an Molekülen sein. Bedingungen, die ausreichend sind, um die Synthese zu ermöglichen, wie zum Beispiel pH, Temperatur, Ionenstärke und Inkubationszeiten, können gemäß dem Fachmann bekannten Routine-Verfahren optimiert werden.

[0095] In Übereinstimmung mit der Erfindung können die Vorgabe- oder Matrize-Nukleinsäure-Moleküle oder -Bibliotheken aus Population an Nukleinsäure-Molekülen gebildet werden, die aus natürlichen Quellen, wie zum Beispiel einer Vielfalt an Zellen, Geweben, Organen oder Organismen, erhalten werden. Zellen, die als Quellen für Nukleinsäure-Moleküle verwendet werden können, können prokaryotisch (bakterielle Zellen, einschließlich solcher Zellen von Arten der Gattungen *Escherichia*, *Bacillus*, *Serratia*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Chlamydia*, *Neisseria*, *Treponema*, *Mycoplasma*, *Borrelia*, *Legionella*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Helicobacter*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Rhizobium* und *Streptomyces*) oder eukaryotisch (einschließlich Pilzen (insbesondere Hefen), Pflanzen, Protozoen und anderen Parasiten und Lebewesen, einschließlich Insekten, insbesondere *Drosophila* spp.-Zellen), Nematoden (insbesondere *Caenorhabditis elegans*-Zellen) und Säugetieren (insbesondere humaner Zellen)).

[0096] Nachdem die Ausgangs-Zellen, -Gewebe, -Organe oder andere -Proben erhalten werden, können Nukleinsäure-Moleküle (wie zum Beispiel DNA, RNA (z.B. mRNA- oder Poly-A⁺-RNA-)Moleküle) isoliert werden oder cDNA-Moleküle oder -Bibliotheken durch Methoden, die aus dem Stand der Technik gut bekannt sind, hieraus präpariert werden (siehe, z.B. Maniatis, T., et al., Cell 15: 687–701 (1978); Okayama, H., und Berg, P., Mol. Cell. Biol. 2: 161–170 (1982); Gubler, U., und Hoffman, B. J., Gene 25: 263–269 (1983)).

[0097] In der Anwendung eines bevorzugten Aspekts der Erfindung kann ein erstes Nukleinsäure-Molekül durch Mischen einer Nukleinsäure-Matrize synthetisiert werden, die wie oben beschrieben erhalten wird, welche vorzugsweise ein DNA-Molekül oder ein RNA-Molekül, wie zum Beispiel ein mRNA-Molekül oder ein Poly-A+-RNA-Molekül, ist, mit einem oder mehr der oben beschriebenen Enzyme mit Polymerase-Aktivität, zu welchen die inhibitorischen Nukleinsäuren oder -Zusammensetzungen der Erfindung zugegeben wurden, um eine Mischung zu bilden. Die Synthese eines ersten Nukleinsäure-Moleküls, das zu der gesamten oder einem Teil der Nukleinsäure-Matrize komplementär ist, wird vorzugsweise nach Erhöhen der Temperatur der Reaktion und somit Reduzieren der kompetitiven Inhibition der inhibitorischen Nukleinsäure der vorliegenden Erfindung erreicht, wobei die reverse Transkription (im Fall einer RNA-Matrize) und/oder Polymerisation des Vorgabe- oder Matrize-Nukleinsäure-Moleküls begünstigt wird. Solche Synthese wird vorzugsweise in Gegenwart von Nukleotiden (z.B. Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs), Didesoxyribonukleosidtriphosphat (ddNTPs) oder Derivaten davon) erreicht.

[0098] Natürlich werden andere Techniken der Nukleinsäure-Synthese, in welchen die inhibitorischen Nukleinsäuren, -Zusammensetzungen und Verfahren der Erfindung vorteilhaft verwendet werden können, für einen Durchschnittsfachmann leicht ersichtlich sein.

[0099] In anderen Aspekten der Erfindung können die inhibitorischen Nukleinsäuren und -Zusammensetzungen der Erfindung in Verfahren zum Amplifizieren oder Sequenzieren von Nukleinsäure-Molekülen verwendet werden. Nukleinsäure-Amplifikations-Verfahren gemäß diesem Aspekt der Erfindung können zusätzlich die Verwendung eines oder mehr Polypeptids/e mit reverse Transkriptase-Aktivität in Verfahren, die im Stand der Technik allgemein als einstufige (z.B. einstufige RT-PCR) oder zweistufige (z.B. RT-PCR) reverse Transkriptase-Amplifikations-Reaktionen bekannt sind, umfassen. Zur Amplifikation langer Nukleinsäure-Moleküle (z.B. größer als etwa 3–5 kb in der Länge) kann eine Kombination aus DNA-Polymerasen, wie in WO 98/06736 und WO 95/16028 beschrieben, verwendet werden.

[0100] Amplifikations-Verfahren gemäß diesem Aspekt der Erfindung können eine oder mehr Stufe/n umfassen. Zum Beispiel stellt die Erfindung ein Verfahren zum Amplifizieren eines Nukleinsäure-Moleküls bereit, umfassend (a) Mischen eines oder mehr Enzyms/e mit Polymerase-Aktivität mit den inhibitorischen Nukleinsäuren oder -Zusammensetzungen der Erfindung und einer oder mehr Nukleinsäure-Matrize/n; (b) Inkubieren der Mischung unter Bedingungen, die ausreichend sind, um die Nukleinsäure-Amplifikation zu inhibieren oder zu verhindern; und (c) Inkubieren der Mischung unter Bedingungen, die ausreichend sind, um es dem Enzym mit Polymerase-Aktivität zu ermöglichen, ein oder mehr Nukleinsäure-Molekül/e zu amplifizieren, das/die zu den gesamten oder einem Teil der Matrizen komplementär ist/sind. Die Erfindung stellt ebenfalls Nukleinsäure-Moleküle bereit, die durch solche Verfahren amplifiziert werden.

[0101] Allgemeine Verfahren zur Amplifikation und Analyse von Nukleinsäure-Molekülen oder -Fragmenten sind einem Durchschnittsfachmann gut bekannt (siehe z.B. U.S.-Patent Nr. 4,683,195; 4,683,202 und 4,800,159; Innis, M. A., et al., Hrsg., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, San Diego, Kalifornien: Academic Press, Inc. (1990); Griffin, H. G., und Grien, A. M., Hrsg., PCR Technology: Current Innovations, Boca Raton, Florida: CRC Press (1994)). Zum Beispiel beinhalten Amplifikations-Verfahren, welche in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, die PCR (U.S.-Patent Nr. 4,683,195 und 4,683,202), Strand-Ersetzungs-Amplifikation (SDA, „Strand Displacement Amplification“; U.S.-Patent Nr. 5,455,166; EP 0 684 315), Nukleinsäure-Sequenz-basierte Amplifikation (NASBA, „Nucleic Acid Sequenced-Based Amplification“; U.S.-Patent Nr. 5,409,818; EP 0 829 822).

[0102] Typischerweise umfassen diese Amplifikations-Verfahren: (a) Mischen eines oder mehr Enzyms/e mit Polymerase-Aktivität mit einer oder mehr inhibitorischen Nukleinsäure/n der vorliegenden Erfindung, um einen Komplex (Protein-Nukleinsäure) zu bilden; (b) Mischen der Nukleinsäure-Probe mit dem Komplex aus (a) in Gegenwart einer oder mehr Primer-Sequenz/en und (c) Amplifizieren der Nukleinsäure-Probe, um eine Sammlung an amplifizierten Nukleinsäure-Fragmenten, vorzugsweise durch PCR oder äquivalente automatisierte Amplifikations-Technik, zu erzeugen.

[0103] Nach der Amplifikation oder Synthese durch die Verfahren der vorliegenden Erfindung können die amplifizierten oder synthetisierten Nukleinsäure-Fragmente für weitere Verwendung oder Charakterisierung isoliert werden. Diese Stufe wird gewöhnlich durch Separierung der amplifizierten oder synthetisierten Nukleinsäure-Fragmente über die Größe oder durch jedes beliebige physikalische oder biochemische Mittel, einschließlich Gel-Elektrophorese, Kapillar-Elektrophorese, Chromatographie (einschließlich Größen- Affinitäts- und Immuno-Chromatographie), Dichte-Gradienten-Zentrifugation und Immuno-Adsorption, erreicht. Separierung der Nukleinsäure-Fragmente durch Gel-Elektrophorese wird besonders bevorzugt, da diese ein schnelles

und hochreproduzierbares Mittel zur sensitiven Separierung einer Vielzahl an Nukleinsäure-Fragmente bereitstellt und direkten, simultanen Vergleich der Fragmente in verschiedenen Proben der Nukleinsäuren gestattet. Man kann diesen Ansatz in einer anderen bevorzugten Ausführungsform ausdehnen, um diese Fragmente oder jedes beliebige Nukleinsäure-Fragment, das durch die Verfahren der Erfindung amplifiziert oder synthetisiert wurde, zu isolieren und zu charakterisieren. Somit ist die Erfindung ebenfalls auf isolierte Nukleinsäure-Moleküle gerichtet, die durch die Amplifikation- oder Synthese-Verfahren der Erfindung hergestellt werden.

[0104] In dieser Ausführungsform werden ein oder mehr der amplifizierten oder synthetisierten Nukleinsäure-Fragmente aus dem Gel, welches für die Identifizierung (siehe oben) verwendet wurde, gemäß Standard-Techniken, wie zum Beispiel Elektroelution oder physikalischem Ausschneiden, entnommen. Die isolierten einzigartigen Nukleinsäure-Fragmente können danach in Standard-Vektoren, einschließlich Expressions-Vektoren, die für die Transfektion oder Transformation einer Vielfalt an prokaryontischen (bakteriellen) oder eukaryontischen (Hefe-, Pflanzen- oder Lebewesen-, einschließlich humaner und anderer Säugetier-)Zellen geeignet sind, eingeführt werden. Alternativ können Nukleinsäure-Moleküle, die durch die Verfahren der Erfindung hergestellt werden, zum Beispiel durch Sequenzierung (z.B., Bestimmen der Nukleotid-Sequenz der Nukleinsäure-Fragmente) durch Verfahren, die unten beschrieben werden, und andere, die Stand der Technik sind (siehe z.B. U.S.-Patent Nr. 4,962,022 und 5,498,523, welche auf DNA-Sequenzierungs-Verfahren gerichtet sind) weiter charakterisiert werden.

[0105] Nukleinsäure-Sequenzierungs-Verfahren gemäß der Erfindung können eine oder mehr Stufe/n umfassen. Zum Beispiel stellt die Erfindung ein Verfahren zur Sequenzierung eines Nukleinsäure-Moleküls bereit, umfassend (a) Mischen eines Enzyms mit Polymerase-Aktivität mit einer oder mehr inhibitorischen Nukleinsäure/n der vorliegenden Erfindung, einem zu sequenzierenden Nukleinsäure-Molekül, einem oder mehr Primer/n, einem oder mehr Nukleotid/en und einem oder mehr Terminations-Mittel/n (wie zum Beispiel einem Didesoxynukleotid), um eine Mischung zu bilden; (b) Inkubieren der Mischung unter Bedingungen, die ausreichend sind, um die Nukleinsäure-Sequenzierung oder -Synthese zu inhibieren oder zu verhindern; (c) Inkubieren der Mischung unter Bedingungen, die ausreichend sind, um eine Population an Molekülen zu synthetisieren, die zu dem gesamten oder einem Teil des zu sequenzierenden Moleküls komplementär sind; und (d) Separieren der Population, um die Nukleotid-Sequenz des gesamten oder eines Teils des zu sequenzierenden Moleküls zu bestimmen.

[0106] Nukleinsäure-Sequenzierungs-Techniken, welche die vorliegenden inhibitorischen Moleküle oder -Zusammensetzungen einsetzen können, beinhalten Didesoxy-Sequenzierungs-Verfahren, wie zum Beispiel solche Verfahren, die in U.S.-Patent Nr. 4,962,022 und 5,498,428 offenbart werden.

Vektoren und Wirtszellen

[0107] Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls Vektoren, welche ein inhibitorisches Nukleinsäure-Molekül der vorliegenden Erfindung umfassen. Weiter betrifft die Erfindung Wirtszellen, welche die inhibitorischen Nukleinsäuren der Erfindung enthalten, und vorzugsweise Wirtszellen, die rekombinante Vektoren umfassen, die solche Nukleinsäuren enthalten, und Verfahren zur Herstellung der Nukleinsäuren der Erfindung unter Verwendung dieser Vektoren und Wirtszellen. Die Nukleinsäure-Synthese- und -Amplifikations-Produkte, die durch die Verfahren der Erfindung hergestellt werden, können ebenfalls in Vektoren und Wirtszellen in Übereinstimmung mit der Erfindung kloniert werden, um die Herstellung solcher Nukleinsäure-Moleküle oder Proteine, die durch solche Nukleinsäure-Moleküle kodiert werden, zu ermöglichen.

[0108] Die Vektoren werden vorzugsweise mindestens einen selektierbaren Marker beinhalten. Solche Marker beinhalten, ohne darauf beschränkt zu sein, Antibiotikum-Resistenz-Gene, wie zum Beispiel Tetracyclin- oder Ampicillin-Resistenz-Gene, zum Kultivieren in *E. coli* und anderen Bakterien.

