



<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 15/87, C07K 14/00, A61K 38/16, 48/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/40742</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 13. Juli 2000 (13.07.00)</p>
---	------------------	---

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/00061

(22) Internationales Anmeldedatum: 3. Januar 2000 (03.01.00)

(30) **Prioritätsdaten:**
 199 00 513.3 8. Januar 1999 (08.01.99) DE
 199 33 939.2 20. Juli 1999 (20.07.99) DE

(71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):** AMAXA GMBH [DE/DE]; Gottfried-Hagen-Strasse 60-62, D-51105 Köln (DE).

(72) **Erfinder; und**

(75) **Erfinder/Anmelder (nur für US):** SIEBENKOTTEN, Gregor [DE/DE]; Wilhelm-Waldeyerstrasse 14, D-50937 Köln (DE). CHRISTINE, Rainer [DE/DE]; Pasteurstrasse 36, D-10407 Berlin (DE).

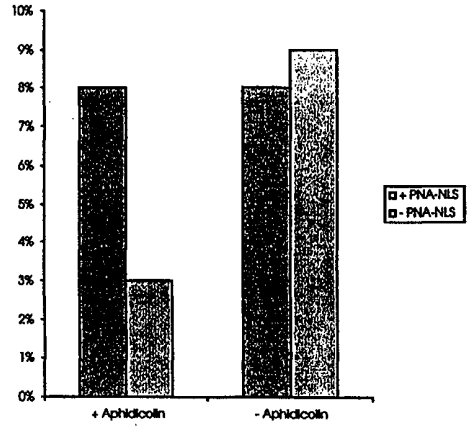
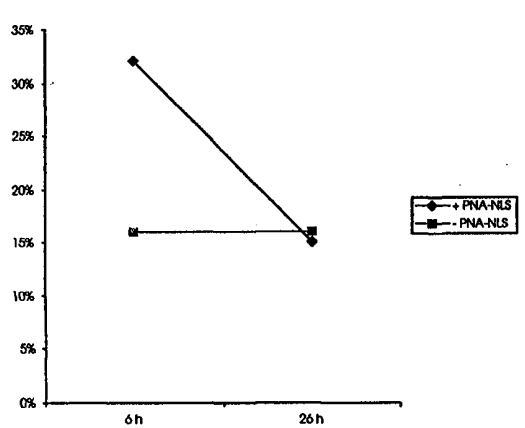
(74) **Anwälte:** VOSSIUS, Volker usw.; Holbeinstrasse 5, D-81679 München (DE).

(81) **Bestimmungsstaaten:** AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht
 Mit internationalem Recherchenbericht.
 Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) **Title:** USE OF THE CELL'S OWN TRANSPORT SYSTEM FOR TRANSFERRING NUCLEIC ACIDS ACROSS THE NUCLEAR MEMBRANE

(54) **Bezeichnung:** AUSNUTZUNG ZELLEIGENER TRANSPORTSYSTEME ZUM TRANSFER VON NUKLEINSÄUREN DURCH DIE KERNHÜLLE



(57) **Abstract**

The invention relates to a nuclear transport agent, to a gene transfer system comprising said nuclear transport agent, to a method of transporting DNA into the nucleus of eukaryotic cells using said nuclear transport agent and to the use of said nuclear transport agent in gene therapy for treating cancer, viral infections, diseases of the nervous system, graft rejection and monogenic or polygenic hereditary diseases.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Kerntransportagenz, ein Gentransfersystem umfassend das Kerntransportagenz, ein Verfahren zum Transport von DNA in den Kern eukaryontischer Zellen, mit Hilfe des Kerntransportagenz sowie die Verwendung des Kerntransportagenz in der Gentherapie zur Behandlung von Krebs, Virusinfektionen, Erkrankungen des Nervensystems, Transplantatabstossung sowie monogenen oder polygenen Erbkrankheiten.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Ausnutzung zelleigener Transportsysteme zum Transfer von Nukleinsäuren durch die Kernhülle

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Kerntransportagenz, ein Gentransfersystem umfassend
5 das Kerntransportagenz, ein Verfahren zum Transport von DNA in den Kern eukaryontischer
Zellen, mit Hilfe des Kerntransportagenz sowie die Verwendung des Kerntransportagenz in der
Gentherapie zur Behandlung von Krebs, Virusinfektionen, Erkrankungen des Nervensystems,
Transplantatabstoßung, sowie monogenen oder polygenen Erbkrankheiten.

10 Der aktive Transport in den Kern ist beim Transfer genetischen Materials in allen Zellen nötig,
die sich in der Zeitspanne bis zur angestrebten Ausprägung des genetischen Materials nicht
teilen. Ein Kerntransportsystem für Nukleinsäuren ist deshalb sehr wichtig, weil es den
effizienten Transfer von DNA in solche Zellen ermöglicht, die sich nicht oder nur selten teilen
(Dowty et al., 1995, Wilke et al., 1996). In diese Gruppe fallen die meisten primären Zellen.
15 Primäre Zellen sind von höchstem wissenschaftlichen Interesse, weil diese frisch aus einem
Organismus isolierten Zellen einerseits den funktionellen Zustand des Zelltyps viel besser
wiedergeben als daraus abgeleitete Zelllinien, und weil sie andererseits Zielzellen für
Gentherapien sind. Ein Kerntransportsystem erhöht außerdem die Effizienz des DNA-Transfers
in etablierte Zelllinien, indem auch die Zellen, die sich in der Zeitspanne von Beginn des
20 Transfers bis zur Analyse nicht geteilt haben, transferiertes genetisches Material ausprägen
können.

Der Wirkort des genetische Materials ist der Zellkern. Der Transfer dorthin kann zufällig
während der Zellteilung auftreten, wenn sich die Kernhülle während der Mitose vorübergehend
25 auflöst, oder er muß aktiv erfolgen.

1) Kernproteine werden durch Kerntransportsignale in den Kern transportiert

Die Doppelmembran, die den Zellkern umschließt, besitzt Poren. Durch diese Poren können
30 kleine Moleküle per Diffusion hindurchtreten. Proteine, die größer als ca. 50 kDa sind,
benötigen ein Kernlokalisierungssignal (nuclear localisation signal, NLS), das von einer
Transportmaschinerie erkannt werden muß, damit sie in den Kern gelangen können. Ein
ausreichendes Signal besteht typischerweise aus vier bis acht Aminosäuren, ist reich an den

positiv geladenen Aminosäuren Arginin und Lysin und besitzt Proline. Es ist evolutionär stark konserviert, so daß NLS von Säugetierproteinen auch in der Hefe funktionieren. Heterologe NLS können auch als Werkzeug eingesetzt werden, um Zielmoleküle in den Zellkern zu transportieren. Hierzu können NLS an relativ beliebiger Stelle in die Sequenz zytoplasmatischer Proteine eingebaut oder als Peptid chemisch an Proteine oder sogar an Goldpartikel gekoppelt werden (Übersichtsartikel: Görlich, 1998).

2) Viele Viren nutzen die zelleigene Kerntransportmaschinerie für Proteine zum Transport ihrer DNA in den Zellkern

10

HIV und andere Lentiviren, die in der Lage sind, ruhende Zellen zu infizieren, benutzen virale Proteine und die zelleigene Transportmaschinerie, um ihre DNA in den Kern zu transferieren. Die NLS im Vpr- und im Matrix-Protein des HIV-Präintegrationskomplexes (Gallay et al., 1996) sind essentiell für die Infektion von Zellen, die sich nicht teilen (Naldini et. al., 1996).

15

Obwohl wenig über den Weg bekannt ist, wie Viren ihr Genom in den Nukleus bringen, könnte die Hilfe viraler Strukturproteine mit NLS geradezu ein generelles Prinzip sein. Dafür sprechen auch die folgenden Beobachtungen. Eine spezifische Mutation im HSV Kapsidprotein verhindert den Transport viraler DNA in den Nukleus (Batterson et al., 1983). Adenovirus-DNA wird zusammen mit dem Hexon-Protein des aufgelösten Kapsids in den Kern transportiert (Greber et al., 1993). Der Transport von SV40 DNA in den Zellkern wird durch ein virales Protein (höchstwahrscheinlich Vp3) bewirkt, das dafür mit der DNA assoziiert bleibt (Nakanishi et al., 1996). Zwei bakterielle Proteine mit NLS sind verantwortlich für den Import der T-DNA des *Agrobacterium tumefaciens* in Pflanzenzellkerne (Citovsky et al., 1994).

20

25

Wegen der Fähigkeit mancher Viren zur Infektion ruhender Zellen werden mutierte Varianten von, z. B., HIV, Adenovirus und Herpesvirus als DNA-Transfervehikel für die Entwicklung von Gentherapieansätzen eingesetzt. Dies birgt zum einen das Risiko immunologischer Reaktionen gegenüber Virusbestandteilen (Friedmann 1994, 1996), zum anderen werden in solchen Systemen Helferzelllinien eingesetzt, bei denen die Freisetzung weniger stark mutierter Virusgenome nicht ausgeschlossen ist. Schließlich ist die Handhabung dieser Systeme aufwendig.

30

Es sind einige künstliche Systeme beschrieben worden, die mit Hilfe von Peptiden oder Proteinen mit Kerntransportsignalen die Transfektionseffizienz erhöhen sollen.

A) Proteine

5

Kaneda et. al. (1989) und Dzaou und Kaneda, (1997, **Patent EP oder US 5,631,237**) beschreiben ein Gentransfer-System, das auf der Verwendung von Sendai-Viren, Liposomen und hinzugefügten Proteinen beruht, welche den Kerntransport der DNA unterstützen sollen. Die Arbeitsgruppe setzt dazu HMG-1 ("high mobility group 1 protein") ein, ein basisches Nicht-Histon-Protein des Chromatins, das an DNA bindet. HMG-1 bindet DNA über einen
10 langen basischen Bereich. Es ist im Kern lokalisiert, hat aber kein bekanntes NLS. HMG-1 Protein bildet in vitro mit Vektor-DNA Komplexe. Die Herstellung gereinigten HMG-1 ist aufwendig.

15 Mistry et al. (1997) beschreiben Versuche zum HMG-1-vermittelten Kerntransport. Hier wird HMG-1 wegen seiner positiven Ladung als DNA-komplexierendes Transfektionsreagenz auch zum Durchtritt der DNA durch die Zellmembran benutzt. Die Effizienz ist gering. Die Firma Wako BioProducts (Richmond, VA, USA) bot (1997) die Proteine HMG-1 und -2 zur Vermittlung des Kerntransportes als Zusatz zu Lipofektionsreagenzien an.

