



(10) **DE 10 2010 009 445 A1** 2011.08.25

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2010 009 445.5**

(22) Anmeldetag: **25.02.2010**

(43) Offenlegungstag: **25.08.2011**

(51) Int Cl.: **C12N 15/79 (2006.01)**

(71) Anmelder:

**Universitätsklinikum Jena, 07743, Jena, DE**

(72) Erfinder:

**Pöhlmann, Tobias, Dr., 08058, Zwickau, DE**

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

<b>DE</b>	<b>102007008596</b>	<b>B4</b>
<b>WO</b>	<b>2007/0 56 153</b>	<b>A2</b>
<b>WO</b>	<b>2006/0 23 491</b>	<b>A2</b>

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

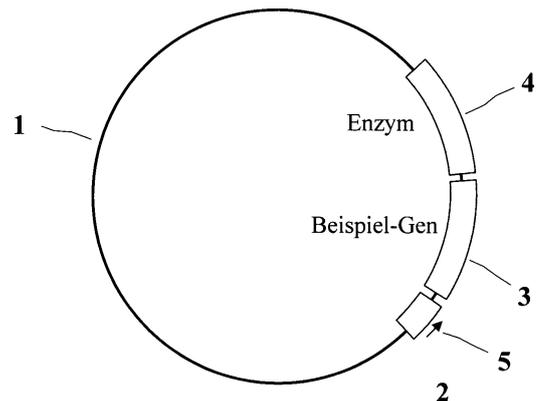
**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

(54) Bezeichnung: **Expressionsvektor zur Enzym-Expression in Zellen und Verfahren zu dessen Verwendung**

(57) Zusammenfassung: Expressionsvektor zur Enzym-Expression in Zellen und Verfahren zu dessen Verwendung  
Aufgabe war es, Expressionsvektor-transfizierte Zellen schnell und auf möglichst einfache Weise gezielt zu beeinflussen, beispielsweise um diese mit hoher Reinheit zu selektieren.

Es wird ein Expressionsvektor vorgeschlagen, der erfindungsgemäß zum Zweck der Aktivierung einer Peptid-inhibierten siRNA die genetische Information zur Expression eines die besagte Peptid-inhibierte siRNA spaltenden Enzyms enthält, das von den Expressionsvektor-transfizierten Zellen sonst nicht generiert werden kann. Der Expressionsvektor und die Peptid-inhibierten siRNA, auf welche die genetische Expressionsinformation abzielt werden in die zu beeinflussenden Zellen eingebracht.

Anwendung kann dieser Expressionsvektor und das besagte Verfahren beispielsweise zur schnellen und einfachen Selektion Expressionsvektor-transfizierter Zellen, sowie für diagnostische und zellphysiologische Betrachtungen finden.



**Beschreibung**

**[0001]** Die Erfindung betrifft ein spezielles Vektor-konstrukt zur Enzym-Expression sowie ein Verfahren, um mit diesem Vektorkonstrukt transfizierte Zellen in einer Zellkultur schnell, mit geringem Aufwand und mit hoher Spezifität – insbesondere zum Zweck ihrer Isolation – beeinflussen zu können.

**[0002]** Das erfindungsgemäße Vektorkonstrukt und das vorgeschlagene Verfahren können insbesondere in der Molekularbiologie zur schnellen und einfachen Selektion von Zellklonen nach Transfektionen Anwendung finden.

**[0003]** Die Übertragung von Genen ist ein in der Grundlagenwissenschaft weit verbreitetes Verfahren, mit dem die Funktion verschiedener Gene bzw. Proteinen in Zellen untersucht werden kann. Perspektivisch könnte es auch dazu genutzt werden, Erbkrankheiten zu behandeln. Mit dieser Methode können vollständige oder Teile von Genen bzw. DNA-Abschnitte in Zellen eingebracht, sowie durch die Einbringung von shRNA die Expression von Genen gezielt vermindert werden. Eine große Anzahl von auf Viren basierenden Systemen für den Transfer von Genen wurde bereits beschrieben. Gegenwärtig sind vor Allem Retrovirale Vektorsysteme am weitesten verbreitet (beispielsweise US 5,219,740 A. D. Miller und G. J. Rosman: Improved Retroviral Vectors for Gene Transfer and Expression, *BioTechniques* 7, 1989, 980–990; A. D. Miller: Retrovirus Packaging Cells, *Human Gene Therapy* 1, 1990, 5–14; J. C. Burns et al.: Proceedings of the National Academy of Sciences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 1993, 8033–8037 sowie K. Boris-Lawrie und H. M. Temin: Recent advances in retrovirus vector technology, *Curt. Opin. Genet. Dev.* 3, 1993, 102–109).