[0109] Repräsentative Beispiele geeigneter Wirtszellen beinhalten, ohne darauf beschränkt zu sein, bakterielle Zellen, wie zum Beispiel *E. coli*, *Streptomyces* spp., *Erwinia* spp., *Klebsiella* spp. und *Salmonella typhimurium*. *E. coli* ist als eine Wirtszelle bevorzugt und besonders bevorzugt sind *E. coli*-Stämme DH10B und Stbl2, welche kommerziell erhältlich sind (Life Technologies, Inc., Rockville, Maryland).

Nukleinsäure-Herstellung

[0110] Wie oben erwähnt, sind die Verfahren der vorliegenden Erfindung für die Herstellung jeder beliebigen Nukleinsäure oder jedes beliebigen Proteins, das durch solches Nukleinsäure-Molekül kodiert wird, über die Einführung der oben beschriebenen Nukleinsäure-Moleküle oder Vektoren in eine Wirtszelle und Isolierung

des Nukleinsäure-Moleküls aus der Wirtszelle, oder Isolierung des Proteins aus der Wirtszelle, die das Nukleinsäure-Molekül exprimiert, geeignet. Einführung der Nukleinsäure-Moleküle oder Vektoren in eine Wirtszelle, um eine transformierte Wirtszelle herzustellen, kann durch Calciumphosphat-Transfektion, Calciumchlorid-Transformation, DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion, kationische Lipid-vermittelte Transfektion, Elektroporation, Transduktion, Infektion oder andere Verfahren bewirkt werden. Solche Verfahren werden in vielen Standard-Labor-Handbüchern, wie zum Beispiel Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986), beschrieben. Vorzugsweise werden für solche Transformations-Reaktionen chemisch kompetente oder elektrokompetente Zellen verwendet. Nachdem transformierte Wirtszellen erhalten wurden, können die Zellen unter allen möglich physiologisch kompatiblen pH- und Temperatur-Bedingungen in jedem beliebigen geeigneten Nährstoff-Medium, das vergleichbare Quellen für Kohlenstoff, Stickstoff und essentielle Mineralien, die das Wirtszell-Wachstum unterstützen, kultiviert werden. Zum Beispiel umfassen bestimmte Expressions-Vektoren regulatorische Regionen, welche Zellwachstum bei bestimmten Temperaturen oder die Zugabe bestimmter Chemikalien oder Induktions-Mittel für das Zellwachstum erfordern. Geeignete Kultivierungsmedien und -bedingungen für die oben beschriebenen Wirtszellen und Vektoren sind aus dem Stand der Technik gut bekannt. Nach deren Herstellung in den Wirtszellen kann die interessierende Nukleinsäure oder das interessierende Protein durch verschiedene Techniken isoliert werden. Um die interessierende Nukleinsäure oder das interessierende Protein aus den Wirtszellen freizusetzen, werden die Zellen vorzugsweise lysiert oder zerbrochen. Diese Lyse kann durch In-Kontakt-Bringen der Zellen mit einer hypotonischen Lösung, durch Behandlung mit einem Zellwand-spaltenden Enzym, wie zum Beispiel Lysozym, durch Ultraschall, durch Hochdruck-Behandlung oder durch eine Kombination der oben beschriebenen Verfahren erreicht werden. Andere Verfahren der bakteriellen Zell-Spaltung und -Lyse, die einem Durchschnittsfachmann bekannt sind, können ebenfalls verwendet werden.

[0111] Nach der Spaltung kann die Nukleinsäure oder die Proteine aus der zellulären Debris durch jede beliebige Technik separiert werden, die für die Separierung von Partikeln in komplexen Mischungen geeignet ist. Die Nukleinsäuren oder Proteine können danach durch gut bekannte Isolierungs-Techniken aufgereinigt werden. Geeignete Techniken zur Aufreinigung beinhalten, ohne darauf beschränkt zu sein, Ammoniumsulfat- oder Ethanol-Präzipitation, Säure-Extraktion, Elektrophorese, Immunoabsorption, CsCl-Zentrifugation, Anionen- oder Kationen-Austausch-Chromatographie, Phosphocellulose-Chromatographie, hydrophobe Interaktions-Chromatographie, Affinitäts-Chromatographie, Immunoaffinitäts-Chromatographie, Größenausschluss-Chromatographie, Flüssig-Chromatographie (LC, „liquid chromatography“), Hochleistungs-LC (HPLC, „high performance LC“), Schnell-Leistungs-LC (FPLC, „fast performance LC“), Hydroxylapatit-Chromatographie und Lectin-Chromatographie.

Kits

[0112] Die vorliegende Erfindung stellt ebenfalls Kits zur Verwendung in der Synthese, Amplifikation oder Sequenzierung von Nukleinsäure-Molekülen bereit. Kits gemäß diesem Aspekt der Erfindung können einen oder mehr Behälter, wie zum Beispiel Fläschchen, Röhrchen, Ampullen, Flaschen und Ähnliche, umfassen, welche/r eine oder mehr der inhibitorischen Nukleinsäuren und/oder -Zusammensetzungen der Erfindung umfassen können.

[0113] Die Kits der Erfindung können ein oder mehr aus den folgenden Komponenten umfassen: (i) eine oder mehr Nukleinsäure/n oder -Zusammensetzung/en der Erfindung; (ii) eine oder mehr Polymerase/n und/oder reverse Transkriptase/n; (iii) einen oder mehr geeignete/n Puffer oder puffernde/s Salze; (iv) ein oder mehr Nukleotid/e und (v) ein oder mehr Primer.

[0114] Es wird für einen Durchschnittsfachmann des relevanten Standards der Technik leicht offensichtlich, dass andere geeignete Modifikationen und Anpassungen an die Verfahren und Anwendungen, die hierin beschrieben werden, offensichtlich sind und, ohne sich vom Umfang der Erfindung oder jeder beliebigen Ausführungsform davon zu entfernen, durchgeführt werden können. Nachdem die vorliegende Erfindung jetzt im Detail beschrieben wurde, wird diese besser durch den Verweis auf die folgenden Beispiele klarer, welche hierin nur zu Zwecken der Veranschaulichung beinhaltet sind und die die Erfindung nicht beschränken sollen.

Beispiel 1

Nukleinsäure-Inhibitoren

[0115] Nukleinsäure-Inhibitoren wurden durch Life Technologies, Inc. synthetisiert und wurden über HPLC oder PAGE aufgereinigt.

Nukleinsäure-Inhibitor A (34-mer)

5' CCCAATATGGACCGGTGCGAAAGACCGGTCCATAT 3'

(SEQ ID NO:1)

Nukleinsäure-Inhibitor B (55-mer)

5' CCATGCAGGTAGCCGATGAACTGGTTCGAAAGACCAGTTCAT

CGGCTACCTGCATG 3' (SEQ ID NO:2)

[0116] Bei der Umgebungstemperatur bilden die oberen Sequenzen eine Haarnadelschleifen-ähnliche Struktur (Antao und Tinoco, 1992, siehe oben), siehe Strukturen unten.

[0117] In einigen Ausführungsformen kann der 3'-Terminus des Inhibitors A am 3'-Terminus mit einem Dideoxythymintriphosphat unter Verwendung einer Klenow-Fragment-Mutante (F762Y) der DNA-Polymerase I (Escherichia coli) oder der T7-DNA-Polymerase (Tabor, S., und Richardson, C. C., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 6339–6343) verdeckt („capped“) sein. Der 3'-OH-Terminus des Oligonukleotids wurde mit ddTTP durch die Polymerase bei 20 µM ddTTP in Gegenwart von 2 mM Mg²⁺ in 50 mM Tris pH 7,5-Puffer bei 37°C für 30 min verlängert. Nach der Verlängerung wurde die Probe in einem 100°C-Wasserbad für 3 min platziert, um das Protein zu denaturieren. Nach der Erwärmung wurde die Oligonukleotid-Probe langsam auf die Umgebungstemperatur (2–3 h) gekühlt, um die Bildung der Haarnadelschleifen-Struktur zu ermöglichen.

Nukleinsäure-Inhibitor A als Haarnadelschleifen-Struktur:

A
A GACCGGTCCATAT
A CTGGCCAGGTATAACCC 5' (SEQ ID NO:1)
G

Nukleinsäure-Inhibitor B als Haarnadelschleifen-Struktur:

A
A GACCAGTTCATCGGCTACCTGCATG
A CTGGTCAAGTAGCCGATGGACGTACC 5'
G (SEQ ID NO:2)

[0118] In einigen Ausführungsformen kann der Nukleinsäure-Inhibitor B am 3'-Terminus durch ddGTP, wie oben beschrieben, verdeckt („capped“) sein.

[0119] Diese Erfindung wurde unter Verwendung der Tne-DNA-Polymerase getestet – einer thermostabilen DNA-Polymerase, die bei niedriger Temperatur Desoxynukleotide in den wachsenden Strang signifikant wirksam einbaut, etwa 50-fach wirksamer als Taq-DNA-Polymerase bei 37°C. Die verwendete Tne war vom Wild-Typ, mit der Ausnahme, dass sie in der 5'-nach-3'-Exonuklease-Aktivität aufgrund der D137A-Mutation (siehe WO 98/09451) wesentlich reduziert wurde.

Beispiel 2

Inhibition der Polymerase mit dem Inhibitor

[0120] Der Zeitverlauf der Aktivität der Tne-DNA-Polymerase wurde unter Verwendung eines 34/60-meren Primer/Matrize-Substrats bei 3 unterschiedlichen Temperaturen qualitativ bestimmt. [Fig. 1](#) stellt die Ergebnisse dieser Experimente dar. Bei jeder Temperatur wurde die Polymerase-Aktivität in Abwesenheit (Feld A) und Gegenwart (Feld B) des Inhibitors A gemessen. Aliquots der Reaktions-Mischung wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und auf einem Agarose-Gel separiert. Die fünf Spuren jedes Feldes sind, von links nach rechts, die Zeitpunkte bei 15 s, 30 s, 1 min, 2 min und 5 min, die verstrichen sind, bevor die Reaktion gestoppt wurde. P und C zeigen die Primer-Position bzw. die Kontroll-Spur.

[0121] Wie in [Fig. 1](#) beobachtet werden kann, ist die Wirksamkeit der Inhibition der Polymerase-Reaktion, die durch Tne katalysiert wird, signifikant reduziert, wenn die Temperatur erhöht wird.

Beispiel 3

Amplifikation einer Target-DNA-Sequenz aus der Plasmid-DNA-Quelle

[0122] Eine Target-DNA-Sequenz von 2,7 kb, die vom pUC19-Plasmid geliefert wird, wurde unter Verwendung von 5 unterschiedlichen Verdünnungen der Matrize amplifiziert. Das Target wurde durch die Tne-DNA-Polymerase amplifiziert. Zwei unterschiedliche Konzentrationen der Tne-Polymerase (85 nM (z.B. 1 Einheit) und 42,5 nM (z.B. 0,5 Einheiten)) und die mit der Inhibitor-Nukleinsäure komplexierte (unter Verwendung eines 150-fachen Überschusses an Inhibitor B gegenüber der Polymerase) Tne wurden bei jeder Amplifikations-Bedingung verwendet. Die Ergebnisse werden in [Fig. 2](#) gezeigt. Die Konzentration der Target-DNA in Spuren 1, 2, 3, 4 und 5 zeigen 100 pg, 20 pg, 2 pg, 0,2 pg bzw. 0,02 pg.

[0123] Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Sensitivität von Tne durch die Zugabe des Inhibitors stark verbessert wurde und die relative Reinheit des Target-Moleküls immens verstärkt wurde.

Beispiel 4

Amplifikation einer Target-DNA-Sequenz aus genomischer DNA-Quelle

[0124] Target-DNA-Sequenzen von 1 kb, 3 kb und 5 kb wurden durch die Tne(85 nM (z.B. 1 Einheit))- und Taq(1 Einheit)-DNA-Polymerasen amplifiziert, wie in den Feldern, A, B bzw. C von [Fig. 3](#) dargestellt wird. Die vier Spuren jedes Feldes, als a, b, c bzw. d dargestellt, sind Tne (+ 125-facher Überschuss Inhibitor A (mit ddT verdeckt)), Tne (+ 50-facher Überschuss Inhibitor A (mit ddT verdeckt)), Tne (kein Inhibitor) bzw. Taq (kein Inhibitor).

[0125] Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Sensitivität von Tne durch die Zugabe des Inhibitors stark verbessert wurde und die relative Reinheit des Target-Moleküls für jede Target-Bedingung immens verbessert wurde.

Beispiel 5

Amplifikation einer Target-DNA-Sequenz von 5 und 15 kb durch die Tne-DNA-Polymerase

[0126] Die fünf Felder A, B, C, D und E von [Fig. 4](#) stellen die Reaktionsbedingungen dar: Kontroll-Tne (kein Inhibitor), Tne (+ 50-facher Überschuss Inhibitor B), Tne (+ 150-facher Überschuss Inhibitor B), Tne (+ 300-facher Überschuss Inhibitor B) bzw. Tne (+ 750-facher Überschuss Inhibitor B). Die zwei Spuren in jedem Feld, als A und B dargestellt, stehen für die Amplifikation der Target-Größe von 5 und 15 kb. Die Endkonzentration der Tne-DNA-Polymerase in jeder Reaktion war 8,5 nM (z.B. 0,1 Einheiten).