20

Einen ähnlichen Ansatz verfolgten Fritz et al. (1996) mit Kalbsthymus-Histonen oder einem rekombinanten Protein aus dem NLS von SV40 und humanem Histon H1. Beide bilden mit der DNA offensichtlich große Komplexe, die zwar, wie in der Veröffentlichung gezeigt, für den Zellmembran-Durchtritt, nicht aber für den Kerntransport geeignet sind.

25

B) Wegen der einfacheren und preiswerteren Herstellbarkeit wurden auch synthetische Peptide mit NLS-Sequenz eingesetzt.

Die Arbeitsgruppe von P. Aleström (Collas et al., 1996, Collas und Aleström, 1996, 1997a, b) benutzt das NLS Peptid von SV40, um damit DNA zu komplexieren und diese von der Zelle in
30 den Kern transportieren zu lassen. Diese DNA-Bindung findet allein über die für die Funktion essentiellen, positiv geladenen Aminosäuren im NLS statt. Das führt dazu, daß das eigentliche

Signal für die Kerntransportproteine so lange von der DNA maskiert ist, wie die DNA mit dem Peptid verbunden ist. In isolierten *in vitro* gebildeten männlichen Vorkernen aus Seeigelspermien konnte in Lysat befruchteter Zebrafischeier ein NLS-abhängiger Transport Fluoreszenz-markierter DNA beobachtet werden. Bei einem molaren Verhältnis von $\geq 100:1$ (NLS-Peptid:Vektor) und ≥ 1000 Vektorkopien pro Zelle konnte in Zebrafischembryonen eine Erhöhung der Expression von Luziferase beobachtet werden, wenn die Vektor-DNA ins Zytoplasma der Zellen microinjiziert wurde (bei 100 Peptiden/Vektor und 1000 injizierten Vektoren eine 6-fache Erhöhung im Vergleich zu 0 Peptid). Daß überhaupt ein Effekt zu beobachten ist, könnte daran liegen, daß bei hoher Dichte nicht alle NLS vollständig an die DNA binden und so Teile für die Transportmaschinerie zugänglich bleiben (vergl. Sebastyén et al., 1998). Die Transportmaschinerie ist wahrscheinlich in der Lage, aus zwei Peptidsequenzen zusammengesetzte Signale zu erkennen (Boulikas 1993).

Von Sebastyén et al. (1998) wurden viele hundert NLS-Peptide von SV40 kovalent an DNA-Moleküle gekoppelt, und zwar verteilt über den gesamten DNA-Strang. Die DNA kann aufgrund ihrer massiven Modifizierung nicht mehr transkribiert werden und wird, wie auch in der Veröffentlichung diskutiert, offensichtlich erst dann in den Kern transportiert, wenn so viele NLS-Peptide gebunden sind, daß aus sterischen Gründen nicht mehr alle durch die Interaktion mit den negativen Ladungen der DNA maskiert werden.

Gopal (US Patent 5670347) beschreibt ein Peptid, das aus einer DNA-bindenden basischen Region, einer flexiblen „hinge“ Region und einem NLS besteht. Da auch hier die DNA-Bindung über positive Ladungen der Aminosäuren erreicht wird, bildet das Reagenz mit der DNA Komplexe, die gleichzeitig dem Transport durch die Zellmembran dienen sollen. Es ist nicht ersichtlich, warum die NLS-Sequenz nicht an der DNA-Bindung beteiligt sein sollte, so ist wahrscheinlich wieder das eigentliche Signal für die Kerntransportproteine so lange von der DNA maskiert, wie die DNA mit dem Peptid verbunden ist. Außerdem können die entstehenden Komplexe sehr groß werden (Emi et al., 1997, Niidome et al., 1997, Wadhwa et al., 1997, Trubetskoy et al., 1998), was einen Transport durch die Kernporen beeinträchtigen würde (Lanford et al., 1986, Yoneda et al., 1987, 1992). Ein Effekt, der über die bekannte Wirkung von polykationischen Peptiden als Transfektionsreagenz, das den Durchtritt der DNA

durch die Zellmembran unterstützt (Sorgi et al., 1997, vergl. Hawley-Nelson et. al., 1997), hinausgeht, ist nicht gezeigt.

Gerhard et al. (DE-OS 195 41 679) schlagen NLS-Polylysinkonjugate für den Gentransfer vor.
5 Auch hierfür gilt, daß die entstehenden Komplexe aus kationischem Polylysin, kationischem NLS und DNA das eigentliche Kerntransportsignal maskieren, solange es mit der DNA verbunden ist.

Szoka (PCT von 1993 Claim 23-27) koppelt NLS-Peptide über ein interkalierendes Agens an
10 DNA. Nach einer Vorinkubation von Vektor und Peptid (im Verhältnis 1:300) erhöht sich die Effizienz einer Lipofektion 4-5-fach. Das verwendete SV40-Peptid ist aufgrund seiner stark positiven Ladung in der Lage, DNA zu komplexieren. Komplexierung von DNA mit kationischen Peptiden führt zur Erhöhung der Effizienz einer Lipofektion durch Verbesserung
15 der Effizienz des Durchtritts durch die Zellmembran (Sorgi et al., 1997, vergl. Hawley-Nelson et. al., 1997). Ein Kerntransport wird dadurch, zumindest wenn große Komplexe entstehen, eher behindert (s.o.). Da die verwendeten NLS-Peptide selbst aufgrund ihrer Ladung an die DNA binden, wird die Erkennung des Transportsignals für die Kerntransportmaschinerie behindert (s.o.). Die im Beispiel aufgeführte Verwendung von mutagenen Interkalatoren schränkt die Anwendbarkeit ein. Szoka schlägt weitere Moleküle für die Transfektion vor, die
20 DNA ebenfalls nicht-kovalent und unspezifisch binden, aber nicht verhindern können, daß das NLS-Peptid wie zuvor selbst an die DNA bindet und diese komplexiert. Auf das Problem einer direkten Bindung des NLS-Peptides an die DNA wird nicht eingegangen.

Hawley-Nelson et al. (US Patent 5736392) beschreiben ein vergleichbares System. Ein NLS-
25 Peptid wird entweder direkt oder nach kovalenter Kopplung an ein DNA-bindendes Molekül mit Vektor-DNA gemischt. Die entstehenden Komplexe werden anschließend für Lipofektion (oder andere Transfektionen) eingesetzt. In diesem System erhöht die Zugabe eines polykationischen Peptids ohne NLS die Transfektionseffizienz sogar stärker als die Zugabe eines kationischen NLS. Die Kopplung von Spermidin an das NLS-Peptid bewirkt keine
30 weitere Erhöhung der Transfektionseffizienz. Also ist auch hier der Verstärkungseffekt allein durch die Komplexierung der DNA über kationische Peptide zu erklären. Da das

Vorhandensein von NLS die Transfektionseffizienz nicht weiter erhöht, ist davon auszugehen, daß auch hier die Erkennungssequenz für die Kerntransportmaschinerie maskiert ist.

Die Firma TIB Molbiol (Broschüre 1998) beschreibt den Transport von PNA-Oligonukleotiden mit einem C-terminalen NLS-(Nuclear Localization Signal)-Peptid, um die Genexpression ausgewählter Gene spezifisch zu unterdrücken. Das NLS dient hier dem Transport der PNA-Oligonukleotide in den Kern, damit sie dort mit der Zielsequenz hybridisieren können.

Die bisher bekannten Agenzien zum Transport von DNA in den Zellkern haben den Nachteil, daß die Effizienz sehr gering ist. Diese niedrige Effizienz reicht aber nicht aus, um teilungsinaktive Zellen transfizierbar zu machen.

Es war daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Kerntransportagenz bereitzustellen, daß einen effizienten Transport von DNA in den Kern ermöglicht, so daß auch ruhende oder sehr schwach teilungsaktive Zellen in einem sinnvollen Maße transfizierbar sind.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Kerntransportagenz bestehend aus zwei Modulen A und B, wobei Modul A spezifisch an DNA bindet und nicht durch unspezifische Bindung zur Bildung von Komplexen mit mehr als einem DNA-Molekül führt und Modul B ein Kernlokalisationsignal oder ein Nicht-NLS-Signal enthält, das nicht unspezifisch an DNA bindet. Ein bevorzugtes erfindungsgemäße Kerntransportagenz umfaßt ein Modul A, das sequenzspezifisch an die DNA bindet und/oder spezifisch an DNA-Enden bindet. Besonders bevorzugt ist ein Kerntransportagenz bei dem das Modul A ein synthetisches Peptid, ein Protein oder eine PNA (peptide nucleic acid) ist.

25

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Kerntransportagenz enthält Modul B ein erweitertes Kernlokalisationsignal, das aufgrund seiner Ladungen keine Komplexe mit DNA bildet. Bevorzugt ist ein Kerntransportagenz bei dem Modul B ein erweitertes Kernlokalisationsignal enthält, das eine annähernd neutrale Summenladung aufweist. Besonders bevorzugt ist ein Kerntransportagenz bei dem Modul B ein erweitertes Kernlokalisationsignal enthält, das ein Kernlokalisationsignal und flankierende negativ geladene Aminosäuren umfaßt. Eine NLS-Sequenz muß nicht identisch mit einer natürlich

30

vorkommenden NLS-Sequenz sein, sie kann auch eine auf theoretischen Überlegungen basierende Aminosäureabfolge sein, solange sie als NLS funktioniert. Modul B kann weiter Peptidsequenzen oder nicht Peptidkomponenten enthalten, die nicht direkt zum Kernlokalisierungssignal oder erweiterten Kernlokalisierungssignal zu zählen sind. Vorzugsweise
5 eine Komponente, die den Abstand zwischen Kernlokalisierungssignal und Modul A erhöht.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Gentransfersystem umfassend ein erfindungsgemäßes Kerntransportagenz und ein kationisches Lipid, Peptid, Polyamin oder kationisches Polymer.

10 Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Transport von DNA in den Kern eukaryontischer Zellen, vorzugsweise primäre Zellen, wobei die Zellen mit der zu transportierenden DNA und dem erfindungsgemäßen Kerntransportagenz nach dem Stand der Technik entsprechenden Methoden transfiziert werden.

15 Eine zusätzliche Ausführungsform betrifft die Verwendung von des erfindungsgemäßen Kerntransportagenz in der Gentherapie, insbesondere zur Behandlung von Krebs, Virusinfektionen, Erkrankungen des Nervensystems, Transplantatabstoßung sowie monogenen oder polygenen Erbkrankheiten.

20 Der Ausdruck "unspezifische Bindung des Kernlokalisierungssignals an DNA", wie er im Zusammenhang mit dieser Erfindung verwendet wird, meint eine Bindung, die zur Folge hat, daß das Kernlokalisierungssignal nicht mehr vollständig von der Kerntransportmaschinerie erkennbar ist.