**[0004]** Verwendete Vektorsysteme enthalten dabei oft die vollständige virale Erbinformation, oder es wurden Teile der viralen Gene eliminiert, beispielsweise die genetischen Informationen über Hüllproteine, Enzyme zur Prozessierung von Proteinen oder zur Verpackung des genetischen Materials in die Virushüllen.

**[0005]** Vektoren können beispielsweise 5'LTR(H1-, sowie CMV-)Regionen besitzen, die als Promotoren dienen. Des Weiteren enthalten Vektoren oft Schnittstellen für Restriktionsenzyme, an denen die Vektoren aufgeschnitten und DNA-Segmente ausgeschnitten oder eingesetzt werden können. Außerdem werden oftmals Resistenzen für spezifische Antibiotika oder Chemotherapeutika (Ampicillin, Neomycin, Amphotheracin, u. a.) verwendet, um Zellklone nach dem Einbringen der Vektoren selektieren zu können (WO 2008/077545).

**[0006]** Als Reportergene werden oftmals Grün-fluoreszierende Proteine (GFP, EGFP) oder Luciferase verwendet; dies dient dazu die erfolgreiche Transfektion in Zellen und die Expression der Plasmid-Gene nachzuweisen. (US 5,625,048; US 5,777,079; US 6,054,321).

**[0007]** Die beschriebenen Reportergene und die Antibiotikaresistenzgene können dazu verwendet werden, die Zellen, welche die viralen oder synthetischen Vektoren enthalten, zu selektieren. Die Selektion mittels "Cell Sorting" über die Expression des GFP führt allerdings aufgrund der Methodik zu Zellstress; die Selektion mittels Antibiotikaresistenz ist langwierig und führt oft zu keiner reinen Zellpopulation nach der Selektion. Deshalb muss oft der Selektionsprozess wiederholt werden, oder es ist erforderlich, ständig Antibiotika zuzugeben.

**[0008]** Des Weiteren wurde beschrieben (US 6,589,526), dass die genetische Information von Rezeptoren (beispielsweise CD3) in Vektoren eingebracht wurde. Diese Rezeptoren wurden dann als Reporter exprimiert und die Zellen können durch Bindung von Antikörpern (beispielsweise magnetisch) selektiert werden. Auch dieses Verfahren führt nicht zu einer vollständigen Selektion; die Expression dieser Rezeptoren kann ebenfalls nachteilig für die Zellen, beispielsweise für Immunzellen, sein.

**[0009]** Adhärent wachsende Zellen werden in der Regel in Kulturflaschen oder Kulturschalen kultiviert und in diesen Gefäßen beispielsweise mittels Viren oder Transfektionsreagenzien oder in Küvetten mittels Elektroporation transfiziert. Nach der Transfektion erfolgen eine erneute Kultivierung in besagten Gefäßen und die anschließende Selektion (Beatrice Riteau, Catherine Menier, Iman Khalil-Daher, Silvia Martinozzi, Marika Pla, Jean Dausset, Edgardo D. Carosella and Nathalie Rouas-Freiss: HLA-G1 co-expression boosts the HLA class I-mediated NK lysis inhibition. *International Immunology*, Vol. 13, No. 2, 193–201, February 2001).

**[0010]** Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, Vektor-transfizierte Zellen schnell und auf möglichst einfache Weise gezielt zu beeinflussen, beispielsweise um diese mit hoher Reinheit zu selektieren.

**[0011]** Es wird ein Expressionsvektor vorgeschlagen, der neben zumindest einem bekannten Promotor sowie Schnittstellen zum Einfügen von verwendungsspezifischen Gensequenzen erfindungsgemäß zum Zweck der Aktivierung einer Peptid-inhibierten siRNA die genetische Information zur Expression eines (die besagte Peptid-inhibierte siRNA spaltenden) Enzyms enthält, welches von den Expressionsvektor-transfizierten Zellen sonst nicht generiert werden kann. Dieses Enzym ist in der Lage, die kovalente Bindung der besagten Peptid-inhibierten siRNA, wel-

che ebenfalls in die Zellen eingebracht wird, aufzubrechen und somit die siRNA zu aktivieren, welche danach die Expression zellulärer Gene beeinflusst.