[0127] Wie in [Fig. 4](#) beobachtet werden kann, wurde die Sensitivität von Tne durch die Zugabe dieses Inhibitors stark verbessert und die relative Reinheit des Target-Moleküls wurde immens verbessert, nachdem die Konzentration des Inhibitors optimiert wurde. Wie in den Feldern D und E gezeigt, kann das Produkt von 15 kb nur durch die Tne-DNA-Polymerase unter Taq-PCR-Bedingungen (Perkin-Elmer) in Gegenwart der Inhibitor-Nukleinsäure amplifiziert werden.

Beispiel 6

Amplifikation einer Target-DNA-Sequenz von 3 kb (humane genomische Quelle) durch 1 Einheit Taq

DNA-Polymerase

[0128] Die drei Felder A, B und C von [Fig. 5](#) stellen die Reaktionsbedingungen dar. Für A und B wurden die gleichen Primer-Sequenzen verwendet. In A wurde die PCR-Mischung bei 94°C für 1 min inkubiert und auf Eis gestellt, um Fehl-Primen zu erzwingen. Alle PCR-Reaktionen wurden für 30 min auf 25°C gestellt, um nicht-spezifische DNA-Synthese zu erhöhen. Jede Bedingung: Spur A (Taq-Kontrolle), B (Taq + 126 nM Inhibitor), C (Taq + 32 nM Inhibitor) und D (Taq + 64 nM Inhibitor).

[0129] Die Ergebnisse zeigen, dass die Spezifität von Taq durch die Zugabe des Inhibitors stark verbessert wurde, wobei in jedem Fall eine signifikante Reduktion der nicht-spezifischen DNA-Synthese und eine erhöhte Menge des Target-Sequenz-Produkts hergestellt wurde.

Beispiel 7

Inhibition von RT unter Verwendung der Oligonukleotide der vorliegenden Erfindung

[0130] Die DNA-Polymerase-Aktivität der ThermoScript™-I-RNase-Mangel-Mutante-reverse Transkriptase (RT, „ThermoScript™ I RNase deficient mutant reverse transcriptase“) (erhältlich von Life Technologies, Inc.) wurde bei der Umgebungstemperatur, 37°C und 55°C in Gegenwart und Abwesenheit der Oligonukleotid-Inhibitor-Moleküle bestimmt. Die Sequenzen und Sekundär-Strukturen der Oligonukleotid-Inhibitoren werden unten gezeigt. Die Polymerase-Aktivität von RT wurde unter „Fließgleichgewicht“ („steady state“-Kinetik-Bedingungen unter Verwendung von olig(dG)₁₅/polyrC als Primer/Matrize-Substrat bestimmt. Dieser Assay wurde durch Polesky et al. (1990) beschrieben und wurde mit kleiner Modifikation verwendet.

Oligonukleotid-Inhibitoren

[0131] Alle Nukleinsäure-Inhibitoren, die in unseren Assays verwendet wurden, wurden über HPLC aufgereinigt und waren am 3'-Terminus mit Phosphat (PO₄) synthetisch verdeckt („capped“). Die Fehl-Paarungen am doppel-strängigen Teil der Moleküle wurden eingeführt, um die Schmelztemperatur des Doppel-Stranges zu reduzieren, ohne die Länge der Nukleinsäure-Inhibitoren zu beeinflussen. Der Nukleinsäure-Inhibitor H ist eine Kontroll-Oligonukleinsäure, die unter unseren Experimentalbedingungen keine doppel-strängige Struktur bildet, und sie wird verwendet, um das Inhibitions-Niveau durch die RNA-Sequenz zu bestimmen.

Nukleinsäure-Inhibitor C (synthetisiert durch Synthetik Genetics)

Ein 17/27-merer doppel-strängiger DNA/DNA-Nukleinsäure-Inhibitor

5' GGTATAGTAATAATATA 3'
 3' CCATATCATTATTATATATGTAATTAA 5'
 (SEQ ID NO:3))

Nukleinsäure-Inhibitor D (synthetisiert durch Life Technologies, Inc.)

[0132] Eine 50-mere DNA/RNA-Hybrid-Nukleinsäure, die RNA-Basen sind unterstrichen.

5' AAUUA AUGUAUAUAUAUAUACUAUACCGAAGGGTATAGTAA
 TAATATATA 3'
 (SEQ ID NO:4)

Haarnadelschleifen-Struktur des Nukleinsäure-Inhibitors D

G
 A GGTATAGTAATAATATATA 3'
 A CCAUAUCAUAUAUAUAUAUGUAUAUA 5'
 G (SEQ ID NO:4)

Nukleinsäure-Inhibitor E (synthetisiert durch Life Technologies, Inc.)

[0133] Eine 50-mere DNA/RNA-Hybrid-Nukleinsäure, die RNA-Basen sind einfach unterstrichen und die zwei Fehl-Paarungs-Positionen sind auf dem DNA-Teil der entsprechenden Haarnadelschleifen-Struktur doppelt unterstrichen.

5' AAUUA AUGUAUAUAUUAUUAUACUAUACCGAAGGGTATAATAA
TAGTATATA 3' (SEQ ID NO:5)

Haarnadelschleifen-Struktur des Nukleinsäure-Inhibitors E

G
A GGTATAATATAATAGTATATA^{3'}
A CCAUAUCAUUAUUAUAUAUGUAAUUA^{5'}
G (SEQ ID NO:5)

Nukleinsäure-Inhibitor F (synthetisiert durch Life Technologies, Inc.)

[0134] Eine 50-mere DNA/RNA-Hybrid-Nukleinsäure, die RNA-Basen sind einfach unterstrichen und die drei Fehl-Paarungs-Positionen sind auf dem DNA-Teil der entsprechenden Haarnadelschleifen-Struktur doppelt unterstrichen.

5' AAUUA AUGUAUAUAUUAUUA CUUAUACCGAAGGGTATAATGA
GAGTATATA 3' (SEQ ID NO:6)

Haarnadelschleifen-Struktur des Nukleinsäure-Inhibitors F

G
A GGTATAATGAGAGGTATATA^{3'}
A CCAUAUCAUUAUUAUAUAUGUAAUUAA^{5'}
G (SEQ ID NO:6)

Nukleinsäure-Inhibitor G (synthetisiert durch Life Technologies, Inc.)

[0135] Eine 50-mere DNA/RNA-Hybrid-Nukleinsäure, die RNA-Basen sind einfach unterstrichen und die vier Fehl-Paarungs-Positionen sind auf dem DNA-Teil der entsprechenden Haarnadelschleifen-Struktur doppelt unterstrichen.

5' AAUUA AUGUAUAUAUUAUUA CUUAUACCGAAGGGTATAATGA
GAGTATATA 3' (SEQ ID NO:7)

Haarnadelschleifen-Struktur des Nukleinsäure-Inhibitors G

G
A GGTATAATGAGAGTATATA^{3'}
A CCAUAUCAUUAUUAUAUGUAAUUA^{5'}
G (SEQ ID NO:7)

Nukleinsäure-Inhibitor H (synthetisiert durch Life Technologies, Inc.)

[0136] Eine 50-mere DNA/RNA-Hybrid-Nukleinsäure, die RNA-Basen sind unterstrichen.

5' AAUUA AUGUAUAUAUUAUUA CUUAUACCGAAAATATATAATG
ATGATATAG^{3'} (SEQ ID NO:8)

[0137] Die relativen Polymerase-Aktivitäten von ThermoScript™ I wurden in Abwesenheit und Gegenwart von

Nukleinsäure-Inhibitoren bei der Umgebungstemperatur (~22°C), 37°C und 55°C bestimmt. Die Polymerisations-Reaktion wurde durch Zugabe von RT oder RT/Inhibitor (5 µl) zu einer Lösung aus Primer/Matrize in Gegenwart von dGTP (versetzt mit dGT³²P) und MgCl₂, Endreaktionsvolumen von 50 µl, initiiert. Die Mischung wurde bei der Reaktionstemperatur inkubiert und die Proben (5 µl) wurden bei Intervallen von 1 min (22°C) und 15 s (37°C und 55°C) entnommen und wurden zu 50 µl 25 mM EDTA zugegeben. Ein Teil der gestoppten Lösung wurde auf DE-81-Filter aufgebracht. Nach Waschungen zum Entfernen des nicht-eingebauten dGTP wurden die Filter in Szintillations-Fläschchen, enthaltend EconoFluor-2 (Packard), ausgezählt. Die scheinbare Rate der Reaktion wurde aus dem Raten-Plot (gegen das Zeitintervall aufgetragen) abgeleitet. Die Reaktions-Konzentration von oligo(dG)₁₅/polyrC betrug 800 nM Primer, dGTP betrug 100 µM und MgCl₂ und KCl betragen 10 mM bzw. 50 mM. Für jede Reaktionsbedingung wurde die Konzentration der reversen Transkriptase bei 12 nM beibehalten, während die Konzentration jedes Oligonukleotid-Inhibitors 540 nM betrug.

[0138] Die relative Aktivität der Polymerisations-Reaktion, die durch ThermoScript™ bei der Umgebungstemperatur, 37°C und 55°C in Gegenwart und Abwesenheit der Inhibitoren katalysiert wurde, wird in [Fig. 6A](#) und [Fig. 6B](#) gezeigt. Die Aktivitäten in Abwesenheit von Oligonukleotid-Inhibitoren (freie ThermoScript™ I) wurden für Messungen bei jeder Temperatur auf 1 normiert. Die RT-Aktivität in Gegenwart eines Inhibitors wurde mit der Aktivität von ThermoScript™ bei jeder Temperatur korreliert und die relativen normierten Aktivitäten sind als ein Balkendiagramm dargestellt und werden in [Fig. 6A](#) und [Fig. 6B](#) gezeigt. Für jeden Reaktionsbedingungs-Satz zeigen die drei Balken, von links nach rechts, die Reaktionen, die bei der Umgebungstemperatur, 37°C bzw. 55°C durchgeführt wurden. TS, TS-D, TS-E und TS-H in [Fig. 6A](#) zeigen die Polymerase-Reaktion, die durch ThermoScript™ I, ThermoScript™ I-Nukleinsäure-Inhibitor-D-Komplex, ThermoScript™ I-Nukleinsäure-Inhibitor-E-Komplex bzw. ThermoScript™ I-Nukleinsäure-Inhibitor-H-Komplex initiiert wurden. Die Wirksamkeit der Inhibition der RT-Aktivität ist von der Temperatur abhängig, was nahe legt, dass das Inhibitions-Niveau von RT durch die Nukleinsäure-Inhibitoren von der Schmelztemperatur der Nukleinsäure abhängig ist.

Nukleinsäure-Inhibitor D

[0139] Unter den oben beschriebenen experimentellen Bedingungen inhibierte das Komplexieren von ThermoScript™ I mit etwa 50-fachem Überschuss dieser Nukleinsäure vor dem Initiieren der Polymerisations-Reaktion die RT-Aktivität um etwa 85–90% bei jeder der Reaktionstemperaturen. Die relative Ähnlichkeit des Inhibitions-Niveaus ist für die Stabilität der Haarnadelschleifen-Struktur dieses Nukleinsäure-Inhibitors in dem Temperaturbereich, der für die RT-Aktivität untersucht wurde, indikativ.

Nukleinsäure-Inhibitor E

[0140] Unter den experimentellen Bedingungen inhibierte das Komplexieren von ThermoScript™ I mit etwa 50-fachem Überschuss dieser Nukleinsäure vor dem Initiieren der Polymerisations-Reaktion die RT-Aktivität um etwa 90% bei der Umgebungstemperatur und 37°C, aber das Inhibitions-Niveau betrug bei 55°C 45%. Die signifikante Reduktion in dem Inhibitions-Niveau bei 55°C legt nahe, dass die Haarnadelschleifen-Struktur durch die Einführung der zwei Fehl-Paarungen destabilisiert wurde. Dieses Ergebnis legt nahe, dass „Hot-Start“ der Polymerase-Reaktion, die durch die reversen Transkriptasen katalysiert wird, durch die Verwendung eines Nukleinsäure-Inhibitors, der bei der Umgebungstemperatur Doppel-Stränge bildet, aber bei der gewünschten Polymerisations-Temperatur denaturiert wird, erhöht werden kann.

Nukleinsäure-Inhibitor H

[0141] Unter den experimentellen Bedingungen inhibierte das Komplexieren von ThermoScript™ I mit etwa 50-fachem Überschuss dieser Nukleinsäure vor der Initiierung der Polymerisations-Reaktion die RT-Aktivität um etwa 50% bei der Umgebungstemperatur. Das Inhibitions-Niveau war bei 37°C und 55°C innerhalb unseres experimentellen Fehlers vernachlässigbar. Dieses Ergebnis legt nahe, dass bei der Umgebungstemperatur ein Hintergrund-Inhibitions-Niveau existiert, das nicht von der Primer/Matrize-Substrat-Kompetition stammt. Dagegen war das Inhibitions-Niveau bei der Zugabe des Inhibitors H unter unseren experimentellen Bedingungen minimal bei 37°C und 55°C.