25 Der Ausdruck "spezifische Bindung des Moduls A an DNA", wie er im Zusammenhang mit dieser Erfindung verwendet wird, meint einerseits eine sequenzspezifische Bindung, bei der die Abfolge der DNA Nukleotide für die Bindung ausschlaggebend ist, andererseits eine kovalente Bindung an DNA, die durch DNA Einzel- oder Doppelstrangenden vermittelt wird.

30 Der Ausdruck "erweitertes Kernlokalisierungssignal", wie er im Zusammenhang mit dieser Erfindung verwendet wird, meint daß ein Kernlokalisierungssignal zusätzliche, flankierende

Aminosäuren aufweist. Bevorzugt ist ein erweitertes Kernlokalisierungssignal, das 2-40, vorzugsweise 4-20, zusätzliche, flankierende Aminosäuren aufweist.

Der Ausdruck "erweitertes Kernlokalisierungssignal, das aufgrund seiner Ladungen keine Komplexe mit DNA bildet", wie er im Zusammenhang mit dieser Erfindung verwendet wird, meint, daß Modul B ein Kernlokalisierungssignal enthält, dessen Ladung so verteilt ist, daß es nicht unspezifisch mit DNA interagiert und daher für die Kerntransportmaschinerie vollständig zugänglich bleibt.

Der Ausdruck "annähernd neutrale Summenladung", wie er im Zusammenhang mit dieser Erfindung verwendet wird, meint, daß der erweiterte Teil des Kernlokalisierungssignals negativ geladene Aminosäuren aufweist, um die positive Ladung des eigentlichen Kernlokalisierungssignals auszugleichen, so daß nicht mehr als drei positive Ladungen im Überschuß im gesamten Bereich des erweiterten Kernlokalisierungssignals vorkommen.

Das erfindungsgemäße Kerntransportagenz hat den Vorteil, das es nicht zu einer Komplexierung der DNA führt. Ein weiterer Vorteil ist, daß das Kernlokalisierungssignal frei zugänglich für die Kerntransportmaschinerie bleibt. Die Vermeidung von großen, den Kerntransport behindernden DNA-Komplexen und das Freibleiben der Kernlokalisierungssignale für die Kerntransportmaschinerie bei Verwendung der erfindungsgemäßen Kerntransportagenzien führen zu einem deutlich effizienteren Transport der DNA in den Kern.

Erfindungsgemäß führen weder der DNA-bindende Anteil (Modul A) noch das Kernlokalisierungssignal (Modul B) zur Bildung großer DNA-Komplexe.

Modul A

Modul A bindet spezifisch an DNA und führt nicht zur Bildung von Komplexen mit mehr als einem DNA-Molekül. Modul A bindet entweder sequenzspezifisch (d. h. nicht unspezifisch allein aufgrund positiver Ladungen), oder kovalent an DNA-Enden.

Modul A kann ein Peptid unterschiedlicher Länge oder ein Protein sein oder eine PNA-Sequenz (Nielson et al., 1991) oder eine andere Substanz, die sequenzspezifisch an Nukleinsäuren bindet. Modul A kann weiterhin ein rekombinantes Protein sein, das sequenzspezifisch an DNA

bindet, wie z. B. der lac-Repressor oder eine hochaffine Mutante davon (Kolkhof, 1992, Fieck et al., 1992) oder eine retrovirale Integrase, die sequenzspezifisch an DNA-Enden (mit einer LTR core-Sequenz) bindet (Ellison und Brown, 1994).

- 5 Eine kovalente Bindung an ein Strangende kann biologisch, z.B. durch die Topoisomerase I des Poxvirus, vermittelt werden, wenn das Strangende einer linearen DNA eine Sequenz trägt, die als „Suizid-Substrat“ zwar einen Topoisomereschnitt aber keine Religation ermöglicht (Shuman, 1994).

10 Modul B

Modul B ist ein Kernlokalisationsignal oder ein Nicht-NLS-Signal, das nicht unspezifisch an DNA bindet.

- 15 Der Begriff Nicht-NLS-Signale bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung Signale, die keine Kernlokalisationssignale sind, die aber im Rahmen von Transfektion, Gentherapie oder DNA-Vakzinierung dem Transport der DNA in die Zelle oder dem Transport von DNA innerhalb der Zelle dienen.

- 20 Zu den Nicht-NLS-Signalen zählen unter anderem: Liganden für zelluläre Oberflächenstrukturen, die DNA-Aufnahme, z.B. die Rezeptor-vermittelte, vermitteln können; Peptide, die Membranen destabilisieren, z.B. zur Förderung des frühzeitigen Austritts der DNA aus den Endosomen; Signale, die in der Zelle die Bindung an Transportstrukturen vermitteln, um einen intrazellulären Transport zum Kern zu begünstigen.

- 25 Das Kernlokalisationsignal ist vorzugsweise ein erweitertes Kernlokalisationsignal (wie vorstehend definiert), das aufgrund seiner Ladungen oder räumlichen Ausrichtung im Bezug zum DNA bindenden Modul A keine Komplexe mit DNA bildet.

Das Kernlokalisationsignal kann synthetisch hergestellt werden, oder als Teil eines Proteins vorliegen.

- 30 Bei einem Kernlokalisationsignal, wie es im erfindungsgemäßen Kerntransportagenz eingesetzt wird, werden solche Signalsequenzen - mit und ohne flankierende Regionen - verwendet, die nicht so über ihre positiven Ladungen an die DNA binden, daß diese Ladungen, die einen

essentiellen Teil der meisten Kerntransportsignale ausmachen, als Signal für die Kerntransportmaschinerie maskiert sind.

Modul B kann, neben dem Kernlokalisierungssignal, oder Nicht-NLS-Signal, Peptidsequenzen
5 oder nicht-Peptidkomponenten enthalten, die nicht dem Kernlokalisierungssignal oder dem erweiterten Kernlokalisierungssignal zuzurechnen sind. Sie dienen vorzugsweise der besseren sterischen Ausrichtung des Kernlokalisierungssignals, insbesondere der Erhöhung des Abstandes zur DNA.

10 Gut geeignet sind erweiterte Sequenzen klassischer NLS, wenn die Summenladung des Peptids durch flankierende negativ geladene Aminosäuren annähernd ausgeglichen werden kann. Diese Aminosäuren können im Protein an diesen Positionen natürlicherweise vorkommen oder aufgrund struktureller Überlegungen dort eingeführt worden sein. In der Nachbarschaft vieler NLS „core“ Sequenzen liegen im ursprünglichen Kontext negative Aminosäuren (Xiao et al.,
15 1997). Für ein NLS aus SV40, das das am besten untersuchte ist, konnte gezeigt werden, daß diese flankierenden Sequenzen die Effizienz des Kerntransportes deutlich erhöhen (Rihs und Peters, 1989, Rihs et al., 1991, Chen et al., 1991, Jans et al., 1991, Xiao et al., 1997). Ein großes Protein (IgM) wurde nur nach chemischer Kopplung des um benachbarte Sequenzen erweiterten SV40-NLS in den Kern transportiert, nicht aber nach Kopplung des SV40 „core“
20 NLS-Peptides (Yoneda et al., 1992).

Ist das NLS Teil eines sequenzspezifisch an die DNA bindenden Proteins, ist die Gefahr einer Maskierung dieser Sequenz(en) durch die DNA relativ gering. Auch hier können aber wegen der höheren Effizienz verlängerte NLS-Sequenzen verwendet werden.

25 Auch sogenannte Nicht-klassische-NLS, wie z.B. ein NLS aus dem Influenza Virus "nucleoprotein" (Wang et al., 1997, Neumann et al., 1997), die keinen großen Überschuß an positiven Ladungen besitzen oder nicht über den klassischen Transportweg in den Kern gelangen, können Verwendung finden.

30 Eine (nicht vollständige) Übersicht über NLS, wie sie hier gemeint sind, gibt T. Boulikas (1993, 1996, 1997).

Schließlich können auch solche Kerntransportsignale Verwendung finden, die Komponenten der Kerntransportmaschinerie selbst entnommen sind, so z.B. die Importin β bindende Domäne (IBB) von Importin α . Das NLS bindende Protein Importin α ist über diese Domäne mit der restlichen Kerntransportmaschinerie verbunden (Görlich et al., 1996, Weiss et al., 1996)

5

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird ein Nicht-NLS-Signal über PNA (als Modul A) an vorhandene Vektorsequenzen gebunden. Die Bindung zwischen PNA und Vektor ist sequenzspezifisch. Dies ermöglicht, solche Nicht-NLS-Signale an fast alle gängigen Expressionsvektoren zu koppeln, ohne daß diese verändert werden müssen.

10

Zur sequenzspezifischen Bindung von PNA an die DNA werden ausschließlich solche DNA-Sequenzen des Vektors benutzt, deren Maskierung durch PNA dem späteren Verwendungszweck der DNA nicht wesentlich schadet. Bei Expressionsvektoren werden vor allem Sequenzen im Plasmidrückgrat verwendet, besonders solche, die in den meisten gängigen Expressionsvektoren vorkommen (z.B. Promotor des Ampicillin-Resistenzgens), aber auch eine Bindung im nicht-kodierenden Strang im Expressionsbereich ist möglich. Ein Vorteil der sequenzspezifischen Bindung ist, daß eine einfache und schnelle Bindung von PNA-Peptid-Hybrid an die DNA stattfindet. In Beispiel 2 ist z.B. eine einfache und schnelle Bindungsreaktion (5 min., 65°C) von PNA-Peptid-Hybriden an doppelsträngige DNA gezeigt.

15

Zwischen PNA-Anteil und dem eigentlichen Signal kann ein Spacer liegen. Der Spacer kann dazu dienen, den Abstand von Signal zur DNA zu erhöhen, z.B. um sterische Behinderungen zu verringern. Der Spacer kann auch dazu dienen, eine Sollbruchstelle einzuführen, um z.B. im endosomalen Milieu die Abtrennung eines Liganden zu erlauben, über den die DNA an einen endozytierten Zelloberflächenrezeptor gebunden ist.

20

Die vorliegende Erfindung macht erstmals ruhende und schwach teilungsaktive Zellen zu einem Prozentsatz transfizierbar, der eine nachfolgende Analyse ermöglicht. Die meisten frisch aus dem Körper eines Tieres oder eines Menschen isolierten Zellen (primäre Zellen) teilen sich nicht oder so selten, daß DNA, die erfolgreich durch die Zellmembran transportiert worden ist, inaktiviert wird, bevor sie in den Kern gelangen und exprimiert werden kann. Das führte bisher dazu, daß diese primären Zellen untransfizierbar waren, es sei denn, sie wurden in Kultur künstlich zur Teilung stimuliert. Dies hat allerdings immer zur Folge, daß sie sich vom

25

30

ursprünglichen Zustand entfernen. Eine Technik zur Transfektion primärer Zellen ermöglicht die Analyse von genetischem Material unter den ursprünglichen Bedingungen einer Körperzelle, was für die Erforschung der Wirkungsweise von Genen und für die Erforschung von Prozessen innerhalb einer Körperzelle von großer Bedeutung ist.