**[0012]** Zur Aktivierung der Peptid-inhibierten siRNA werden der Expressionsvektor, welcher die spezielle genetische Information zur Expression eines spezifischen Enzyms zur Aktivierung der Peptid-inhibierten siRNA aufweist, und die Peptid-inhibierte siRNA (WO 002008098569) gleichzeitig oder zeitlich versetzt, zweckmäßig mittels Transfektionsreagenz, in die zu beeinflussenden Zellen eingebracht. Die Sequenz der Peptid-inhibierten siRNA, welche erfindungsgemäß durch den Expressionsvektor bzw. durch die in diesem enthaltenen genetischen Information zur Enzymexpression aktiviert wird, ist gegen die mRNA eines Gens der Wirtszelle, beispielsweise gegen die mRNA eines Adhäsionsmoleküls, gerichtet.

**[0013]** Das exprimierte Enzym, beispielsweise eine Protease oder Peptidase, kann dabei zur verlässlichen Selektion dieser enzymexprimierenden Zellen gegenüber anderen (nicht enzymexprimierenden) Zellen der Zellkultur verwendet werden. So ist insbesondere eine verfahrenstechnisch vorteilhafte und aufwandgeringe Isolation der auf vorgenannte Weise selektierten Zellen möglich, wenn in den Expressionsvektor-transfizierten Zellen einer Zellkultur, die gewöhnlich in einem Kulturgefäß gewachsen sind und in diesem Wachstumsprozess an demselben anhaften (was durch die Expression von speziellen Adhäsionsmolekülen bewirkt wird), diese besagte Adhäsions-Molekülexpression gehemmt wird. Durch die Expression der Protease oder Peptidase in den Expressionsvektortransfizierten Zellen kann eine spezielle Peptid-inhibierte siRNA aktiviert werden, welche nach deren Aktivierung beispielsweise die Expression des genannten Adhäsionsmoleküls unterbindet. Infolge der Hemmung der Expression dieses oder dieser Adhäsionsmoleküle lösen sich die Expressionsvektor-transfizierten Zellen vom Kulturgefäß, so dass diese von den übrigen nicht enzymexprimierten Zellen, beispielsweise zu ihrer Isolation, leicht separiert werden können.

**[0014]** Nicht mit dem Expressionsvektor-transfizierten Zellen sind nicht in der Lage, die Peptidinhibierte siRNA zu aktivieren; es kommt zu keiner RNA-Interferenz und zu keiner Zellenablösung von Kulturgefäß. Auf diese Weise können die Expressionsvektortransfizierten Zellen mit dem Überstand abgenommen und erneut kultiviert werden. Der Gehalt der siRNA in den Zellen nimmt nach einigen Stunden bzw. Tagen ab, und es kommt wieder zu einer Expression der Zell-Adhäsionsmoleküle und somit zu einer erneuten Adhäsion der Zellen an dem Kulturgefäß. Somit ist die physiologische in vitro Wachstumssituation wieder gegeben, und die Expressionsvektor-transfizierten Zellen wurden selektiert. Für den Fall,

dass die Reinheit der transfizierten Zellen nicht ausreichend groß ist, kann der beschriebene Selektionsschritt mittels Einbringung von Peptid-inhibierter siRNA wiederholt werden.

**[0015]** Sollten Zellen während dieser Prozesse abgestorben sein, schwimmen diese ebenfalls im Zellkultur-Überstand und werden zusammen mit den Expressionsvektor-transfizierten Zellen in das beschriebene neue Kulturgefäß übernommen. Diese toten Zellen werden aber nicht wieder adhären und können somit im Rahmen der Routine-Zellkultur abgenommen werden.

**[0016]** Die Verwendung des vorgeschlagenen Expressionsvektors zur Aktivierung einer Peptidinhibierten siRNA ist allerdings nicht auf die vorgenannte Selektion/Isolation der enzymexprimierenden Zellen beschränkt. Anwendung kann die Erfindung beispielsweise auch zur gerichteten Abtötung Expressionsvektor-Zellen finden. Dies ist vor Allem in der Stammzellforschung interessant, bei welcher Stammzellen in vivo eingebracht werden und möglicherweise nicht die gewünschten Effekte zeigen bzw. Terratome bilden. Werden diese Zellen vor deren Einbringung mit einem Expressionsvektor vorgeschlagener Art transfiziert, kann eine Peptid-inhibierte siRNA in vivo eingebracht und ausschließlich in diesen Zellen aktiviert werden. Das Zielgen der siRNA könnte hierbei ein für die Zelle überlebenswichtiges Gen sein, was zum Absterben der Zelle führen würde. Dadurch könnten Nebenwirkungen von in vivo eingebrachten Stammzellen verringert werden, wobei die beispielhaft genannte Anwendung nicht auf Stammzellen beschränkt ist.

**[0017]** Des Weiteren kann der beschriebene Mechanismus für diagnostische oder physiologische Betrachtungen verwendet werden.