[0142] Die relativen Polymerase-Aktivitäten von ThermoScript™ I in Abwesenheit und Gegenwart der oben beschriebenen verbleibenden Nukleinsäure-Inhibitoren werden in [Fig. 6B](#) gezeigt. Für jeden Reaktionsbedingungs-Satz zeigen die drei Balken, von links nach rechts, die Reaktionen, die bei der Umgebungstemperatur, 37°C bzw. 55°C durchgeführt wurden. TS, TS-C, TS-H, TS-E, TS-F und TS-G zeigen die Polymerase-Reaktion, die durch ThermoScript™ I, ThermoScript™ I-Nukleinsäure-Inhibitor-C-Komplex, ThermoScript™ I-Nukleinsäure-Inhibitor-H-Komplex, ThermoScript™ I-Nukleinsäure-Inhibitor-E-Komplex, ThermoScript™ I-Nuklein-

säure-Inhibitor-F-Komplex bzw. ThermoScript™ I-Nukleinsäure-Inhibitor-G-Komplex, initiiert wurde.

Nukleinsäure-Inhibitor C

[0143] Unter den experimentellen Bedingungen inhibierte das Komplexieren von ThermoScript™ I mit etwa 50-fachem Überschuss dieser Nukleinsäure (DNA/DNA) vor der Initiierung der Polymerase die RT-Aktivität um etwa 70% bei jeder der Reaktionstemperaturen. Die relative Ähnlichkeit des Inhibitions-Niveaus ist für die Stabilität der doppel-strängigen Struktur dieser Nukleinsäure-Sequenz in dem Temperaturbereich, in welchem die RT-Aktivität untersucht wurde, indikativ.

Nukleinsäure-Inhibitor H

[0144] Unter den experimentellen Bedingungen inhibierte das Komplexieren von ThermoScript™ I mit etwa 50-fachem Überschuss dieser Nukleinsäure vor der Initiierung der Polymerisations-Reaktion die RT-Aktivität um etwa 40% bei der Umgebungstemperatur. Das Inhibitions-Niveau war innerhalb unseres experimentellen Fehlers bei 37°C und 55°C vernachlässigbar.

Nukleinsäure-Inhibitor E

[0145] Unter den experimentellen Bedingungen inhibierte das Komplexieren von ThermoScript™ I mit etwa 50-fachem Überschuss dieser Nukleinsäure vor der Initiierung der Polymerisations-Reaktion die RT-Aktivität um mehr als 90% bei der Umgebungstemperatur und 37°C, aber das Inhibitions-Niveau betrug bei 55°C 60%.

Nukleinsäure-Inhibitor F

[0146] Unter den experimentellen Bedingungen inhibierte das Komplexieren von ThermoScript™ I mit etwa 50-fachem Überschuss dieser Nukleinsäure vor der Initiierung der Polymerisations-Reaktion die RT-Aktivität um etwa 80% bei der Umgebungstemperatur, 65% bei 37°C und 40% bei 55°C. Die Abnahme des Inhibitions-Niveaus in Korrelation zum Anstieg der Reaktionstemperatur ist für die Destabilisierung der Haarnadel-schleifen-Struktur, die aufgrund der drei Fehl-Paarungen auftritt, indikativ.

Nukleinsäure-Inhibitor G

[0147] Unter den experimentellen Bedingungen inhibierte das Komplexieren von ThermoScript™ I mit etwa 50-fachem Überschuss dieser Nukleinsäure vor der Initiierung der Polymerisations-Reaktion die RT-Aktivität um etwa 80% bei der Umgebungstemperatur, 55% bei 37°C und 30% bei 55°C. Die Abnahme des Inhibitions-Niveaus in Korrelation zum Anstieg der Reaktionstemperatur ist für die Destabilisierung der Haarnadel-schleifen-Struktur, die aufgrund der drei Fehl-Paarungen auftritt, indikativ.

Beispiel 8

Inhibition der reverse Transkriptase Aktivität innerhalb einer Zelle

[0148] Die Oligonukleotide der vorliegenden Erfindung können zum Inhibieren der Aktivität eines reverse Transkriptase-Enzyms innerhalb einer Zelle verwendet werden. Die Oligonukleotide zur Verwendung innerhalb einer Zelle können optional so modifiziert werden, dass sie gegenüber einem oder mehr Nuklease-Enzym/en, das/die in einer Zelle vorliegen kann/können, resistent werden. Zum Beispiel kann ein Derivat des Nukleinsäure-Inhibitors mit einer oder mehr der folgenden Modifikationen synthetisiert werden: 1) eine oder mehr der Ribose-Gruppen auf dem RNA-Teil des Oligonukleotids kann alkyliert, zum Beispiel methyliert, sein, vorzugsweise am 2'-OH, um ein 2'-O-Methyl herzustellen; 2) eine oder mehr der Internukleotid-Verknüpfungen des Oligonukleotids, zum Beispiel in dem DNA-Teil der Nukleinsäure, können eine modifizierte Verknüpfung, zum Beispiel eine Phosphorthioat-Verknüpfung, enthalten; 3) der 3'-Terminus des Oligonukleotids kann so verdeckt sein, dass er nicht verlängerbar ist, zum Beispiel, mit einem Phosphat, Phosphorthioat oder einem Didesoxynukleotid oder anderen Modifikationen des 3'-Hydroxyls, um ihn nicht verlängerbar zu machen. Andere Modifikationen, die das Resistenz-Niveau gegenüber zellulärer RNase-Aktivität erhöhen und/oder die Wirksamkeit des DNA-Abbaus durch andere zelluläre Faktoren reduzieren, sind dem Fachmann bekannt und können in die Konstruktion der Oligonukleotide der vorliegenden Erfindung eingebaut werden. Zusätzlich zum Resistent-Machen der Oligonukleotide gegenüber einem oder mehr zellulären Abbau-Faktor/en reduziert Phosphorthioat die Möglichkeit homologer Rekombination in das Wirts-Chromosom, sollte ein gegebener Inhibitor eine Region enthalten, die zu einer Region auf dem Wirts-Chromosom homolog ist.

[0149] Oligonukleotide können untersucht werden, um zu bestimmen, ob sie eine inhibitorische Wirkung auf die reverse Transkriptase-Aktivität in einer Zelle aufweisen. Mit den Oligonukleotiden der Erfindung zu behandelnde Zellen, zum Beispiel NIH3T3-Zellen, können mit der Nukleinsäure (Life Technologies, Inc.) unter Verwendung jedes beliebigen, dem Fachmann bekannten Verfahrens transfiziert werden. In einigen bevorzugten Ausführungsformen können die Oligonukleotide der Erfindung unter Verwendung Lipid-vermittelter Transfektion (siehe zum Beispiel U.S.-Patent Nr. 5,334,761; 5,674,908; 5,627,159; 5,736,392; 5,279,833 und die veröffentlichte internationale Anmeldung WO 94/27345, von welchen alle hier ausdrücklich durch Bezugnahme aufgenommen werden) eingeführt werden.

[0150] Nach der Transfektion der Zellen kann ein die reverse Transkriptase (zum Beispiel Moloney-Maus-Leukämie-V, M-MLV) exprimierendes Virus, zugegeben werden, so dass die Zellen mit dem Virus wirksam infiziert werden und eine Quelle für reverse Transkriptase-Aktivität bereitstellen. (Jolicoeur, P., und Rassart, E., 1980). Ein Aliquot der Zellen wird in Zeitintervallen zentrifugiert und lysiert, um es auf reverse Transkriptase-Aktivität zu untersuchen. Durch Vergleich des RT-Aktivitäts-Niveaus, das von Zellen abstammt, die mit einem Nukleinsäure-Inhibitor transfiziert sind, und solcher, die nicht transfiziert sind, kann die Wirksamkeit der Inhibition der viralen Proliferation in der Zelle bestimmt werden.

Beispiel 9

Inhibition der Taq-Polymerase unter Verwendung von Phosphorthioat-substituierten Oligonukleotiden

[0151] In einigen bevorzugten Ausführungsformen können ein oder mehr Phosphorthioat-Rest/e in die Oligonukleotide der vorliegenden Erfindung eingebaut werden. Der Fachmann wird erkennen, dass Oligonukleotide, die solche Internukleotid-Verknüpfung eingebaut haben, gegenüber Nuklease-Aktivitäten, die in einer Reaktionsmischung oder innerhalb einer Zelle vorliegen können, resistenter sein können. Demgemäß können solche Modifikationen in Oligonukleotiden durchgeführt werden, die für die In-Vivo- oder In-Vitro-Verwendung vorgesehen sind. In einigen bevorzugten Ausführungsformen können alle der Internukleotid-Verknüpfungen Phosphorthioat-Verknüpfungen sein.

[0152] In einigen Ausführungsformen kann der 3'-Terminus eines Oligonukleotids der Erfindung modifiziert werden, um das Oligonukleotid gegenüber jeder beliebigen 3'-nach-5'-Exonuklease-Aktivität, die in einer Reaktionsmischung oder innerhalb einer Zelle vorliegt, resistenter zu machen. In einigen Ausführungsformen kann das 3'-Hydroxyl des Oligonukleotids, zum Beispiel, durch Kuppeln eines Abstandshalter-Modifikators an die Hydroxyl-Gruppe, modifiziert werden. Solche Abstandshalter-Modifikatoren sind kommerziell erhältlich (Glen Research) und können eine Kette aus Kohlenstoffatomen umfassen, welche mit einer oder mehr Heteroatome-enthaltender/n Gruppe/n substituiert werden kann. In einigen bevorzugten Ausführungsformen kann das 3'-Hydroxyl der Oligonukleotide der Erfindung mit einem 3'-Kohlenstoff-Abstandshalter modifiziert werden, welcher mit einer ein Heteroatom-enthaltenden Gruppe, wie zum Beispiel eine Amin-Gruppe oder eine Hydroxyl-Gruppe, endet. Der Einbau solcher Abstandshalter-Modifikatoren in ein Oligonukleotid kann unter Verwendung dem Fachmann gut bekannter Chemie erreicht werden, zum Beispiel, durch den Einbau einer geeignet blockierten Phosphoramidit-Version des Abstandshalters.

[0153] Um die Wirksamkeit der Phosphorthioat-modifizierten Oligonukleotide zum Inhibieren der Taq-Polymerase zu untersuchen, wurden Oligonukleotide konstruiert, in welchen alle Phosphat-Internukleotid-Verknüpfungen gegen Phosphorthioat-Internukleotid-Verknüpfungen ausgetauscht wurden. Vier solcher Oligonukleotide wurden konstruiert und deren Sequenzen sind unten angegeben.

[0154] HPHH1 ist ein Phosphorthioat-Haarnadelschleifen-Oligonukleotid mit einem 3-Nukleotid-Loop, einer Schmelztemperatur der Duplex-Region von 59°C und einem $\Delta G = -15,70$ kcal/mol für die Duplex-Bildung.

```

5'  CGGATGTATTAAGTATCAATA  -
      |||||
3'  CAGAATTGATAGTTAA  -

```

(SEQ ID NO:9)

[0155] HPHH2 ist ein Phosphorthioat-Haarnadelschleifen-Oligonukleotid mit einem 3-Nukleotid-Loop, einer Schmelztemperatur der Duplex-Region von 67°C und einem $\Delta G = -18,10$ kcal/mol für die Duplex-Bildung.

```

5'  CGGATGGATTAACTATCAATA  ↯
      |||||  C
      3'  CCTAATTGATAGTTAA  ↵

```

(SEQ ID NO:10)

[0156] HPHH3 ist ein Phosphorthioat-Haarnadelschleifen-Oligonukleotid mit einem 5-Nukleotid-Loop und einer Schmelztemperatur der Duplex-Region von 70°C und einem $\Delta G = -18,90$ kcal/mol für die Duplex-Bildung.

```

5'  CGGATGGATTAACTATCAATTA  ↯
      |||||  C
      3'  CCTAATTGATAGTTAGA  ↵

```

(SEQ ID NO:11)

[0157] HPHH4 ist ein Phosphorthioat-Oligonukleotid mit einem 4-Nukleotid-Loop und einer Schmelztemperatur von 65°C für den Duplex und einem $\Delta G = -13,5$ kcal/mol für die Duplex-Bildung.

```

5'  ACATGTATTGATAGATCGA  ↯
      |||||  C
      3'  CATAACTATCTAGAA  ↵

```

(SEQ ID NO:12)

[0158] Die in die Bildung der Stamm-Struktur einbezogenen Basen sind durch eine vertikale Linie gezeigt. Wenn das Oligonukleotid am 3'-Terminus mit einer 3-Kohlenstoff-Abstandshalter-Gruppe, die mit einem Hydroxyl endet, modifiziert wurde, wurde die Bezeichnung Sspa3 zu dem Namen des Oligonukleotids hinzugefügt.