5

Die erfindungsgemäße Lehre, die primäre Zellen transfizierbar macht, stellt außerdem einen essentiellen Schritt zu einem komplett künstlichen Gentransfersystem für die Gentherapie dar. Ein solches Gentransfersystem muß drei funktionale Komponenten besitzen: eine Komponente für den Durchtritt der DNA durch die Zellmembran, wofür sich kationische Lipide und andere kationische Polymere als relativ gut geeignet erwiesen haben, eine weitere für den Transfer der DNA in den Kern der (meist teilungsinaktiven) Zielzellen und eine dritte, die für die Integration der DNA ins Genom sorgt. Erfindungsgemäß wird erstmals hier ein effizientes Agenz beschrieben, das als zweite Komponente dienen kann. Ein komplett künstliches Gentransfervehikel, das in der Gentherapie eingesetzt werden kann, wird aller Erwartung nach leichter und billiger herzustellen und leichter zu handhaben sein als die momentan angewendeten viralen Systeme und ist nicht mit den immanenten Risiken dieser Systeme behaftet. Gentherapeutische Ansätze sind z.B. für die Behandlung von Krebs, AIDS und diversen Erbkrankheiten vorgeschlagen worden und werden eine sehr große Rolle in der Medizin spielen.

20

Die erfindungsgemäß beschriebenen Kerntransportagenzien erhöhen die Effizienz der Transfektion in solche Kulturzellen, die bisher schon transfizierbar waren, indem nun auch diejenigen Zellen DNA in den Kern aufnehmen können, die sich im Zeitfenster zwischen Durchtritt der DNA durch die Zellmembran und Analyse nicht teilen. Das ist deshalb von Bedeutung, weil auch bei vielen etablierten Zelllinien eine Erhöhung der Transfektionseffizienz die Analyse erleichtern und durch den geringeren Bedarf an Zellmaterial die Kosten senken würde. Natürlich gilt dies auch für alle Zwischenstufen zwischen primären Zellen und etablierten Zelllinien.

30

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung und sind nicht als beschränkend aufzufassen.

Beispiel 1: PNA-Peptid-Hybride

Es wurden NLS-PNA-Kerntransportreagenzien verwendet. Es wurden solche PNA-Sequenzen eingesetzt, die in der Lage sind, in den DNA-Doppelstrang einzuwandern (Nielson et al., 1991, 5 Nielson, US-Patent 5,539,082).

Im Plasmidrückgrat fast aller Expressionsvektoren finden sich im Ampicillinresistenzgen und im Replikationsursprung zwei gut geeignete Sequenzen für eine solche hochaffine PNA-Bindung.

Die verwendeten Peptide enthalten als Peptidbestandteile: entweder

- 10 1) "SV21": NH₂-GKPTADDQHSTPPKKKRVED-COOH (Peptid 1; SEQ ID NO:1),
oder
2) "SV27" NH₂-GKPSSDDEATADSQHSTPPKKKRVED-COOH (Peptid 2; SEQ ID NO:2).

15 Jeweils am N-Terminus beider Peptide befindet sich die folgende PNA-Sequenz: Entweder

- A) "ori": NH₂-CCTTTCTCCCTTC-Peptid (SEQ ID NO:3) oder
B) "ssp" : NH₂-CTCTTCCTTTTTC-Peptid (SEQ ID NO:4) oder
C) die Peptid/PNA-Mischsequenz NH₂-CCTTT-GGGGGGG -TTTCC-Peptid (SEQ ID NO:5), für die es ca. 30 Bindungsstellen in einem durchschnittlichen Expressionsvektor (5 kb)
20 gibt (G = die Aminosäure Glycin).

5 µg in Wasser gelöster Vektor-DNA wurden in 10 µl 25 µM NLS-PNA für 10 min bei 60°C inkubiert. Dann wurde das Reaktionsgemisch mit RPMI auf ein Volumen von 250 µl aufgefüllt.

- 25 5x10⁶ Chinese hamster ovary (CHO)-Zellen wurden bei 60 bis 80% Konfluenz mit 5 mM EDTA abgelöst, in 15 ml PBS gewaschen (10 min bei 50xg abzentrifugiert). Das Pellet wurde in 250 µl RPMI aufgenommen und mit der vorinkubierten DNA gemischt, in eine Elektroporationsküvette (0,4 cm Spaltbreite) überführt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Elektroporation (210 V, 975 µF, BioRad Genepulser) wurde die Küvette
30 weitere 10 min bei 37 °C inkubiert, bevor die Zellen in vorgewärmtem Medium ausplattiert wurden.

Um eindeutig zu zeigen, daß solche Zellen transfiziert wurden, die sich vom Beginn des Experiments bis zur Analyse nicht geteilt hatten, wurden die Zellen mit pMACS4.1 (einem Expressionsvektor für humanes CD4) mit der beschriebenen Methode transfiziert und die Zellteilung wurde folgendermaßen gemessen. Durch Inkubation in 1 µM Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidester (CFDA, SE) (Molecular Probes, Eugene, USA) wurden die Zellen vor der Transfektion grün-fluoreszent markiert. Durch Teilung halbiert sich die Helligkeit der Zellen. Mit dem Durchfluß-Zytometer (FACSCalibur) wurde dann auf Einzelzell-Niveau bestimmt, daß Zellen, die sich nicht geteilt haben (volle grüne Fluoreszenz) das transfizierte Gen ausprägen (dunkelrote Fluoreszenz nach Färbung mit Cy5-gekoppeltem anti-CD4 Antikörper).

Beispiel 2: Schnelle Bindung von PNA-NLS an vorhandene Vektorsequenzen

Es wurden PNA-Peptid-Hybride an doppelsträngige DNA gebunden.

Eine vorhandene Vektorsequenzen kann innerhalb von 5 min fast quantitativ (>90%) über PNA mit einem NLS-Peptid markiert werden. Für eine Bindung hitzelabiler Komponenten über PNA reicht eine einstündige Inkubation bei 37°C aus, um den größten Teil der DNA zu markieren (Tabelle 1). 100 ng eines Expressionsvektors wurden in TE (pH 7,8) mit 25 µM verschiedener PNA-Peptid-Hybride bei 65°C oder 37°C für fünf Minuten bis drei Stunden inkubiert. Die verwendete PNA-Sequenz NH₂-CTCTTCCTTTTTC-COOH (SEQ ID NO:6) bindet im Promoterbereich des Ampicillinresistenzgens. Am C-Terminus befindet sich ein Peptid von 21 Aminosäuren (Peptid 1) oder 27 Aminosäuren (Peptid 2) Länge oder ein Spacer aus 10 AEEA-Einheiten (Fmoc-AEEA-OH Spacer, PerSeptive Biosystems, Inc., Framingham, USA) gefolgt von 27 Aminosäuren (Peptid 3). Die Bindungsansätze wurden danach mit der Restriktionsendonuklease EarI umgesetzt. Die gespaltene DNA wurde mit YOYO (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) gefärbt, auf einem Agarosegel aufgetrennt und mit einem Fluoreszenz-Lesegerät (Image Plate Reader FLA 2000, Auswertungssoftware L-Process, Version 1.6, Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokio) quantifiziert. An der PNA-Bindungsstelle wird die Spaltung der DNA durch die Restriktionsendonuklease verhindert, andere EarI-Schnittstellen dienen der internen Kontrolle der Reaktion.

°C	min.	Peptid 1	Peptid 2	Peptid 3
65	5	94%	96%	91%
	10	96%	97%	95%
	15	96%	97%	95%
37	60	85%	90%	74%
	120	91%	91%	76%
	180	94%	94%	90%

Tab.1 Anteil peptidmarkierter DNA in Prozent der eingesetzten DNA

- 5 Die Bindereaktion der PNA an die DNA ist einfach, robust und schnell. Die Bindung ist praktisch irreversibel und damit geeignet für zelluläre Transportvorgänge. Peptide und PNA sind billiger herzustellen und länger und einfacher zu lagern als Proteine.

Beispiel 3: Transfektion mit PNA-NLS

10

Bei teilungsaktiven Zelllinien führt aktiver Kerntransport transfizierter DNA dazu, daß diese früher exprimiert werden kann als DNA, die nicht transportiert wird. Unter der Voraussetzung, daß transfizierte DNA im Zytoplasma lange genug überdauert, sollten sich in stark teilungsaktiven Zellen die Expressionsraten transfizierter DNA mit und ohne Kerntransportreagenz allmählich aneinander annähern. Dies ist darin begründet, daß im Zytoplasma vorhandene transfizierte DNA während der Zellteilung in den Kern gelangen kann. Mit Aphidicolin läßt sich die Teilungsaktivität und damit auch die Transfizierbarkeit stark reduzieren, aktiver Kerntransport hebt diesen Effekt der reduzierten Transfektionseffizienz wieder auf.

20

Für die Elektroporation wurden 5 µg in Wasser gelöster linearisierte Vektor-DNA in 10 µl mit und ohne 25 µM PNA-NLS (Peptid 3: NH₂-(AEEA)₁₀-GKPSSDDEATADSQHSTPPKKKRKVED-COOH.) für 10 min bei 65°C inkubiert. Dann wurde weiter verfahren wie in Beispiel 1 beschrieben. Für die Lipofektion wurden 3 µg in Wasser gelöster Vektor-DNA in 10 µl mit und ohne 25 µM PNA-NLS (Peptid 3) für 10 min

bei 65°C inkubiert. Die Transfektion mit Lipofectamine (Life Technologies GmbH, Karlsruhe) erfolgte danach entsprechend den Herstellerangaben.

Um die Teilung von CHO Zellen wesentlich zu inhibieren, wurden sie für 24 Stunden ohne Serum und dann für weitere 12 Stunden mit Serum und 20 µg/ml Aphidicolin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) inkubiert. Alle nachfolgenden Schritte der Lipofektion wurden in
5 Gegenwart von 20 µg/ml Aphidicolin durchgeführt. Die Ergebnisse der Transfektion sind in Figur 1 dargestellt.

Zwei elektrisch neutrale NLS, die an eine in den meisten Expressionsvektoren vorhandene
10 Sequenz gebunden sind, sind in der Lage, den Prozentsatz transfizierter Zellen früh nach einer Transfektion zu verdoppeln, obwohl sich erst wenige Zellen geteilt haben. Die Verringerung der Transfektionseffizienz durch eine Reduktion der Zellteilung mit Aphidicolin läßt sich auf diese Weise wieder aufheben.