**[0018]** Die Erfindung soll nachstehend anhand von in der Zeichnung dargestellten Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

**[0019]** Es zeigen:

**[0020]** [Fig. 1](#): Schematische Darstellung eines Expressionsvektors mit einem Promotor, einem anwendungsspezifischen Beispielgen und einer genetischen Information zur Expression eines (eine Peptid-inhibierte siRNA spaltenden) Enzyms

**[0021]** [Fig. 2](#): Schematische Darstellung eines Expressionsvektors mit zwei unabhängigen Promotoren für ein anwendungsspezifisches Beispielgen und ein die besagte Peptid-inhibierte siRNA spaltendes Enzym

**[0022]** [Fig. 3](#): Konkretes Beispiel zur Ausführung des Expressionsvektors gemäß [Fig. 2](#) mit einer Region zum Einfügen mehrerer Beispielgene, wobei der

Expressionsvektor zur Replikation in E.coli eine spezifische Ampicillin-Resistenz aufweist

**[0023]** Fig. 4: Verfahren zur Verwendung des erfindungsgemäßen Expressionsvektors für die Selektion von Zellen in einem Kulturgefäß

**[0024]** In Fig. 1 ist in übersichtlicher schematischer Darstellung ein Expressionsvektor 1 abgebildet, der nacheinander angeordnet einen Promotor 2, ein Beispiel-Gen 3, welches durch den Promotor 2 expriert wird, sowie (weiter nachfolgend) eine genetische Information 4 zur Expression eines Enzyms enthält, welches zur Spaltung einer in Fig. 1 nicht dargestellten an sich bekannten Peptid-inhibierten siRNA vorgesehen ist.

**[0025]** In diesem Ausführungsbeispiel sind der Promotor 2, das Beispiel-Gen 3 und die genetische Information 4 zur Expression des besagten Enzyms in der genannten Reihenfolge hintereinander auf dem Expressionsvektor 1 angeordnet. Da sich die genetische Information 4 hinter dem Beispiel-Gen 3 befindet, wird das besagte Enzym nur dann expriert, wenn auch das eingebrachte Beispiel-Gen 3 expriert wird. Der Promotor 2 ist somit für beide genannten Wirkungen (sowohl für die Expression des Beispiel-Gens 3 als auch für die Enzymexpression aus der genetischen Information 4) vorgesehen. Die Wirkungsrichtung des Promotors 2 ist durch einen Pfeil 5 symbolisiert.

**[0026]** Fig. 2 zeigt ebenfalls in übersichtlicher schematischer Darstellung einen Expressionsvektor 6, der jedoch im Unterschied zum Expressionsvektor 1 von Fig. 1 zwei Promotoren 7, 8, zur separaten Expression des Beispiel-Gens 3 und einer Enzymexpression aus einer am anderen Ende dieser Anordnungskette angesiedelten genetischen Information 9 enthält. Das Enzym dient wiederum zur Spaltung einer in Fig. 2 ebenfalls nicht dargestellten an sich bekannten Peptid-inhibierten siRNA. Der Promotor 7 ist somit zur Expression des diesem unmittelbar benachbarten Beispiel-Gens 3 vorgesehen (siehe auch Pfeil 10), während der Promotor 8 die Expression der diesem benachbarten genetische Information 8 bewirkt (vgl. Pfeil 11). Das besagte Enzym und das eingebrachte Beispiel-Gen 3 werden somit unabhängig von einander expriert.

**[0027]** Als beispielhafte spezielle Ausführung des in Fig. 2 dargestellten Expressionsvektors 6 mit den zwei separaten Promotoren 7, 8 zeigt Fig. 3 einen Expressionsvektor 12, der als ersten Promotor (entsprechend Promotor 7 in Fig. 2) einen H1-Promotor 13 für Beispiel-Gene oder für shRNA aufweist, die in einer dem H1-Promotor 13 benachbarten DNA-Region 14 eingefügt werden können. Hierzu sind beispielhaft Schnittstellen (HindIII, BamHI, NotI, SexAI, BglII, MnlI) zur Aufspaltung der DNA des Expressionsvek-

tors 12 und Einfügung der besagten Gensequenzen bzw. shRNA dargestellt. Eine LTR-Region 15 trägt zur erhöhten Expression dieser Sequenzen bei.