[0159] Mit Verweis auf [Fig. 7](#), Amplifikations-Reaktionen zum Herstellen eines Fragments des NF2-Gens von 1,6 kb (A), 2 kb (B) und 2,6 kb (C). In jedem Feld ist die Spur a die Amplifikation unter Verwendung der Taq-Polymerase allein, Spur b ist die Amplifikations-Reaktion in Gegenwart des Inhibitors HPHH4Sspa3 bei einem molaren Verhältnis von 1,2:1 Inhibitor:Polymerase und Spur c ist die Amplifikation unter Verwendung von Platinum-Taq.

[0160] Die Matrice war 200 ng genomische DNA. Ein Vergleich der Spur b mit den Spuren a und c in jedem Feld zeigt, dass die Gegenwart des Inhibitors die Menge des Voll-Längen-Produkts verbessert und die Menge verkürzter Produkte unter diesen Reaktionsbedingungen reduziert.

[0161] Wie in [Fig. 8](#) gezeigt, wurde die Aktivität der Taq-Polymerase in einem Nukleotid-Einbau-Assay bei drei Temperaturen (25°C, 55°C und 72°C) in Gegenwart zweier unterschiedlicher Konzentrationen des Inhibitors HPHH4Sspa3 (molare Verhältnisse von 2:1 und 7,5:1 Inhibitor:Polymerase) bestimmt. Bei jeder Temperatur ist der geschlossene schwarze Balken die Taq-Polymerase allein, der gestreifte Balken ist die Taq-Polymerase plus Inhibitor bei einem 2:1-Verhältnis von Inhibitor zur Polymerase und der geschlossene weiße Balken ist Taq plus Inhibitor bei einem 7,5:1-Verhältnis von Inhibitor:Polymerase.

[0162] Der Einbau wurde in einer PCR-Reaktions-Mischung untersucht, die bei der gezeigten Temperatur in Gegenwart von alpha-[³²P]-dCTP inkubiert wurde. Nach 30 Minuten wurden die Reaktionen durch die Zugabe von EDTA gestoppt und ein Aliquot jeder Reaktion wurde auf GF/C-Filter verteilt. Die Filter wurden mit TCA gewaschen und ausgezählt. Die Aktivität wurde auf die Aktivitätsmenge der Taq-Polymerase bei der gleichen Temperatur normiert.

[0163] Bei 25°C und einem 2:1-Verhältnis wurde die Taq-Aktivität auf näherungsweise 60% der nicht-inhibierten Polymerase reduziert, während ein 7,5:1-Verhältnis die Aktivität um näherungsweise 90% reduzierte. Bei 55°C (einer typischen Annealing-Temperatur) wurde die Inhibition weiterhin beobachtet, näherungsweise eine 20%- und 60%-Reduktion in Aktivität bei 2:1 bzw. 7,5:1. Bei 72°C (eine typische Verlängerungs-Temperatur) war die Inhibition bei einem 2,5:1-Verhältnis nahezu eliminiert und war näherungsweise 50% bei einem

7,5:1-Verhältnis. Diese Daten weisen darauf hin, dass die Inhibition temperaturabhängig ist, wobei mehr Inhibition bei niedrigen Temperaturen (d.h., wenn das Oligonukleotid in einer Haarnadelschleifen-Struktur vorliegt) und weniger bei einer hohen Temperatur beobachtet wird.

[0164] Die Konzentrations-Abhängigkeit der Inhibition der Taq-Polymerase durch den Inhibitor HPHHSpa3 wurde bei 37°C untersucht und die Ergebnisse werden in [Fig. 9](#) gezeigt. Der oben beschriebene Einbau-Assay wurde verwendet. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Inhibition dosisabhängig ist, mit einer leichten (20%) Inhibition, beobachtet bei einem molaren Verhältnis von 0,5:1 Inhibitor:Polymerase, bis zu einer nahezu vollständigen Inhibition (96%), beobachtet bei 7,5:1. Zum Vergleich wurde eine Taq-Polymerase, die durch den Antikörper (Platinum Taq) inhibiert wurde, unter den gleichen Bedingungen getestet. Bei einem molaren Verhältnis von 7,5:1 stellen die Inhibitoren der vorliegenden Erfindung eine vergleichbare Inhibitions-Menge der Taq-Aktivität wie der Antikörper bereit.

[0165] Nachdem die vorliegende Erfindung im Detail zur Veranschaulichung und durch Beispiele für Zwecke der Verständnisklarheit vollständig beschrieben wurde, wird es für einen Durchschnittsfachmann offensichtlich, dass das Gleiche durch Modifizieren oder Ändern der Erfindung innerhalb eines weiten und äquivalenten Bereichs von Bedingungen, Formulierungen und anderen Parametern durchgeführt werden kann, ohne den Umfang der Erfindung oder jeder beliebigen spezifischen Ausführungsform davon zu beeinflussen, und dass es für solche Modifikationen oder Änderungen vorgesehen ist, dass sie vom Umfang der beigefügten Ansprüche umfasst werden.

[0166] Alle Veröffentlichungen, Patente und Patentanmeldungen, die in dieser Spezifikation erwähnt werden, sind für das Fachniveau des Fachmanns, auf welchen diese Erfindung gerichtet ist, indikativ.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Life Technologies, Inc.

<120> Zusammensetzungen und Verfahren zur erhöhten Sensitivität
und Spezifität von Nukleinsäure-Synthese

<130> 0942.499PC01

<140>

<141>

<150> US 60/142,072

<151> 1999-07-02

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 34

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung künstlicher Sequenz:
Nukleinsäure-Inhibitor

<220>

<221> stem_loop

<222> (5)..(34)

<400> 1

cccaatatgg accggtcgaa agaccggtcc atat

34

<210> 2

<211> 55

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung künstlicher Sequenz:
Nukleinsäure-Inhibitor

<220>

<221> stem_loop

<222> (2)..(55)

<400> 2

ccatgcaggt agccgatgaa ctggtcgaaa gaccagttca tcggctacct gcatg

55

<210> 3

<211> 44

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung künstlicher Sequenz:
Nukleinsäure-Inhibitor

<220>
 <221> stem_loop
 <222> (11)..(44)

 <400> 3
 aattaatgta tatattatta ctataccggt atagtaataa tata 44

 <210> 4
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung von kombiniertem DNA/RNA-Molekül:
 RNA-Basen von 1-25 und DNA-Basen von 26-50

 <220>
 <223> Beschreibung künstlicher Sequenz:
 Nukleinsäure-Inhibitor

 <220>
 <221> stem_loop
 <222> (9)..(50)

 <400> 4
 aaauaauga uauauuauua cuauaccgaa gggatatagta ataatatata 50

 <210> 5
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung von kombiniertem DNA/RNA-Molekül:
 RNA-Basen vom 1-25 und DNA-Basen von 26-50 (48)

 <220>
 <223> Beschreibung künstlicher Sequenz:
 Nukleinsäure-Inhibitor

 <220>
 <221> stem_loop
 <222> (9)..(50)

 <400> 5
 aaauaauga uauauuauua cuauaccgaa gggataata atagtatata 50

 <210> 6
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung von kombiniertem DNA/RNA-Molekül:
 RNA-Basen von 1-25 und DNA-Basen von 26-50

 <220>

<223> Beschreibung künstlicher Sequenz:
Nukleinsäure-Inhibitor

<220>
<221> stem_loop
<222> (9)..(50)

<400> 6
aaauaaugua uauauuauua cuauaccqaa qqqtataatg aqaqtatata 50

<210> 7
<211> 50
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung von kombiniertem DNA/RNA-Molekül:
RNA-Basen von 1-25 und DNA-Basen von 26-50

<220>
<223> Beschreibung künstlicher Sequenz:
Nukleinsäure-Inhibitor

<220>
<221> stem_loop
<222> (9)..(50)

<400> 7
aaauaaugua uauauuauua cuauaccgaa gggatataatg agagtatata 50

<210> 8
<211> 50
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung von kombiniertem DNA/RNA-Molekül:
RNA-Basen von 1-25 und DNA-Basen von 26-50

<220>
<223> Beschreibung künstlicher Sequenz:
Nukleinsäure-Inhibitor

<400> 8
aaauaaugua uauauuauua cuauaccgaa aatatataat gatgatatag 50

<210> 9
<211> 38
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung künstlicher Sequenz: synthetische
Oligonukleotide

<220>
 <221> stem_loop
 <222> (6)..(38)

<400> 9
 cggatgtatt aactatcaat acaattgata gttaagac 38

<210> 10
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung künstlicher Sequenz: synthetische
 Oligonukleotide

<220>
 <221> stem_loop
 <222> (6)..(38)

<400> 10
 cggatggatt aactatcaat acaattgata gttaatcc 38

<210> 11
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung künstlicher Sequenz: synthetische
 Oligonukleotide

<220>
 <221> stem_loop
 <222> (6)..(40)

<400> 11
 cggatggatt aactatcaat tacagattga tagttaatcc 40

<210> 12
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung künstlicher Sequenz: synthetische
 Oligonukleotide

<220>
 <221> stem_loop
 <222> (4)..(35)

<400> 12
 acatgtattg atagatcgac aagatctatc aatac 35

Patentansprüche

1. Zusammensetzung zum Inhibieren der Synthese von Nukleinsäure, umfassend einen Nukleinsäure-Inhibitor, der in der Lage ist, ein Enzym mit Polymerase-Aktivität zu binden, oder Affinität zu einem solchen Enzym aufweist, wobei der Nukleinsäure-Inhibitor ein 5'-Ende und ein 3'-Ende umfasst, wobei das 3'-Ende eine Folge von aufeinanderfolgenden Desoxyribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst und wobei das 5'-Ende eine Folge von aufeinanderfolgenden Ribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst und wobei das gesamte oder ein Teil des 3'-Endes Basenpaarung/en mit dem gesamten oder einem Teil des 5'-Endes eingeht, wodurch ein Haarnadelschleifen-förmiges oder ein doppel-strängiges Nukleinsäure-Molekül gebildet wird.

2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei die Bindung des Nukleinsäure-Inhibitors an das Enzym oder die Affinität zu dem Enzym unter Bedingungen der Nukleinsäure-Synthese, -Amplifikation oder -Sequenzierung inhibiert, reduziert, wesentlich reduziert oder eliminiert wird.

3. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei der Nukleinsäure-Inhibitor in der Lage ist, einen Komplex mit dem Enzym zu bilden.

4. Zusammensetzung nach Anspruch 1, der weiterhin ein oder mehr Enzym/e mit Polymerase-Aktivität umfasst.

5. Zusammensetzung nach Anspruch 4, wobei das Enzym thermophil ist.

6. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei der Nukleinsäure-Inhibitor denaturiert ist oder eine reduzierte Fähigkeit zur Inhibition unter Bedingungen für die Nukleinsäure-Synthese, -Amplifikation oder -Sequenzierung aufweist.

7. Zusammensetzung nach Anspruch 4, wobei das Enzym mit der Nukleinsäure-Polymerase-Aktivität ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus einer DNA-Polymerase, einer RNA-Polymerase und einer reversen Transkriptase.

8. Zusammensetzung nach Anspruch 7, wobei die DNA-Polymerase ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Taq-, Tne-, Tma-, Pfu-, VENTTM-, DEEPVENTTM-, KOD-, Tfl-, und Tth-DNA-Polymerasen, und Mutanten, Varianten und Derivaten davon.

9. Zusammensetzung nach Anspruch 7, wobei die reverse Transkriptase ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus M-MLV-reverse Transkriptase, RSV-reverse Transkriptase, AMV-reverse Transkriptase, RAV-reverse Transkriptase, MAV-reverse Transkriptase und HIV-reverse Transkriptase, und Mutanten, Varianten und Derivaten davon.

10. Zusammensetzung nach Anspruch 7, wobei die reverse Transkriptase in Hinblick auf die RNase H-Aktivität wesentlich reduziert ist.

11. Verfahren zur Synthese eines Nukleinsäure-Moleküls, umfassend:
Mischen mindestens eines Enzyms mit Polymerase-Aktivität mit einem oder mehr Nukleinsäuren-Inhibitor/en nach Anspruch 1 und einer oder mehr Matrize/n; und
Inkubieren dieser Mischung unter Bedingungen, die ausreichend sind, um ein oder mehr erste Nukleinsäure-Molekül/e, die komplementär zu den gesamten oder einem Teil der Matrizen ist/sind, zu synthetisieren.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei das Mischen unter Bedingungen erfolgt, um die Nukleinsäure-Synthese zu verhindern und/oder um die Bindungen des Nukleinsäure-Inhibitors an das Enzym mit Polymerase-Aktivität zu ermöglichen.

13. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die Synthese des ersten Nukleinsäure-Moleküls unter Bedingungen erfolgt, die ausreichend sind, um die inhibitorische Wirkung des Nukleinsäure-Inhibitors zu reduzieren und/oder die Bindung des Nukleinsäure-Inhibitors an das Enzym mit Polymerase-Aktivität zu inhibieren, zu reduzieren, wesentlich zu reduzieren oder zu eliminieren.

14. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die Synthese in Gegenwart mindestens einer Komponente, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem oder mehr Nukleotid/en und einem oder mehr Primer/n, erfolgt.

15. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die Matrize ein doppel-strängiges Nukleinsäure-Molekül ist.