15 Beispiel 4: Sequenzspezifisch bindendes NLS-Fusionsprotein

Als sequenzspezifisch DNA-bindendes Protein wurde eine hochaffin bindende Mutante des lac-Repressors aus E. coli eingesetzt. Diese Mutante hat eine Bindungskonstante von 10^{-15} M für die lac-Operatorsequenz (Kolkhof, 1992). Die hohe Affinität wird durch einen
20 Aminosäureaustausch Serin 61 zu Leucin erreicht.

Die hier verwendeten Kerntransportproteine weisen eine Deletion der letzten dreißig C-terminalen Aminosäuren (Position 331 – 360) und einen Austausch des Leucin in Position 330 zu einem Serin auf. Diese mutierten Proteine bilden Homodimere anstelle von Homotetrameren und haben dadurch nur eine DNA-Bindungsstelle anstelle von zweien. Aber auch Tetramere
25 können für ein erfindungsgemäßes Kerntransportagenz eingesetzt werden.

Die Dimer-Varianten wurden am N-Terminus um jeweils ein NLS verlängert:

“N1D” NLS1: **MPKKKRKV-MKPVTLYDVA**.....

“N2D” NLS2: **MEEDTPPKKRKVEDL-KPVTLYDVA**.....

(Die NLS-Sequenzen sind hier durch Fettdruck hervorgehoben und entsprechen SEQ ID NO:8
30 bzw. SEQ ID NO:9. Die Sequenzen MKPVTLYDVA ... und KPVTLYDVA ... bezeichnen den vorstehend beschriebenen lac-Repressor aus E.coli.)

NLS1 entspricht dem NLS des großen T-Antigens des SV40 Virus. NLS2 ist ein der Summenladung nach neutrales Hybrid aus dem SV40-NLS und der N-terminal flankierenden Region des NLS des Polyoma-Virus VP2-Proteins.

Lac-Operatorsequenzen kommen in einer Reihe von Expressionsvektoren vor und lassen leicht
5 als Überhang eines PCR-Primers mit jeder beliebigen Sequenz verknüpfen.

Beispiel 5: DNA-Bindung von lac-Repressor Mutanten mit NLS

Für Bindungsstudien wurden folgende lac-Operator-Sequenzen verwendet:

10 der natürlich vorkommende Operator: AATTGTGAGC GGATAACAATT und eine perfekt palindromische Operator-Sequenz: AATTGTGAGC GCTCACAATT. Es wurden 0,7 ng eines radioaktiv markierten DNA-Fragments von 1kb Länge durch Restriktionsverdau in Fragmente der Länge von 914 und 86 bp zerlegt und mit lac-Repressor NLS-1-Dimer bzw. NLS-2-Dimer für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Fragmente wurden danach auf einem
15 Polyacrylamidgel aufgetrennt (Figur 2). Durch spezifische Bindung wird das 86 bp Fragment, das einen lac-Operator enthält, retardiert. Unspezifische Bindung führt zur Retardierung des 914 bp-Fragmentes, ohne lac-Operator. Bei kompletter spezifischer Bindung ist so gut wie keine unspezifische Bindung feststellbar.

20 In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, daß die Bindung stattfindet und stabil ist unter sehr unterschiedlichen Bedingungen, wie z.B. im Zellkulturmedium RPMI, in 150 mM Kochsalz oder einem Puffer aus 10 mM Tris/HCl (pH 7,2), 10 mM Kaliumchlorid und 3 mM Magnesiumacetat, mit beiden getesteten Operatorsequenzen.

25 Beispiel 6: Kerntransport von DNA durch lac-Repressor-NLS

Ca. 8 µg (100 pmol) lac-Repressor-NLS-Mutanten wurden mit 2 µg (100 pmol) einer doppelsträngigen DNA von 30 bp Länge, die an beiden Enden mit dem fluoreszenten Molekül Cy5 markiert war, in 300 µl 10 mM Tris/Cl (pH 7,2)), 10 mM KCl, 3 mM Mg-Acetat und
30 50 µg/ml BSA für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssige, nicht gebundene DNA wurde durch eine Zentrifugation durch einen Microcon-Filter (Amicon) abgetrennt und die

Probe wurde danach in Zellinjektionspuffer umgepuffert (76 mM K_2HPO_4 , 17 mM KH_2PO_4 , 14 mM NaH_2PO_4 (pH 7,2).

In jeweils 50 NIH3T3-Zellen wurde ein Gemisch aus DNA, gebunden an lac-Repressor-Mutanten, und Fluorescein-markiertem BSA (BSA-FITC) ins Zytoplasma mikroinjiziert (Eppendorf Transjektor 5246 mit Femtotips, 0,5 μ m Durchmesser, Injektionsdruck 55 hPa, Injektionszeit 0,5 sec). 10 bis 15 min nach der Injektion erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung (siehe Figur 3). Bei erfolgreicher Zytoplasmainjektion befindet sich (BSA-FITC) ausschließlich im Zytoplasma (1a, 2a, 3a). Bei Bindung an lac-Repressor-NLS-Mutanten ist in praktisch allen auswertbaren Zellen die DNA nach weniger als 15 min (NLS1-Dimer, 2b) bzw. weniger als 10 min (NLS2-Dimer, 3b) in den Kern transportiert worden und annähernd quantitativ aus dem Zytoplasma verschwunden. Kontrollexperimente zeigen, daß markierte DNA alleine im Zytoplasma bleibt (1b).

Beispiel 7: Transfektion mit lac-Repressor-NLS

15

Je 1 μ g einer linearen DNA von 1,1 kb Länge, die eine vollständige Expressionskassette und hinter der Polyadenylierungssequenz eine perfekt palindromische lac-Operator Sequenz enthält, wurde in 50 μ l isotonischen 0,5 x RPMI (für Lipofektion) oder 150 mM NaCl (für Transfektion mit Polyethylenimin) für 30 min bei Raumtemperatur mit verschiedenen Konzentrationen an lac-Repressor-Protein inkubiert, und zwar mit mit ca. 2,5 μ g, 0,3 μ g und 0,15 μ g Dimer bzw. 5 μ g, 0,6 μ g und 0,3 μ g Tetramer. Die Proben wurden danach entsprechend den Herstellerangaben mit Lipofectamine (Life Technologies) oder Polyethylenimin (PEI; ExGen 500, Fermentas) komplexiert und auf konfluente NIH3T3-Zellen gegeben. Die Ergebnisse sind in Figur 4 dargestellt.

25

Lac-Repressor-NLS kann die Transfektionseffizienz 4 h nach der Transfektion um einen Faktor von 3-4 erhöhen. Im hier aufgeführten Beispiel wurden adhärenente NIH3T3 vor der Transfektion bis zur Konfluenz kultiviert, was zu einer weitgehenden Teilungsinhibition führt. 4 h nach der Transfektion haben sich erst sehr wenige Zellen geteilt. Der Zeitraum, in dem die ohnehin schon geringe Teilungsaktivität in diesem Beispiel relevant für die Transfektion ist, wird dadurch noch verkürzt, daß die transfizierte, endozytotisch aufgenommene DNA zunächst die Endosomen und dann dem Komplex mit dem kationischen Transfektionsreagenz verlassen muß, bevor sie in

30

den Kern transportiert und exprimiert werden kann. Lipofectamine-DNA Komplexe überdauern wahrscheinlich deutlich länger als Komplexe mit Polyethylenimin, was dazu führt, daß der Effekt von lac-Repressor-NLS mit Lipofectamine weniger deutlich ausfällt. Wenn sich die meisten Zellen nach 24 h einmal geteilt haben, nähern sich die Expressionsraten transfizierter DNA mit und ohne Kerntransportreagenz allmählich aneinander an.

Literaturliste

- Batterson, W., Furlong, D. and Roizman, B. (1983) Molecular genetics of herpes simplex virus.
5 VIII. further characterization of a temperature-sensitive mutant defective in release of viral DNA and in other stages of the viral reproductive cycle. J. Virol. 45: 397
- Boulikas, T. (1993) Nuclear localization signals (NLS). Crit. Rev. Euk. Gene Expr. 3: 193
- 10 Boulikas, T. (1996) Nuclear import of protein kinases and cyclins. J. Cell. Biochem. 60: 61
- Boulikas, T. (1997) Nuclear import of DNA repair proteins. Anticancer Res. 17: 843
- Chen, Y.-R., Lees-Miller, S.P., Tegtmeier, P. and Anderson, C.W. (1991) The human DNA-
15 activated protein kinase phosphorylates simian virus 40 T antigen at amino- and carboxy-terminal sites. J. Virol. 65: 5131
- Citovsky, V., Warnick, D., and Zambryski, P. (1994) Nuclear import of *Agrobacterium* VirD2
and VirE2 proteins in maize and tobacco. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3210
20
- Collas, P., Husebye, H. and Aleström, P. (1996) The nuclear localization sequence of the SV40
T antigen promotes transgene uptake and expression in zebrafish embryo nuclei. Transg. Res.
5: 451
- 25 Collas, P. and Aleström, P. (1996) Nuclear localization signal of SV40 T antigen directs import
of plasmid DNA into sea urchin male pronuclei in vitro. Mol. Repr. Dev. 45: 431
- Collas, P. and Aleström, P. (1997 a) Rapid targeting of plasmid DNA to zebrafish embryo
nuclei by the nuclear localization signal of SV40 T antigen. Mol. Mar. Biol. Biotech. 6: 48
30
- Collas, P. and Aleström, P. (1997 b) Nuclear localization signals: a driving force for nuclear
transport of plasmid DNA in zebrafish. Biochem. Cell. Biol. 75:633

- Dowty, M.E., Williams, P., Zhang, G., Hagstrom, J.E. and Wolff, J.A. (1995) Plasmid entry into postmitotic nuclei of primary rat myotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4572
- 5 Ellison, V. and Brown, P.O. (1994) A stable complex between integrase and viral DNA ends mediates human immunodeficiency virus integration in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7316
- Emi, N., Kidoaki, S., Yoshikawa, K., Saito, H. (1997) Gene transfer mediated by polyarginine
10 requires a formation of big carrier-complex of DNA aggregate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231:421-424
- Fieck, A., Wyborski, D.L. and Short, J.M. (1992) Modifications of the E.coli Lac repressor for
15 expression in eukaryotic cells: effects of nuclear signal sequences on protein activity and nuclear accumulation. *Nucl. Acids Res.* 20: 1785
- Friedmann, T. (1994) Gene therapy for neurological disorders. *Trends in Genetics* 10: 210
- Friedmann, T. (1996) Human gene therapy - an immature genie, but certainly out of the bottle.
20 *Nature Med.* 2: 144
- Fritz, J.D., Herweijer, H., Zhang, G. and Wolff, J.A. (1996) Gene transfer into mammalian cells using histone-condensed plasmid DNA. *Human gene therapy* 7: 1395
- 25 Gallay, P., Stitt, V., Mundy, C., Oettinger, M., and Trono, D. (1996) Role of the karyopherin pathway in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. *J. Virol.* 70: 1027
- Greber, U.F., Willetts, M., Webster, P., and Helenius, A. (1993) Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* 75: 477
- 30 Görlich, D., Henklein, P., Laskey, R.A. and Hartmann, E. (1996) A 41 amino acid motif in importin-a confers binding to importin-b and hence transit into the nucleus. *EMBO J.* 15: 1810