**[0028]** Als zweiten Promotor (entsprechend Promotor 8 in Fig. 2) weist der Expressionsvektor 12 einen PGK-Promotor 16 auf zur Expression des besagten Enzyms aus der dem PGK-Promotor 16 benachbarten genetischen Information 9 sowie zur Expression eines Reportergens EGFP aus einer genetischen Information 17, welche hinter der genetischen Information 9 auf dem Expressionsvektor 12 angeordnet ist. Damit erfolgt die Expression des Reportergens EGFP nur, wenn das Enzym aus der genetischen Information 9 expriert wird. Durch die separaten Promotoren (H1-Promotor 13 und PGK-Promotor 16) erfolgen die Expressionen des Enzyms aus der genetischen Information 9 sowie der in der DNA-Region 14 eingefügten Beispiel-Gene bzw. shRNA jedoch unabhängig voneinander (vgl. wiederum die Wirkungsrichtungen der Promotoren durch symbolische Darstellungen mit den Pfeilen 7, 8).

**[0029]** Ferner ist eine genetische Information 18 (Amp) vorhanden, durch welche der Expressionsvektor 12 zur Replikation in E.coli eine Ampicillin-Resistenz aufweist.

**[0030]** Fig. 4 zeigt schematisch ein Verfahren zur Verwendung des beispielhaften Expressionsvektors 1 für die Selektion von in einem Kulturgefäß 19 gewachsenen Zellen 20. Aus einem Gefäß 21 werden die Expressionsvektoren 1 durch Pipettierung (in Fig. 4a symbolisiert durch Pfeildarstellung) in das Kulturgefäß 19 gegeben, in welchem die Zellen 20 in einem Nährmedium 22 gewachsen sind und am Boden anhaften.

**[0031]** Wie in Fig. 4b dargestellt, werden die in das Kulturgefäß 19 pipettierten Expressionsvektoren 1 in einige der Zellen 20 eingebracht (symbolisiert durch die Zellen 20a). Die übrigen Zellen bleiben von den Expressionsvektoren 1 unberührt. Im Übrigen sterben auch einige der Zellen 20 bei dieser Transfektion ab (nicht explizit dargestellt).

**[0032]** Aus einem Gefäß 23 werden jetzt zusätzlich Peptid-inhibierte siRNA-Moleküle 24 (in Fig. 4b symbolisiert durch Pfeildarstellung) in das Kulturgefäß 19 gegeben, die ebenfalls in die darin befindlichen und am Boden des Kulturgefäßes anhaftenden Zellen 20 transfiziert. In denjenigen Zellen, in die bereits der Expressionsvektor 1 eingedrungen ist (symbolisiert durch die Zellen 20a in Fig. 4a) wird durch das exprierte Enzym desselben die Peptidbindung der Peptid-inhibierten siRNA-Moleküle 24 aufgebrochen, wodurch die siRNA dieser Moleküle 24 aktiviert wird. In diesem Beispiel ist diese siRNA-Sequenz gegen die mRNA eines oder mehrerer Adhäsionsmoleküle der Zellen gerichtet, so dass die Zelladhäsion aufgehoben

ben wird und sich die Zellen (dargestellt als Zellen **20b** in [Fig. 4c](#)) vom Boden des Kulturgefäßes **19** ablösen sowie unter Änderung ihrer Zellform im Nährmedium **22** nach oben schweben.

**[0033]** In die anderen Zellen **20** (vgl. Zellen **20b** in [Fig. 4c](#)) können zwar auch, wie dargestellt, die Peptid-inhibierten siRNA-Moleküle **24** eingedrungen sein, jedoch wird, sofern in diese kein Expressionsvektor **1** transfiziert ist, deren Peptidbindung nicht aufgebrochen, so dass die Peptid-inhibierten siRNA-Moleküle **24** weiterhin in ihrer siRNA-Wirkung inaktiviert bleiben und somit nicht gegen die mRNA des besagten Zell-Adhäsionsmoleküls wirken können. Die Zellen bleiben weiterhin am Boden anhaften (vgl. Zellen **20c** in [Fig. 4c](#)).

**[0034]** Auf diese Weise ist eine räumliche Selektion der Zellen **20** in die am Boden haften bleibenden Zellen **20c** und die im Nährmedium **22** nach oben schwebenden Zellen **20b** (siehe [Fig. 4c](#)) gegeben, so dass die im Überstand des Nährmediums **22** schwimmenden bzw. schwebenden Zellen **20b** mit einer Pipette abgenommen werden und entsprechend [Fig. 4d](#) (separiert von den Zellen **20c** in [Fig. 4c](#)) in ein anderes Kulturgefäß **25** mit einem Nährmedium **26** überführt werden können.