16. Verfahren nach Anspruch 11, wobei das Verfahren weiterhin das Inkubieren eines oder mehr ersten/ Nukleinsäure-Moleküls/e unter Bedingungen, die ausreichend sind, um ein oder mehr zweite Nukleinsäure-Molekül/e zu dem gesamten oder einem Teil der ersten Nukleinsäure-Moleküle komplementär zu machen, umfasst.

17. Verfahren zum Amplifizieren eines Nukleinsäure-Moleküls, umfassend:
Mischen mindestens eines Nukleinsäure-Inhibitors nach Anspruch 1 mit einem oder mehr Enzym/en mit Polymerase-Aktivität und einer oder mehr Matrize/n; und

Inkubieren dieser Mischung unter Bedingung, die ausreichend sind, um ein oder mehr Nukleinsäure-Molekül/e, das/die zu den gesamten oder einem Teil der Matrizen komplementär ist/sind, zu amplifizieren.

18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei das Mischen unter Bedingungen erfolgt, die ausreichend sind, um die Nukleinsäure-Amplifikationen zu verhindern und/oder die Bindung des Nukleinsäure-Inhibitors an das Enzym mit Polymerase-Aktivität zu ermöglichen.

19. Verfahren nach Anspruch 17, wobei das Amplifizieren unter Bedingungen erfolgt, die ausreichend sind, um den Nukleinsäure-Inhibitor zu denaturieren oder die Fähigkeit des Inhibitors, die Amplifikation zu inhibieren, zu reduzieren.

20. Verfahren nach Anspruch 17, wobei das Amplifizieren in Gegenwart mindestens einer Komponente, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem oder mehr Nukleotid/en und einem oder mehr Primer/n, erfolgt.

21. Verfahren nach Anspruch 17, wobei diese Matrize ein doppel-strängiges Nukleinsäure-Molekül ist.

22. Verfahren zur Sequenzierung eines Nukleinsäure-Moleküls, umfassend:
Mischen mindestens eines zu sequenzierenden Nukleinsäure-Moleküls mit einem oder mehr Nukleinsäure-Inhibitor/en nach Anspruch 1, einem oder mehr Enzym/en mit Polymerase-Aktivität und einem oder mehr Terminations-Mittel/n;
Inkubieren dieser Mischung unter Bedingungen, die ausreichend sind, um eine Population an Molekülen, die zu den gesamten oder einem Teil der zu sequenzierenden Moleküle komplementär sind, zu synthetisieren; und
Separieren dieser Population, um die Nukleotid-Sequenz des gesamten oder eines Teils des zu sequenzierenden Moleküls zu bestimmen.

23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei das Mischen unter Bedingungen erfolgt, die ausreichend sind, um die Synthese zu verhindern und/oder die Bindung des Nukleinsäure-Inhibitors an das Enzym mit Polymerase-Aktivität zu ermöglichen.

24. Verfahren nach Anspruch 22, wobei die Synthese unter Bedingungen erfolgt, die ausreichend sind, um den Nukleinsäure-Inhibitor zu denaturieren und/oder die inhibitorische Wirkung dieses Nukleinsäure-Inhibitors zu reduzieren.

25. Verfahren nach Anspruch 22, wobei die Synthese in Gegenwart mindestens einer Komponente, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem oder mehr Nukleotid/en und einem oder mehr Primer/n, erfolgt.

26. Verfahren nach Anspruch 22, wobei das zu sequenzierende Molekül ein doppel-strängiges Nukleinsäure-Molekül ist.

27. Kit zur Verwendung bei Synthese, Amplifikation und Sequenzierung eines Nukleinsäure-Moleküls, wobei das Kit einen oder mehr Nukleinsäure-Inhibitor/en nach Anspruch 1 umfasst.

28. Kit nach Anspruch 27, weiterhin umfassend eine oder mehr Komponente/n, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem oder mehr Nukleotid/en, einer oder mehr DNA-Polymerase/n, einer oder mehr reversen Transcriptase/n, einem oder mehr geeigneten Puffer/n, einem oder mehr Primer/n und einem oder mehr Terminations-Mittel/n.

29. Verfahren zum Amplifizieren eines doppel-strängiges DNA-Moleküls, umfassend
(a) Bereitstellen eines ersten und zweiten Primers, wobei der erste Primer zu einer Sequenz innerhalb der oder bei oder nahe den 3'-Termini des ersten Stranges dieses DNA-Moleküls komplementär ist und wobei der zweite Primer zu einer Sequenz innerhalb oder bei oder nahe den 3'-Termini des zweiten Strangs dieses DNA-Moleküls komplementär ist, und eines oder mehr Nukleinsäure-Inhibitor/en nach Anspruch 1 unter solchen Bedingungen, dass die Inhibitoren die Nukleinsäure-Synthese verhindern oder inhibieren;
(b) Hybridisieren des ersten Primers an diesen ersten Strang und des zweiten Primers an diesen zweiten Strang zur Bildung hybridisierter Moleküle;
(c) Inkubieren der hybridisierten Moleküle unter Bedingungen, die ausreichend sind, um eine Synthese eines dritten DNA-Moleküls, das zu dem gesamten oder einem Teil dieses ersten Stranges komplementär ist, und eines vierten DNA-Moleküls, das zu dem gesamten oder einem Teil dieses zweiten Stranges komplementär ist, zu ermöglichen;

- (d) Denaturieren des ersten und dritten Stranges und zweiten und vierten Stränge; und
- (e) Wiederholen von (a) bis (c) oder (d) einmal oder mehrmals.

30. Verfahren zur Herstellung einer cDNA aus mRNA, umfassend Mischen einer oder mehr mRNA-Matrize/n, einer oder mehr reverse/n Transkriptase/n und mit einem oder mehr Nukleinsäure-Inhibitor/en nach Anspruch 1; und Inkubieren dieser Mischung unter Bedingungen, die ausreichend sind, um ein oder mehr cDNA-Molekül/e, das/die zu den gesamten oder einem Teil dieser Matrizen komplementär ist/sind, zu synthetisieren.

31. Verfahren nach Anspruch 30, wobei das Mischen unter Bedingungen erfolgt, die ausreichend sind, um die Nukleinsäure-Synthese zu verhindern und/oder die Bindung des Nukleinsäure-Inhibitors an die reverse Transkriptase zu ermöglichen.

32. Verfahren zum Inhibieren oder Verhindern der Nukleinsäure-Synthese, -Amplifikation oder -Sequenzierung, umfassend: Mischen eines oder mehr Nukleinsäure-Inhibitors/en nach Anspruch 1 mit einem oder mehr Enzym/en mit Polymerase-Aktivität; und Inkubieren dieser Mischung unter Bedingungen, die ausreichend sind, um die Nukleinsäure-Synthese, -Amplifikation und/oder -Sequenzierung zu inhibieren oder zu verhindern.

33. Oligonukleotid, umfassend ein 5'-Ende und ein 3'-Ende, wobei das 3'-Ende eine Folge von aufeinanderfolgenden Desoxyribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst und das 5'-Ende eine Folge von aufeinanderfolgenden Ribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst und wobei das gesamte oder ein Teil des 3'-Endes in der Lage ist, mit dem gesamten oder einem Teil dieses 5'-Endes Basenpaarung/en einzugehen.

34. Oligonukleotid nach Anspruch 33, wobei das 5'-Ende, umfassend Ribonukleotide, einen 5'-Überhang bildet.

35. Oligonukleotid nach Anspruch 33, wobei das äußerste 3'-Nukleotid ein oder mehr Modifikation/en derart umfasst, dass es nicht verlängerbar ist.

36. Oligonukleotid nach Anspruch 35, wobei die Modifikation eine Phosphorylierung des 3'-Hydroxyls des Nukleotids ist.

37. Oligonukleotid nach Anspruch 33, umfassend eine oder mehr Modifikation/en derart, dass es gegenüber einer oder mehr Nuklease/n resistent ist.

38. Oligonukleotid nach Anspruch 37, wobei diese Modifikation ein Phosphorthioat ist.

39. Oligonukleotid nach Anspruch 37, wobei diese Modifikation eine Methylierung einer Hydroxyl-Gruppe ist.

40. Verwendung eines Oligonukleotids zur Herstellung eines Medikaments zum Inhibieren eines Polymerase-Enzyms innerhalb einer Zelle, wobei dieses Oligonukleotid ein 5'-Ende und ein 3'-Ende umfasst, wobei das 3'-Ende eine Folge von aufeinanderfolgenden Desoxyribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst und wobei das 5'-Ende eine Folge von aufeinanderfolgenden Ribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst und wobei das gesamte oder ein Teil des 3'-Endes in der Lage ist, mit dem gesamten oder einem Teil des 5'-Endes Basenpaarung/en einzugehen.

41. Verwendung nach Anspruch 40, wobei das 5'-Ende dieses Oligonukleotids, umfassend Ribonukleotide, einen 5'-Überhang bildet.

42. Verwendung nach Anspruch 40, wobei die Polymerase eine reverse Transkriptase ist.

43. Verwendung nach Anspruch 40, wobei die Polymerase die HIV-reverse Transkriptase ist.

44. Verwendung eines Oligonukleotids zur Herstellung eines Medikaments zum Inhibieren der Replikation eines Virus, wobei das Virus eine reverse Transkriptase umfasst und die Aktivität der reversen Transkriptase zur Replikation benötigt, wobei das Oligonukleotid die Aktivität dieser reversen Transkriptase inhibiert und wobei das Oligonukleotid ein 5'-Ende, das eine Folge von aufeinanderfolgenden Ribonukleotiden oder Derivaten

davon umfasst, und ein 3'-Ende umfasst, das eine Folge von aufeinanderfolgenden Desoxyribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst, und wobei das gesamte oder ein Teil des 3'-Endes mit dem gesamten oder einem Teil des 5'-Endes Basenpaarung/en eingeht, um eine Haarnadelschleifen-förmiges oder ein doppel-strängiges Nukleinsäure-Molekül zu bilden.

45. Verwendung nach Anspruch 44, wobei das 5'-Ende, umfassend Ribonukleotide, eine 5'-Überhang bildet.

46. Verwendung nach Anspruch 44, wobei das Virus ein HIV ist.

47. Verwendung nach Anspruch 44, wobei das In-Kontakt-Bringen das Einführen des Oligonukleotids in eine Zelle umfasst.

48. Verwendung einer Zusammensetzung, umfassend ein Oligonukleotid, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer viralen Infektion in einem Lebewesen, wobei das Oligonukleotid ein 5'-Ende und ein 3'-Ende umfasst, wobei das 3'-Ende eine Folge von aufeinanderfolgenden Desoxyribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst und wobei das 5'-Ende eine Folge von aufeinanderfolgenden Ribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst und wobei das gesamte oder ein Teil des 3'-Endes in der Lage ist, mit dem gesamten oder einem Teil des 5'-Endes Basenpaarung/en einzugehen.

49. Oligonukleotid, welches an eine oder mehr reverse Transkriptase/n bindet oder Affinität zu dieser aufweist, wobei das Oligonukleotid ein 5'-Ende, das eine Folge von aufeinanderfolgenden Ribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst, und ein 3'-Ende umfasst, das eine Folge von aufeinanderfolgenden Desoxyribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst, und wobei das gesamte oder ein Teil des 3'-Endes mit dem gesamten oder einem Teil des 5'-Endes Basenpaarungen eingeht, um ein Haarnadelschleifen-förmiges oder ein doppel-strängiges Nukleinsäure-Molekül zu bilden.

50. Oligonukleotid nach Anspruch 49, wobei das Oligonukleotid gegenüber dem Abbau oder Verdau resistent ist.

51. Verwendung eines oder mehr Oligonukleotids/en zur Herstellung eines Medikaments zum Inhibieren einer oder mehr reversen/r Transkriptase/n, wobei ein oder mehr Oligonukleotid/e ein 5'-Ende, das eine Folge von aufeinanderfolgenden Ribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst, und ein 3'-Ende umfasst, das eine Folge von aufeinanderfolgenden Desoxyribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst, und wobei das gesamte oder ein Teil des 3'-Endes mit dem gesamten oder einem Teil des 5'-Endes Basenpaarung/en eingeht, um ein Haarnadelschleifen-förmiges oder ein doppel-strängiges Nukleinsäure-Molekül zu bilden, und wobei ein oder mehr Oligonukleotid/e an eine oder mehr reverse Transkriptase/n bindet/n bzw. Affinität zu dieser aufweist/en, wodurch bewirkt wird, dass die Oligonukleotide die Polymerase-Aktivität der reversen Transkriptasen inhibieren.

52. Verwendung nach Anspruch 51, wobei das Oligonukleotid eine oder mehr Modifikation/en umfasst, um den Abbau oder Verdau des Oligonukleotids zu inhibieren oder zu verhindern.

53. Verwendung des Oligonukleotids nach Anspruch 49 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer viralen Infektion in einem Lebewesen.

54. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend das Oligonukleotid nach Anspruch 49.