Görlich D. (1998) Transport into and out of the cell nucleus. *EMBO J.* 17: 2721

5 Jans, D.A., Ackerfmann, M.J. Bischoff, J.R., Beach, D.H. and Peters, R. (1991) p43^{cdc2}-mediated phosphorylation at T¹²⁴ inhibits nuclear import of SV-40 T antigen proteins. *J. Cell Biol.* 115: 1203

Kaneda, Y., Iwai, K., and Uchida, T. (1989) Increased expression of DNA cointroduced with nuclear protein in adult rat liver. *Science* 243: 375

10

Kolkhof, P. (1992) Specificities of three tight-binding Lac repressors. *Nucl. Acids Res.* 20: 5035

15 Lanford, R.E., Kanda, P., Kennedy, R.C. (1986) Induction of nuclear transport with a synthetic peptide homologous to the SV40 T antigen transport signal. *Cell* 46:575-582

Mistry, A.R., Falciola, L., Monaco, L., Tagliabue, R., Acerbis, G., Knight, A., Harbottle, R.P., Soria, M., Bianchi, M.E., Coutelle, C. and Hart, S.L. (1997) Recombinant HMG1 protein produced in pichia pastoris: a nonviral gene delivery agent. *Biotechniques* 22: 718

20

Nakanishi, A., Clever, J., Yamada, M., Li, P.P., and Kasamatsu, H. (1996) Association with capsid proteins promotes nuclear targeting of simian virus 40 DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 96

25 Naldini, L., Blömer, U., Gally, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., Trono, D. (1996) In vivo gene delivery and stable transduction of non-dividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272: 263

30 Neumann, G., Castrucci, M.R. and Kawaoka, Y. (1997) Nuclear import and export of Influenza virus nucleoprotein. *J. Virol.* 71: 9690

- Nielson, P., Egholm, M., Berg, R.H. and Buchardt, O. (1991) Sequence selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-sustituted polyamide. *Science* 254:1497
- 5 Niidome, T., Ohmori, N., Ichinose, A., Wada, A., Mihara, H., Hirayama, T., Aoyagi, H. (1997) Binding of cationic alpha-helical peptides to plasmid DNA and their gene transfer abilities into cells. *J. Biol. Chem.* 272:15307-15312
- 10 Rihs, H.-P. and Peters, R. (1989) Nuclear transport kinetics depend on phosphorylation-site-containing sequences flanking the karyophilic signal of the Simian virus 40 T antigen. *EMBO J.*, 8: 1479
- Rihs, H.-P., Jans, D.A., Fan, H. and Peters, R. (1991) The rate of nuclear cytoplasmic protein transport is determined by the casein kinase II site flanking the nuclear localization sequence of the SV40 T-antigen. *EMBO J.* 10: 633
- 15 Shuman, S., (1994) Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J. Biol. Chem.* 269: 32678
- 20 Sebastyén, M.G., Ludtke, J.J., Bassik, M.C., Zhang, G., Budker, V., Lukhtanov, E.A., Hagstrom, J.E. and Wolff, J.A. (1998) DNA Vector chemistry: The covalent attachment of signal peptides to plasmid DNA. *Nature Biotech.* 16: 80
- Sorgi, F.L., Bhattacharya, S., Huang, L. (1997) Protamine sulfate enhances lipid-mediated gene transfer. *Gene Ther.* 4:961-968
- 25 Trubetskoy, V.S., Budker, V.G., Hanson, L.J., Slattum, P.M., Wolff, J.A., Hagstrom, J.E. (1998) Self-assembly of DNA-polymer complexes using template polymerization. *Nucleic Acids Res.* 26:4178-4185
- 30 Wadhwa, M.S., Collard, W.T., Adami, R.C., McKenzie, D.L., Rice, K.G. (1997) Peptide-mediated gene delivery: influence of peptide structure on gene expression. *Bioconjug. Chem.* 8:81-88

Wang, P., Palese, P. and O'Neill, R.E. (1997) The NPI-1/NPI-3 (Karyopherin α) binding site on the Influenza A virus nucleoprotein is a nonconventional nuclear localisation signal. *J. Virol.* 71: 1850

5

Weiss, K., Ryder, U. and Lamond, A.I. (1997) The conserved amino-terminal domain of hSRP1a is essential for nuclear protein import. *EMBO J.* 15: 1818

Wilke, M., Fortunati, E., van den Broek, M., Hoogeveen, A.T. and Scholte, B.J. (1996)

10 Efficacy of a peptide-based gene delivery system depends on mitotic activity. *Gene Ther.* 31:1133-1142

Xiao, C.-Y., Hübner, S. and Jans, D.A. (1997) SV40 large tumor antigen nuclear import is regulated by the double-stranded DNA-dependent protein kinase site (serine 120) flanking the nuclear localisation sequence. *J. Biol. Chem.* 272: 22191

15

Yoneda, Y., Arioka, T., Imamoto-Sonobe, N., Sugawa, H., Shimonishi, Y., Uchida, T. (1987) Synthetic peptides containing a region of SV 40 large T-antigen involved in nuclear localization direct the transport of proteins into the nucleus. *Exp. Cell Res.* 170:439-452

20

Yoneda, Y., Semba, T., Kaneda, Y., Noble, R.L., Matsuoka, Y., Kurihara, T., Okada, Y. and Imamoto, N. (1992) A long synthetic peptide containing a nuclear localization signal and its flanking sequences of SV40 T-antigen directs the transport of IgM into the nucleus effectively. *Exp. Cell Res.* 201:313

D) zitierte Patentschriften

5 Dzau, V.J. and Kaneda, Y. (1997) Method for producing in vivo delivery of therapeutic agents via liposome. N no.: 5631237

Gerhard, F., Kuhn C-S., Mittenbühler, K. und Appel K. (Offenlegungsschrift vom 15. 5. 1997)
DE 195 41 679 A1

10

Gopal, T.V. (1997) Peptide-mediated gene transfer US Patent No.: 5670347

Hawley-Nelson, P., Lan, J., Shih, P.J., Jessee, J.A. and Schifferli, K.P. (1998) Peptide-enhanced cationic lipid transfections. US. Patent No.: 5736392

15

Nielson, P.E., Buchardt, O. Egholm, M., and Berg, R.H. (1996) Peptide Nucleic acids. US Patent No.: 5539082

20 Szoka, F.C.Jr. Self-assembling polynucleotide delivery system. (PCT vom 14. 10. 1993) WO 93/19768., darin: Claim 23 bis 27

Patentansprüche

1. Kerntransportagenz bestehend aus zwei Modulen A und B, dadurch gekennzeichnet,
5 daß Modul A spezifisch an DNA bindet und nicht zur Bildung von Komplexen mit mehr als einem DNA-Molekül führt und
Modul B ein Kernlokalisierungssignal enthält, das keine unspezifische Bindung des Kerntransportagenzes an die DNA vermittelt.
- 10 2. Kerntransportagenz gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Modul A sequenzspezifisch an die DNA bindet.
3. Kerntransportagenz gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Modul A
15 spezifisch an DNA-Enden bindet.
4. Kerntransportagenz gemäß einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß
Modul A ein Peptid, ein Protein oder eine PNA (peptide nucleic acid) ist.
5. Kerntransportagenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß
20 Modul B ein erweitertes Kernlokalisierungssignal enthält, das aufgrund seiner Ladungen keine Komplexe mit DNA bildet.
6. Kerntransportagenz gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß Modul B ein
25 erweitertes Kernlokalisierungssignal enthält, das eine annähernd neutrale Summenladung aufweist.
7. Kerntransportagenz gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß Modul B ein
erweitertes Kernlokalisierungssignal enthält, das ein Kernlokalisierungssignal und
flankierende negativ geladene Aminosäuren umfaßt.
- 30 8. Kerntransportagenz gemäß einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß
Modul B zusätzlich zum Kernlokalisierungssignal oder erweiterten

Kernlokalisierungssignal weitere Peptidsequenzen oder nicht-Peptidkomponenten enthält, die nicht dem Kernlokalisierungssignal zuzuordnen sind.

- 5 9. Kerntransportagenz gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Modul A eine PNA ist und Modul B, anstelle oder neben einem NLS-Signal, ein Nicht-NLS-Signal enthält.
- 10 10. Kerntransportagenz gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Modul A ein sequenzspezifisch DNA-bindendes Protein ist und Modul B, anstelle oder neben einem NLS-Signal, ein Nicht-NLS-Signal enthält.
- 15 11. Kerntransportagenz gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Nicht-NLS-Signal ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus
Liganden für zelluläre Oberflächenstrukturen, die DNA-Aufnahme vermitteln können, Peptide, die Membranen destabilisieren und Signale, die in der Zelle die Bindung an Transportstrukturen vermitteln, sowie Signale, die eine Retention im Kern bewirken.
- 20 12. Gentransfersystem umfassend ein Kerntransportagenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 und ein kationisches Lipid, Peptid, Polyamin oder kationisches Polymer.
- 25 13. Verfahren zum Transport von DNA in den Kern eukaryontischer Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen mit der zu transportierenden DNA und dem Kerntransportagenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 transfiziert werden.
14. Verfahren gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die eukaryontischen Zellen, primäre Zellen sind.
- 30 15. Arzneimittel, enthaltend ein Kerntransportagenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11.
16. Verwendung des Kerntransportagenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 in der Gentherapie.

17. Verwendung des Kerntransportagenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 in der Gentherapie zur Behandlung von Krebs, Virusinfektionen, Erkrankungen des Nervensystems; Transplantatabstoßung sowie monogen oder polygen verursachter Erbkrankheiten.