**[0035]** Durch Zellteilung und Degradierung der siRNA-Moleküle nimmt deren Konzentration innerhalb der Zellen **20b** ab und es kommt wieder zu einer Expression des vorher gehemmten Gens bzw. Proteins, so dass im vorliegenden Beispiel die Wirkung gegen die mRNA des besagten Zell-Adhäsionsmoleküls nachlässt und das besagte Adhäsionsmolekül der Zellen **20b** in dessen Expression nicht mehr gehemmt wird, wodurch diese Zellen (vgl. [Fig. 4e](#)), insbesondere für eine erneute bzw. weitere Kultivierung wieder am Boden nunmehr des neuen Kulturgefäßes **25** anwachsen. Bei dieser Methode abgestorbene Zellen, die ebenfalls mit in das neue Kulturgefäß **25** überführt wurden, können im Rahmen der normalen Zellkultur im Überstand des Nährmediums **26** abgenommen werden.

<b>18</b>	genetische Information für Amicillin-Resistenz
<b>19, 25</b>	Kulturgefäß
<b>20</b>	Zellen
<b>20a</b>	Zellen mit transferiertem Expressionsvektor <b>1</b>
<b>20b</b>	Zellen mit zusätzlich transferierter Peptid-inhibierter siRNA
<b>20c</b>	Zellen mit nicht transferierter Peptid-inhibierter siRNA
<b>21, 23</b>	Gefäß
<b>22, 26</b>	Nährmedium
<b>24</b>	Peptid-inhibierte siRNA-Moleküle
<b>HindIII</b>	DNA-Schnittstellen des Expressionsvektors <b>12</b>
<b>BamHI</b>	DNA-Schnittstellen des Expressionsvektors <b>12</b>
<b>NotI</b>	DNA-Schnittstellen des Expressionsvektors <b>12</b>
<b>SexAI</b>	DNA-Schnittstellen des Expressionsvektors <b>12</b>
<b>BgIII</b>	DNA-Schnittstellen des Expressionsvektors <b>12</b>
<b>MunI</b>	DNA-Schnittstellen des Expressionsvektors <b>12</b>

#### Bezugszeichenliste

<b>1, 6, 12</b>	Expressionsvektor
<b>2, 7, 8</b>	Promotor
<b>3</b>	Beispiel-Gen
<b>4, 9</b>	genetische Information zur Enzymexpression
<b>5, 10, 11</b>	Pfeil
<b>13</b>	H1-Promotor
<b>14</b>	DNA-Region
<b>15</b>	LTR-Region
<b>16</b>	PGK-Promotor
<b>17</b>	genetische Information für Reportergen EGFP

**ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG**

*Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.*

**Zitierte Patentliteratur**

- US 5219740 [0003]
- WO 2008/077545 [0005]
- US 5625048 [0006]
- US 5777079 [0006]
- US 6054321 [0006]
- US 6589526 [0008]
- WO 002008098569 [0012]

**Zitierte Nicht-Patentliteratur**

- A. D. Miller und G. J. Rosman: Improved Retroviral Vectors for Gene Transfer and Expression, *BioTechniques* 7, 1989, 980–990 [0003]
- A. D. Miller: Retrovirus Packaging Cells, *Human Gene Therapy* 1, 1990, 5–14 [0003]
- J. C. Burns et al.: Proceedings of the National Academy of Sciences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 1993, 8033–8037 [0003]
- K. Boris-Lawrie und H. M. Temin: Recent advances in retrovirus vector technology, *Curt. Opin. Genet. Dev.* 3, 1993, 102–109 [0003]
- Beatrice Riteau, Catherine Menier, Iman Khalil-Daher, Silvia Martinozzi, Marika Pla, Jean Dausset, Edgardo D. Carosella and Nathalie Rouas-Freiss: HLA-G1 co-expression boosts the HLA class I-mediated NK lysis inhibition. *International Immunology*, Vol. 13, No. 2, 193–201, February 2001 [0009]

**Patentansprüche**

auf diese Weise die Expressionsvektortransfizierten Zellen selektiert werden.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

1. Expressionsvektor, enthaltend mindestens einen Promotor und Schnittstellen zum Einfügen von verwendungsspezifischen Gensequenzen, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Expressionsvektor (**1, 6, 9**) für den Zweck der Aktivierung einer Peptid-inhibierten siRNA die genetische Information (**4, 9**) zur Expression eines eine Peptid-inhibierte siRNA (**24**) spaltenden Enzyms enthält.

2. Expressionsvektor nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch eine Protease als die Peptidinhibierte siRNA (**24**) spaltendes Enzym.

3. Expressionsvektor nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch eine Peptidase als die Peptid-inhibierte siRNA (**24**) spaltendes Enzym.