55. In-Vitro-Verfahren zur Inhibierung eines Polymerase-Enzyms innerhalb einer Zelle, umfassend: Einführen eines Oligonukleotids in eine Zelle, wobei das Oligonukleotid ein 5'-Ende und ein 3'-Ende umfasst, wobei das 3'-Ende eine Folge von aufeinanderfolgenden Desoxyribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst und wobei das 5'-Ende eine Folge von aufeinanderfolgenden Ribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst und wobei das gesamte oder ein Teil des 3'-Endes in der Lage ist, Basenpaarung/en mit dem gesamten oder einem Teil des 5'-Endes einzugehen, und Bewirken der Inhibition der Polymerase mit diesem Oligonukleotid.

56. In-Vitro-Verfahren nach Anspruch 55, wobei das 5'-Ende des Oligonukleotids, umfassend Ribonukleotide, einen 5'-Überhang bildet.

57. In-Vitro-Verfahren nach Anspruch 55, wobei die Polymerase eine reverse Transkriptase ist.

58. In-Vitro-Verfahren nach Anspruch 55, wobei die Polymerase HIV-reverse Transkriptase ist.

59. In-Vitro-Verfahren zur Inhibition der Replikation eines Virus, umfassend:

Bereitstellen eines Virus, wobei das Virus eine reverse Transkriptase umfasst und die Aktivität der reverse Transkriptase zur Replikation benötigt; und

In-Kontakt-Bringen der reversen Transkriptase mit einem Oligonukleotid, das die Aktivität der reversen Transkriptase inhibiert, wobei das Oligonukleotid ein 5'-Ende, das eine Folge von aufeinanderfolgenden Ribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst, und ein 3'-Ende umfasst, das eine Folge von aufeinanderfolgenden Desoxyribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst, und wobei das gesamte oder ein Teil des 3'-Endes Basenpaarung/en mit dem gesamten oder einem Teil des 5'-Endes eingeht, um ein Haarnadelschleifen-förmiges oder ein doppel-strängiges Nukleinsäure-Molekül zu bilden, wodurch die Replikation des Virus inhibiert wird.

60. In-Vitro-Verfahren nach Anspruch 59, wobei das 5'-Ende, umfassend Ribonukleotide, einen 5'-Überhang bildet.

61. Verfahren nach Anspruch 59, wobei das Virus ein HIV ist.

62. Verfahren nach Anspruch 59, wobei das In-Kontakt-Bringen das Einführen des Oligonukleotids in eine Zelle umfasst.

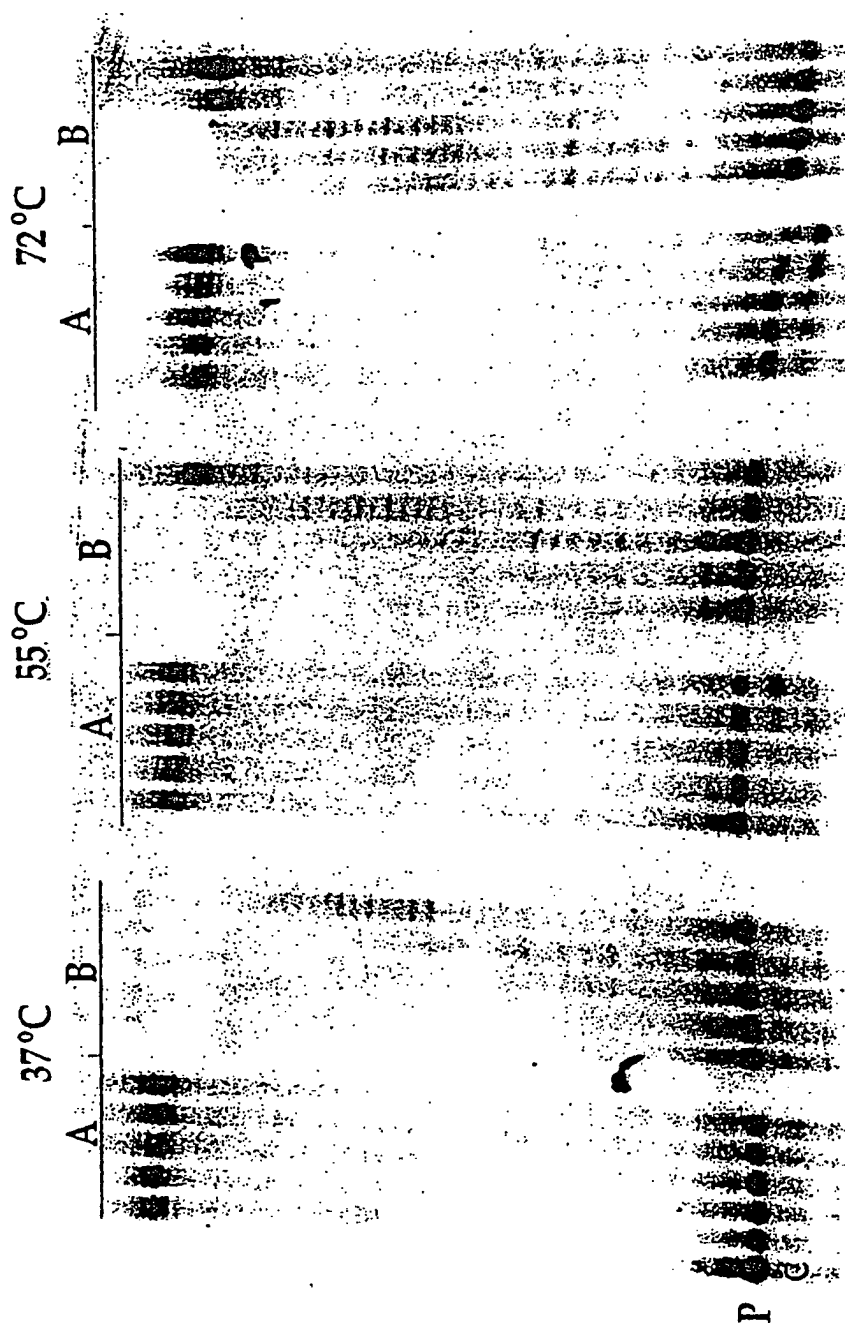
63. In-Vitro-Verfahren zum Inhibieren einer oder mehr reversen/r Transkriptase/n, umfassend:

In-Kontakt-Bringen einer Probe oder einer Zelle mit einem oder mehr Oligonukleotid/en, wobei ein oder mehr Oligonukleotid/e ein 5'-Ende, das eine Folge von aufeinanderfolgenden Ribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst, und ein 3'-Ende umfasst, das eine Folge von aufeinanderfolgenden Desoxyribonukleotiden oder Derivaten davon umfasst, und wobei das gesamte oder ein Teil des 3'-Endes Basenpaarung/en mit dem gesamten oder einem Teil des 5'-Endes eingeht, um ein Haarnadelschleifen-förmiges oder ein doppel-strängiges Nukleinsäure-Molekül zu bilden, und wobei ein oder mehr Oligonukleotid/e an eine oder mehr reverse Transkriptase/n bindet/n bzw. Affinität zu dieser aufweist, wodurch bewirkt wird, dass diese Oligonukleotide die Polymerase-Aktivität der reversen Transkriptase/n inhibieren.

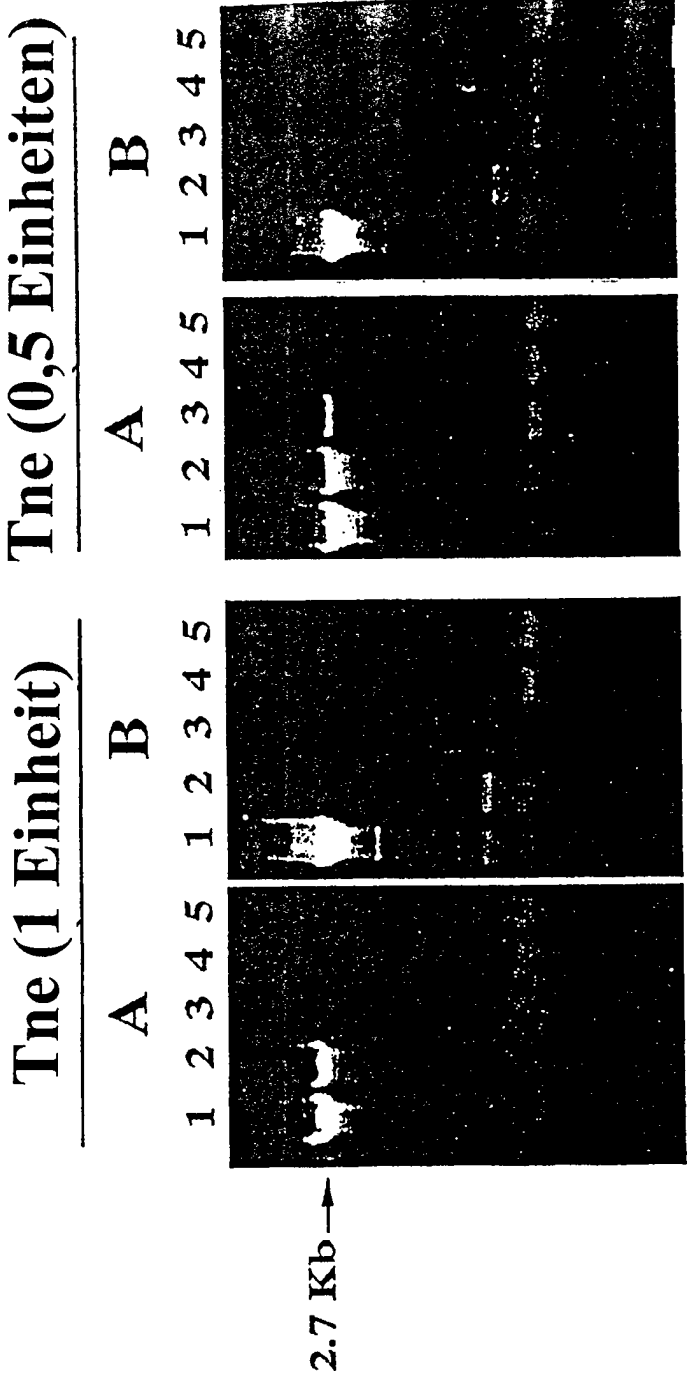
64. Verfahren nach Anspruch 63, wobei das Oligonukleotid ein oder mehr Modifikation/en umfasst, um den Abbau oder Verdau des Oligonukleotids zu inhibieren oder zu verhindern.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