1/4

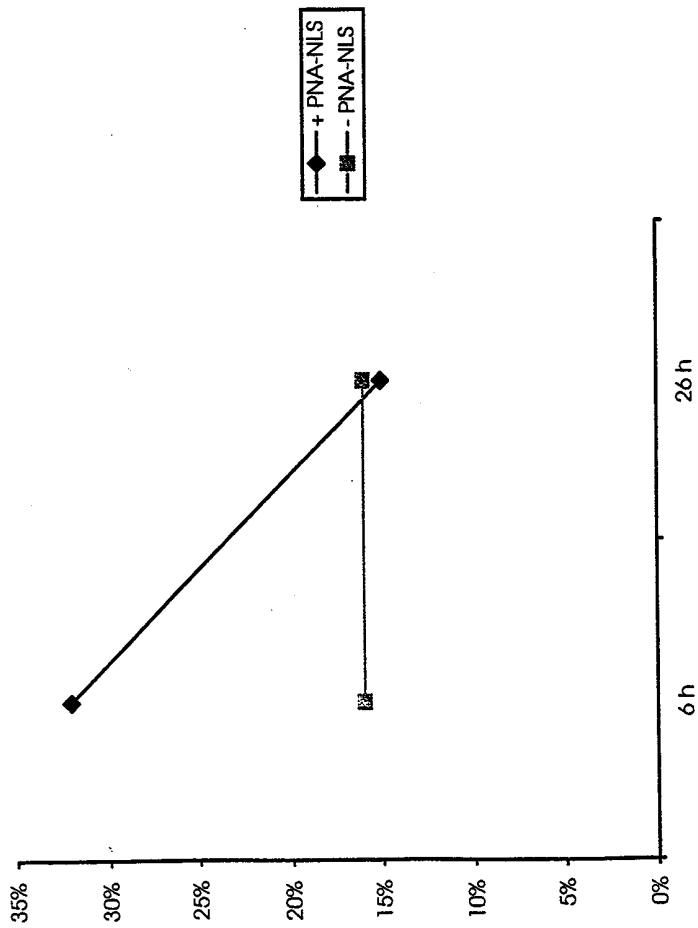
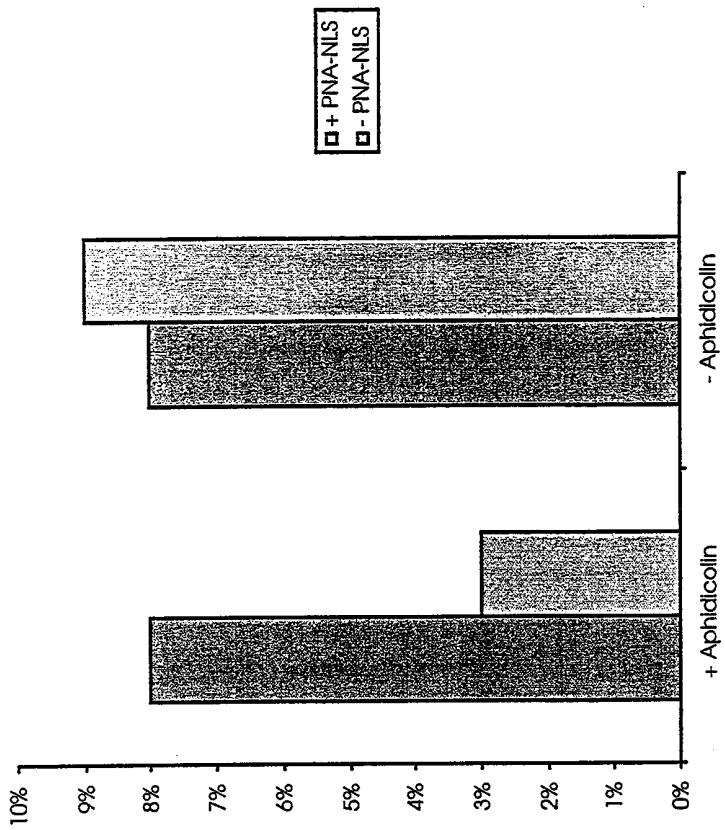


Fig. 1

2/4

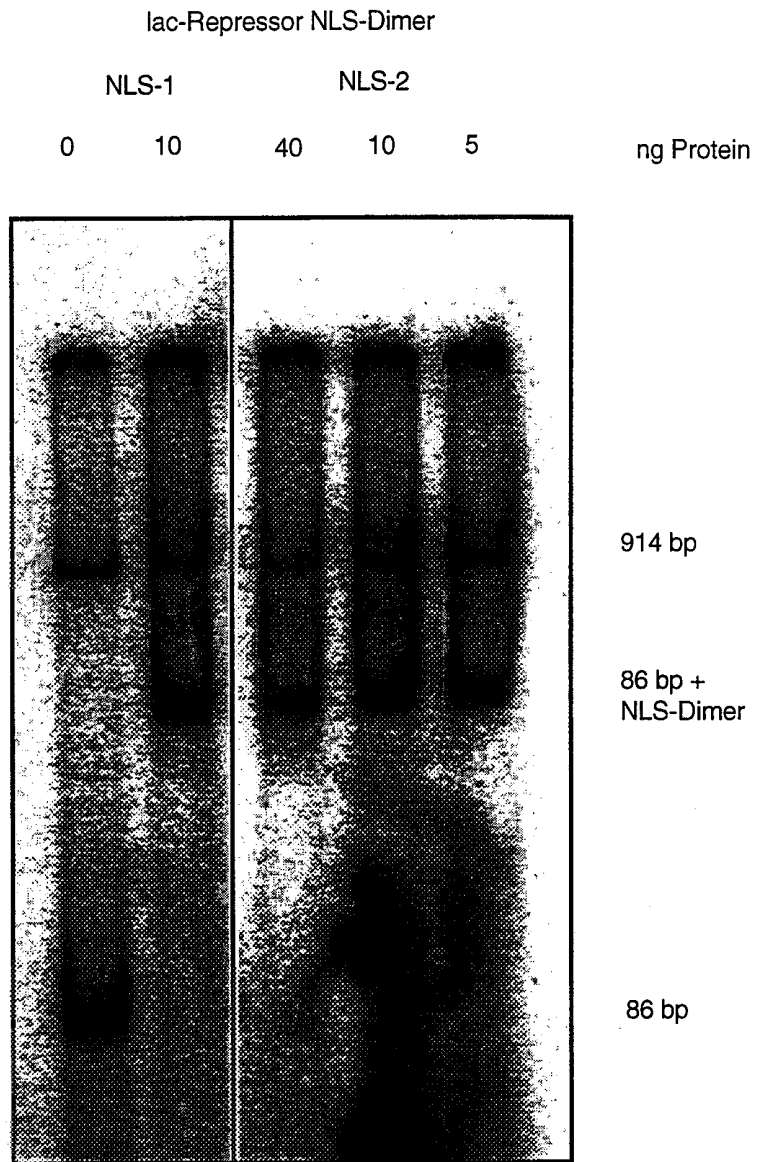
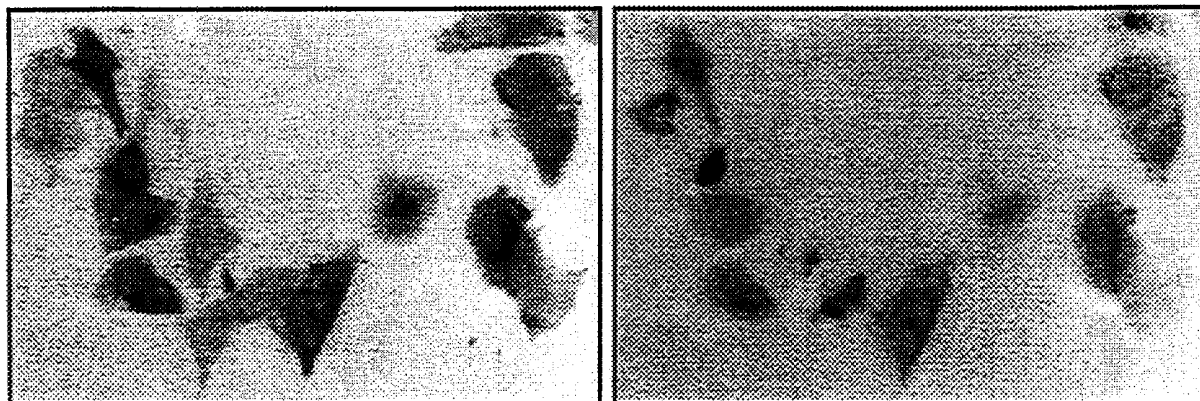
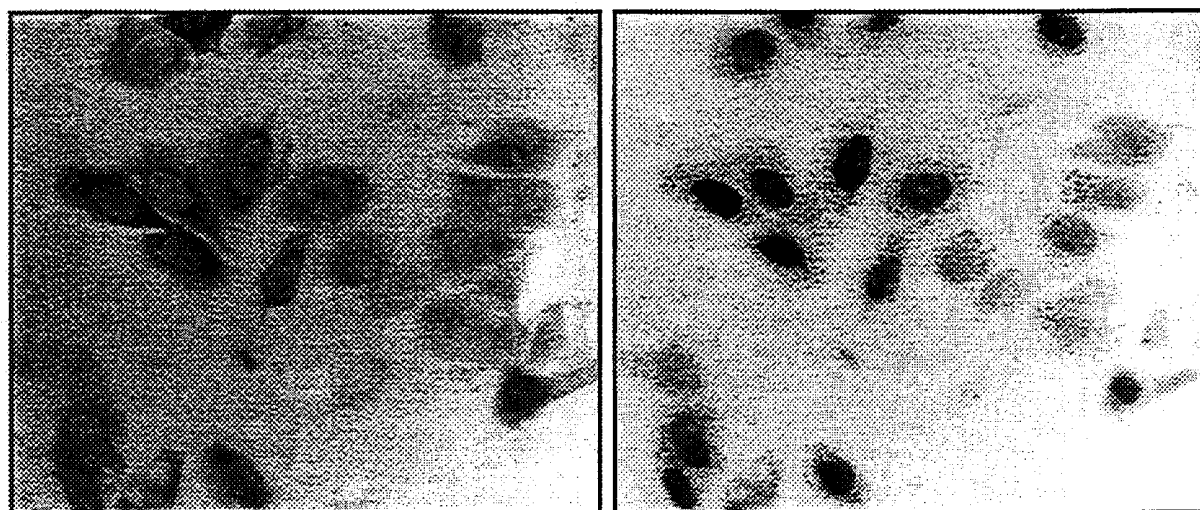