4. Expressionsvektor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen dem zumindest einem Promotor (**2**) und der genetischen Information (**4**) zur Expression des die Peptid-inhibierte siRNA (**24**) spaltenden Enzyms weitere verwendungsspezifische genetische Informationen (**3, 14**) vorhanden sind.

5. Expressionsvektor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass für die Expression der genetischen Information (**4, 9**) des Enzyms und weiterer Gene (**3, 14**) unterschiedliche Promotoren (**7, 8**) vorhanden sind.

6. Expressionsvektor nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die weiteren Gene (**3, 14**) für die Expression von Proteinen vorgesehen sind.

7. Expressionsvektor nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die weiteren Gene (**3, 14**) für die Expression von shRNA vorgesehen sind.

8. Verfahren zur Verwendung des Expressionsvektors gemäß einem oder mehreren der vorgenannten Ansprüche 1–7, bei dem der Expressionsvektor in in einem Kulturgefäß gewachsene Zellen eingebracht wird, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich zum Expressionsvektor eine Peptid-inhibierte siRNA in die Zellen eingebracht wird und diese in den Zellen durch die Expression des auf dem Expressionsvektor kodierten und exprimierten Enzyms aktiviert wird.

9. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass durch die Aktivierung der Peptid-inhibierten siRNA zum Zweck der Ablösung der im Kulturgefäß gewachsenen und Expressionsvektor-transfizierten Zellen von demselben die Expression eines Adhäsionsmoleküls der Zellen vermindert wird und