FIGUR 1



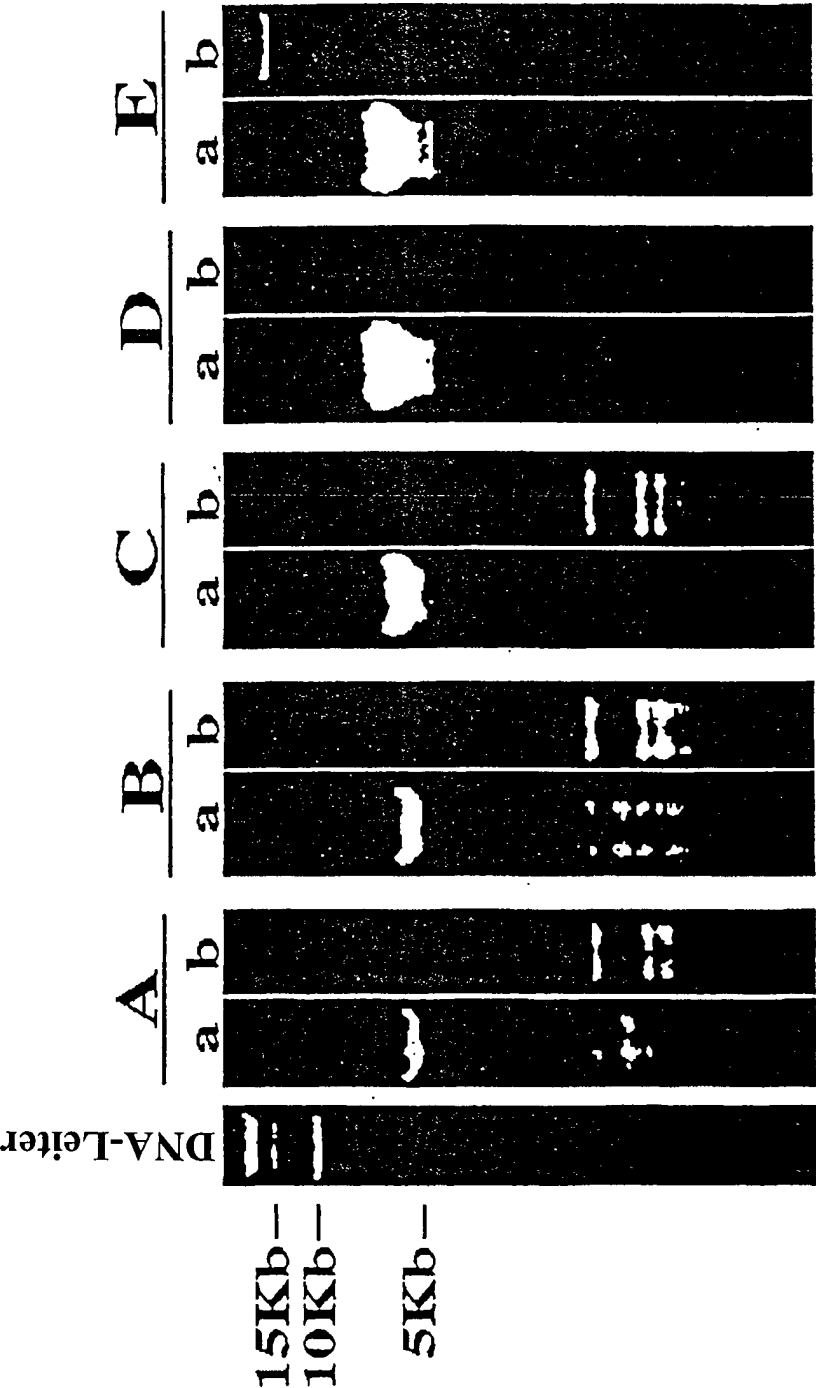
FIGUR 2



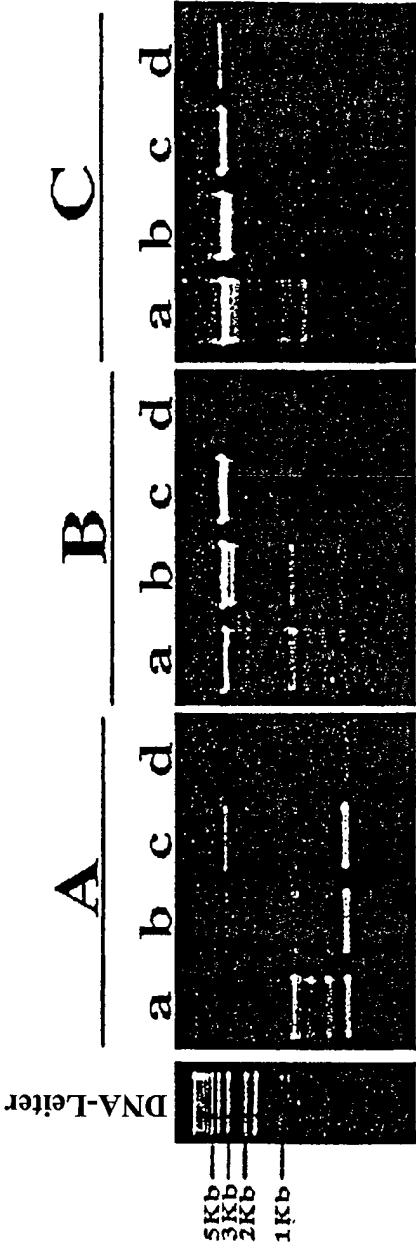
FIGUR 3



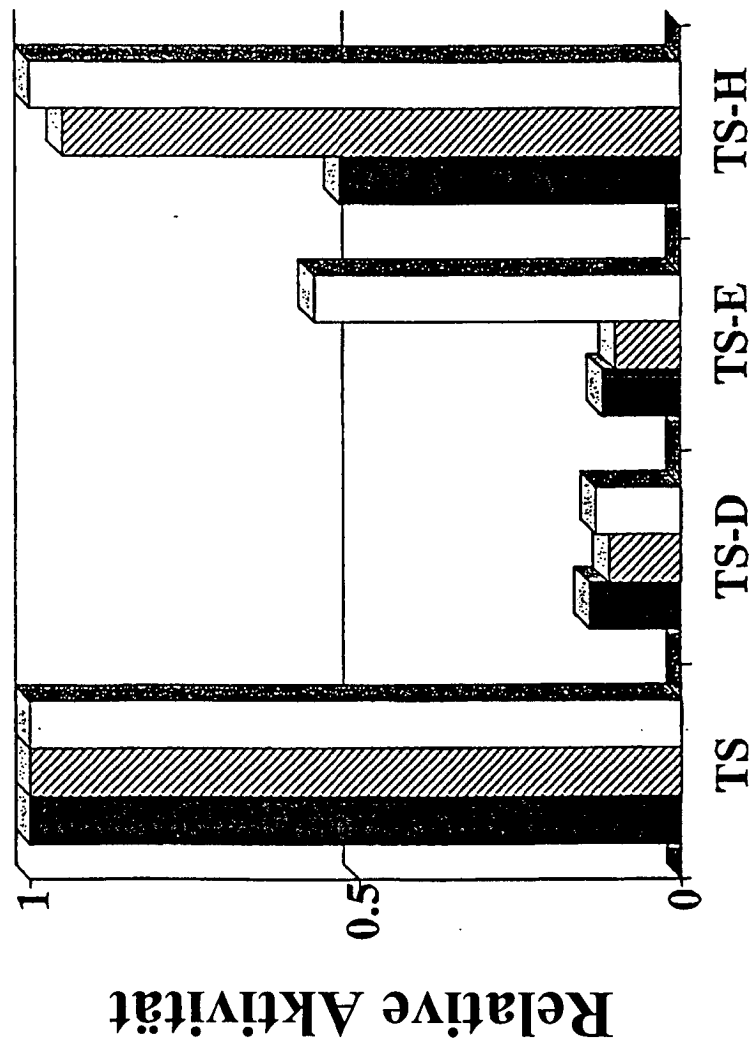
FIGUR 4



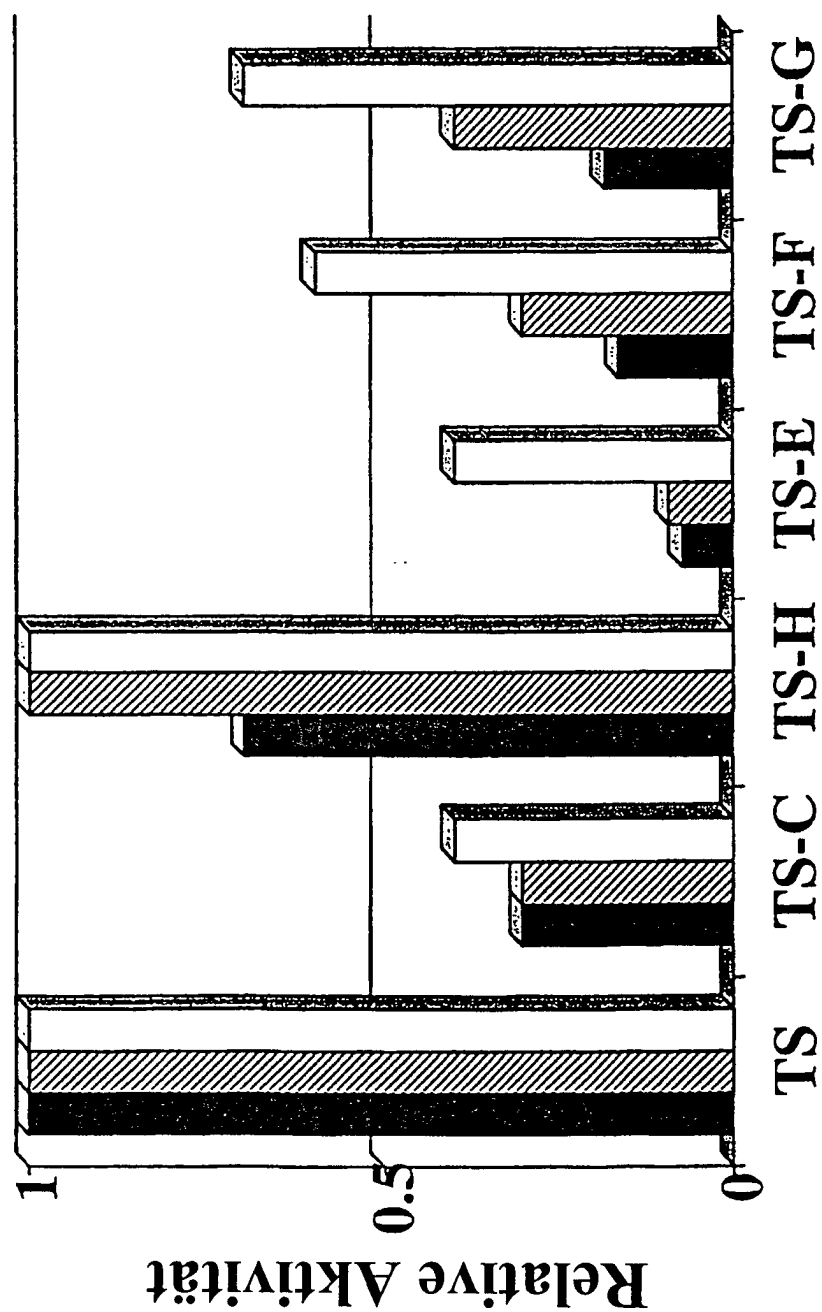
FIGUR 5

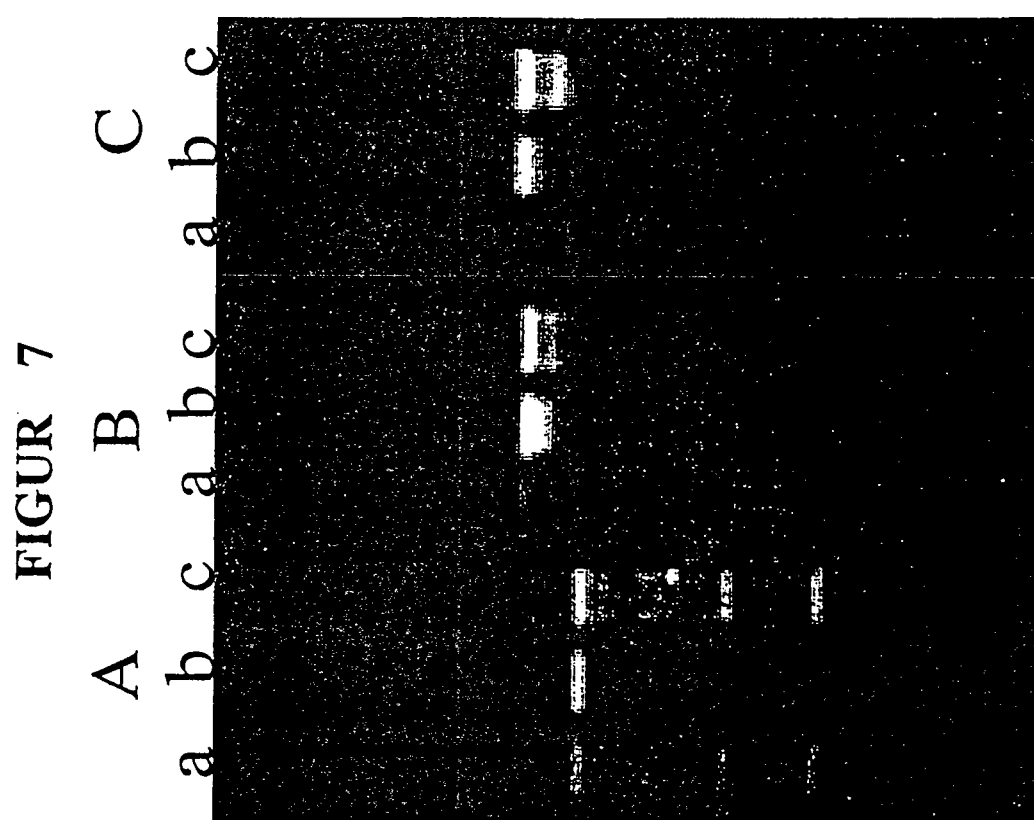


FIGUR 6A

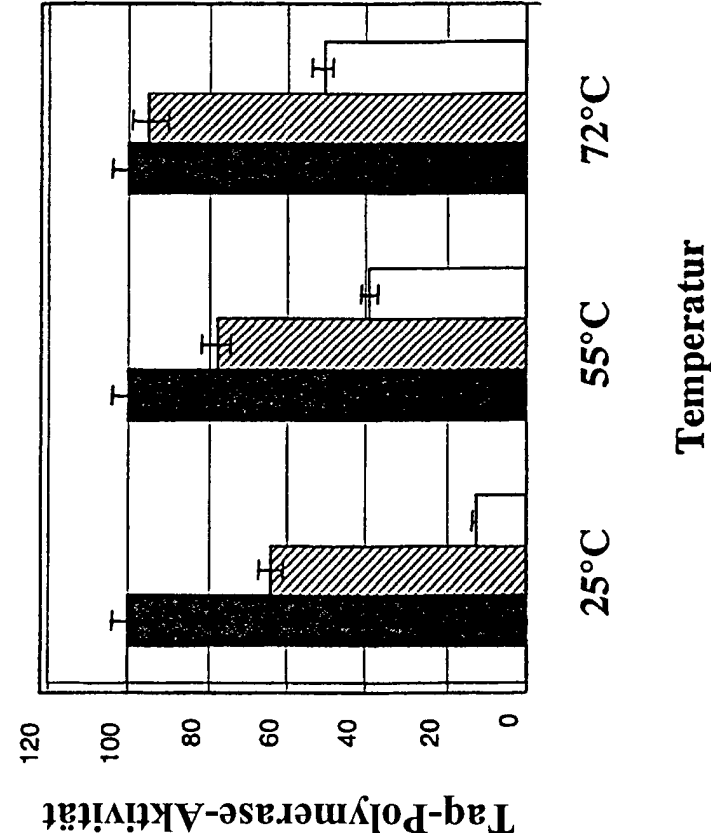


FIGUR 6B





FIGUR 8



FIGUR 9