Fig. 2



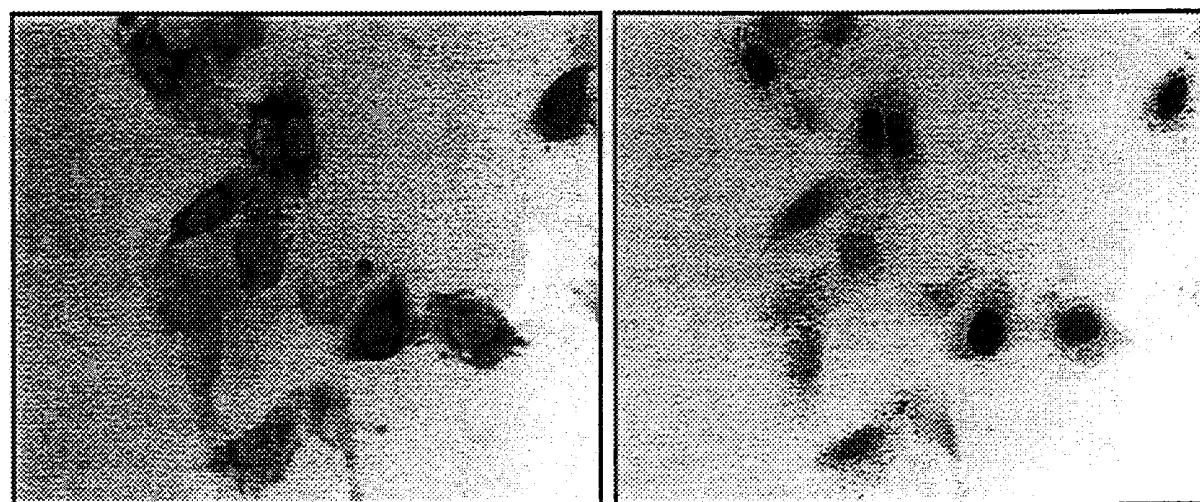
1a

1b



2a

2b



3a

3b

Fig. 3

4/4

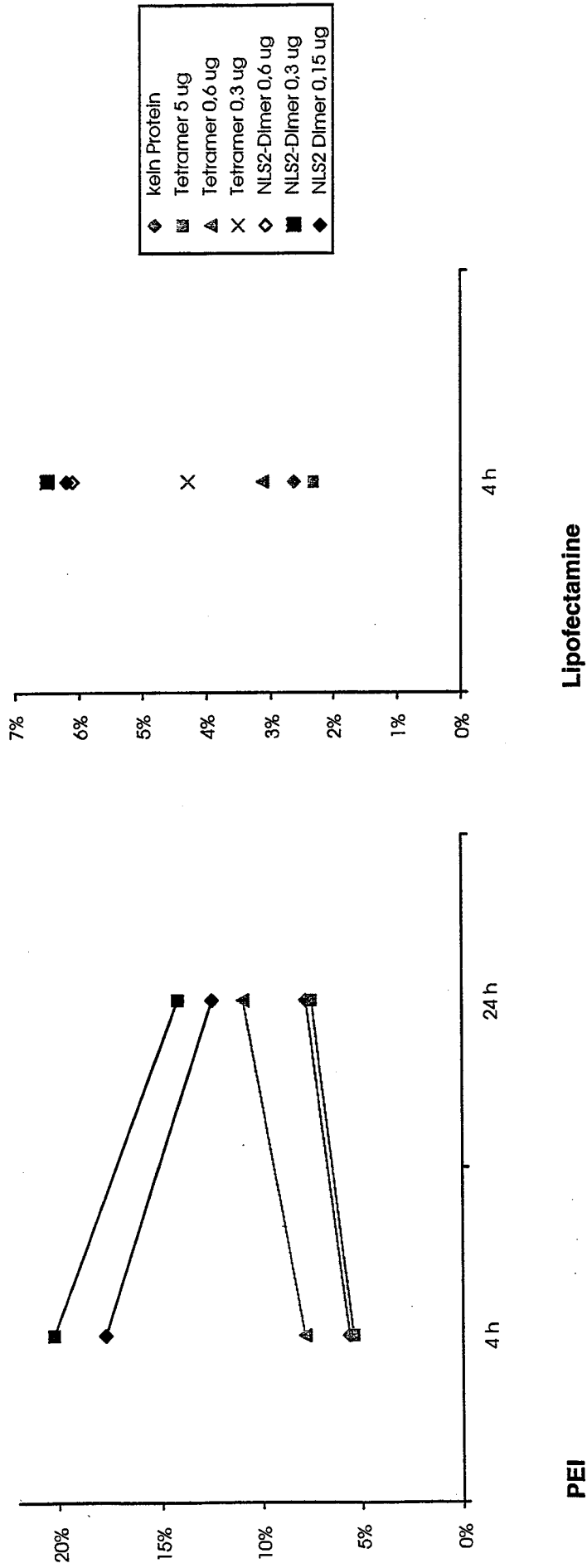


Fig. 4

SEQUENZPROTOKOLL

- 5 <110> AMAXA GmbH
 <120> Ausnutzung zelleigener Transportsysteme zum Transfer von Nukleinsäuren durch die Kernhülle
- 10 <130> 201-1(1)
 <140>
 <141>
- 15 <150> DE 199 00 513.3
 <151> 1999-01-08
 <150> DE 199 33 939.2
 <151> 1999-07-20
- 20 <160> 9
 <210> 1
 <211> 21
- 25 <212> PRT
 <213> künstliche Sequenz
 <220>
 <223>
- 30 <400> 1
 Gly Lys Pro Thr Ala Asp Asp Gln His Ser Thr Pro Pro Lys Lys Lys
 1 5 10 15
- 35 Arg Lys Val Glu Asp
 20
- 40 <210> 2
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> künstliche Sequenz
 <220>
 <223>
- 45 <400> 2
 Gly Lys Pro Ser Ser Asp Asp Glu Ala Thr Ala Asp Ser Gln His Ser
 1 5 10 15
- 50 Thr Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Asp
 20 25
- 55 <210> 3
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz
- 60 <220>
 <223> DNA ist PNA (peptide nucleic acid)
 <400> 3

cctttctccc ttc 13

5 <210> 4
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

10 <220>
 <223> DNA ist PNA (peptide nucleic acid)

<400> 4
 ctcttccttt ttc 13

15 <210> 5
 <211> 17
 <212> DNA/PRT
 <213> künstliche Sequenz

20 <220>
 <223> DNA ist PNA; Peptid/PNA-Mischsequenz

25 <400> 5
 ccttt Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly tttcc 17

30 <210> 6
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

35 <220>
 <223> DNA ist PNA

<400> 6
 ctcttccttt ttc 13

40 <210> 7
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> künstliche Sequenz

45 <220>
 <223>

50 <400> 7
 Gly Lys Pro Ser Ser Asp Asp Glu Ala Thr Ala Asp Ser Gln His Ser
 1 5 10 15

Thr Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Asp
 20 25

55 <210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> künstliche Sequenz

60 <220>
 <223> Sequenz entspricht dem NLS des großen T-Antigens des SV40 Virus

<400> 8
Met Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
1 5

5

<210> 9
<211> 16
<212> PRT

10 <213> künstliche Sequenz

<220>
<223> Sequenz entspricht einem neutralen Hybrid aus dem SV40-NLS und der N-terminal flankierenden Region des NLS des Polyoma-Virus VP2-Proteins

15

<400> 9
Met Glu Glu Asp Thr Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Asp Leu
1 5 10 15

20

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 00/00061

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/87 C07K14/00 A61K38/16 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94 13325 A (MICROPROBE CORP) 23 June 1994 (1994-06-23) the whole document	1-6,8,9, 11-17
A	WO 96 40961 A (LIFE TECHNOLOGIES INC ;HAWLEY NELSON PAMELA (US); LAN JIANQING (US) 19 December 1996 (1996-12-19) cited in the application the whole document	1-17
A	WO 93 19768 A (UNIV CALIFORNIA) 14 October 1993 (1993-10-14) cited in the application the whole document	1-17
	-/--	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 May 2000

Date of mailing of the international search report

26/05/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Oderwald, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. J. Application No.

PCT/DE 00/00061

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KOLKHOF P: "Specificities of three tight-binding Lac repressors" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 20, no. 19, 11 October 1992 (1992-10-11), pages 5035-5039, XP002137371 cited in the application <hr/>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 00/00061

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

See supplemental sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of box I.1

Although claims 13, 14 (as far as in vivo methods are concerned), 16 and 17 relate to a method for the treatment of the human/animal body, a search was carried out and was based on the indicated effects of the compound/composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Jonal Application No

PCT/DE 00/00061

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9413325	A	23-06-1994	US 5574142 A	12-11-1996
			AU 6295394 A	04-07-1994
WO 9640961	A	19-12-1996	AU 5979296 A	30-12-1996
			EP 0874910 A	04-11-1998
			JP 11506935 T	22-06-1999
			US 5736392 A	07-04-1998
WO 9319768	A	14-10-1993	AU 682308 B	02-10-1997
			AU 4027893 A	08-11-1993
			CA 2133323 A	14-10-1993
			EP 0636028 A	01-02-1995
			JP 7505639 T	22-06-1995
			US 5955365 A	21-09-1999
			US 5977084 A	02-11-1999
			US 5661025 A	26-08-1997
			US 5972600 A	26-10-1999
			US 5990089 A	23-11-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00061

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES		
IPK 7	C12N15/87	C07K14/00 A61K38/16 A61K48/00
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)		
IPK 7 C12N C07K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 94 13325 A (MICROPROBE CORP) 23. Juni 1994 (1994-06-23) das ganze Dokument ---	1-6,8,9, 11-17
A	WO 96 40961 A (LIFE TECHNOLOGIES INC ;HAWLEY NELSON PAMELA (US); LAN JIANQING (US) 19. Dezember 1996 (1996-12-19) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-17
A	WO 93 19768 A (UNIV CALIFORNIA) 14. Oktober 1993 (1993-10-14) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-17
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/>	Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie
° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :		
A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist		
E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist		
L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)		
O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht		
P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist		
T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist		
X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden		
Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist		
Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
11. Mai 2000		26/05/2000
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Oderwald, H

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen
PCT/DE 00/00061

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>KOLKHOF P: "Specificities of three tight-binding Lac repressors" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 20, Nr. 19, 11. Oktober 1992 (1992-10-11), Seiten 5035-5039, XP002137371 in der Anmeldung erwähnt -----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00061

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210

2. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.1

Obwohl die Ansprüche 13, 14 (insofern als in vivo Verfahren betroffen sind), 16 und 17 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00061

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9413325 A	23-06-1994	US 5574142 A	12-11-1996
		AU 6295394 A	04-07-1994
WO 9640961 A	19-12-1996	AU 5979296 A	30-12-1996
		EP 0874910 A	04-11-1998
		JP 11506935 T	22-06-1999
		US 5736392 A	07-04-1998
WO 9319768 A	14-10-1993	AU 682308 B	02-10-1997
		AU 4027893 A	08-11-1993
		CA 2133323 A	14-10-1993
		EP 0636028 A	01-02-1995
		JP 7505639 T	22-06-1995
		US 5955365 A	21-09-1999
		US 5977084 A	02-11-1999
		US 5661025 A	26-08-1997
		US 5972600 A	26-10-1999
		US 5990089 A	23-11-1999