Anhängende Zeichnungen

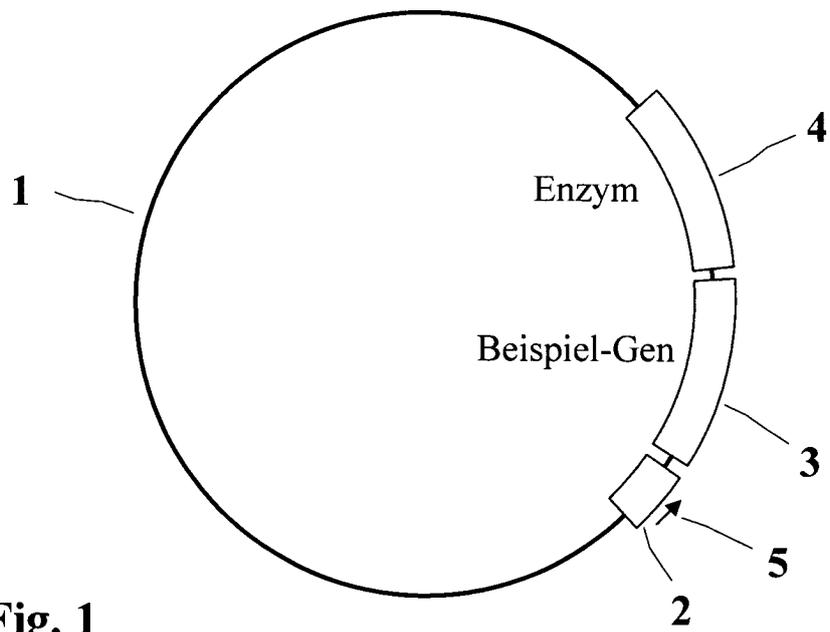


Fig. 1

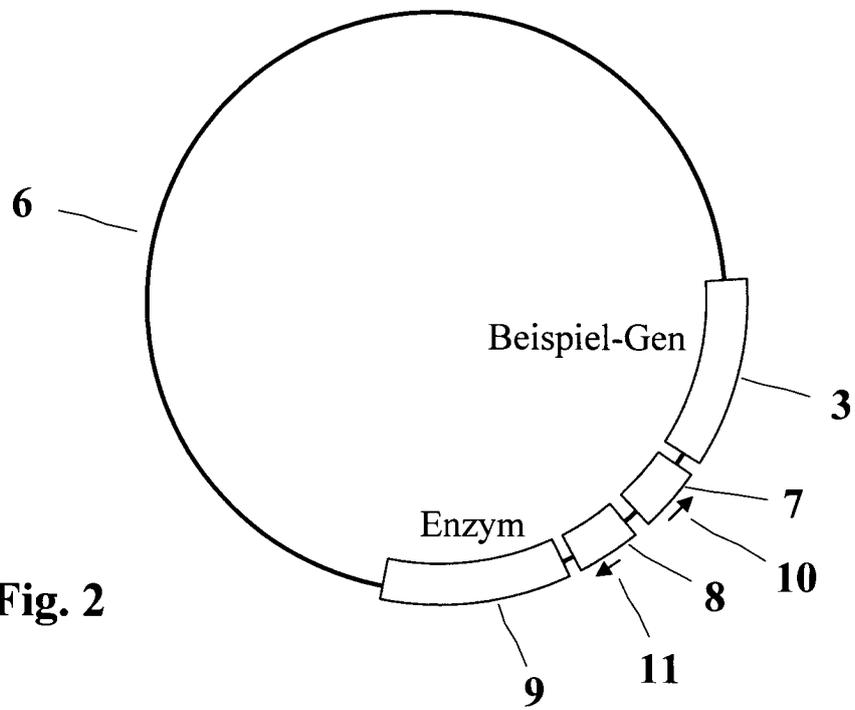
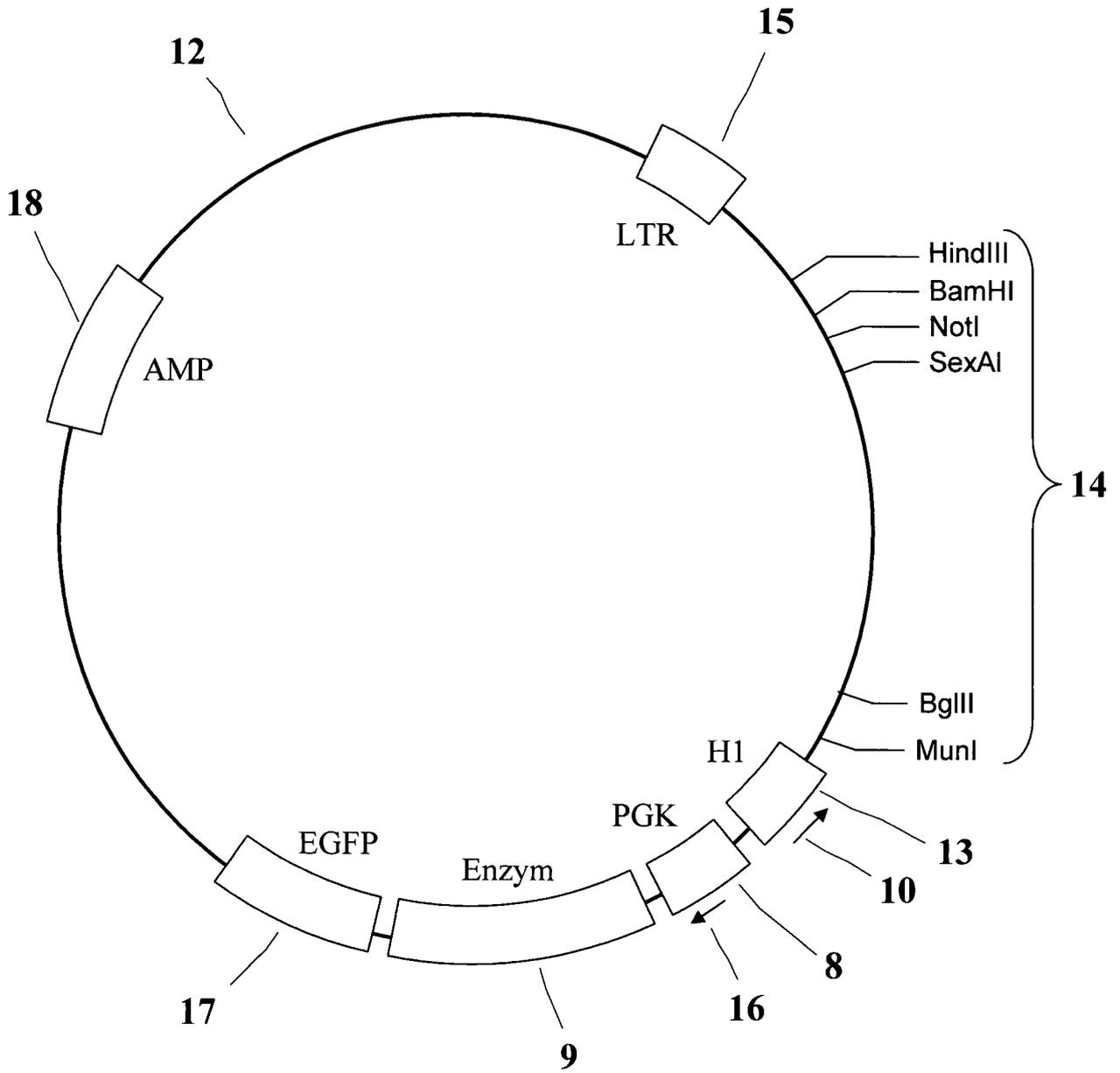
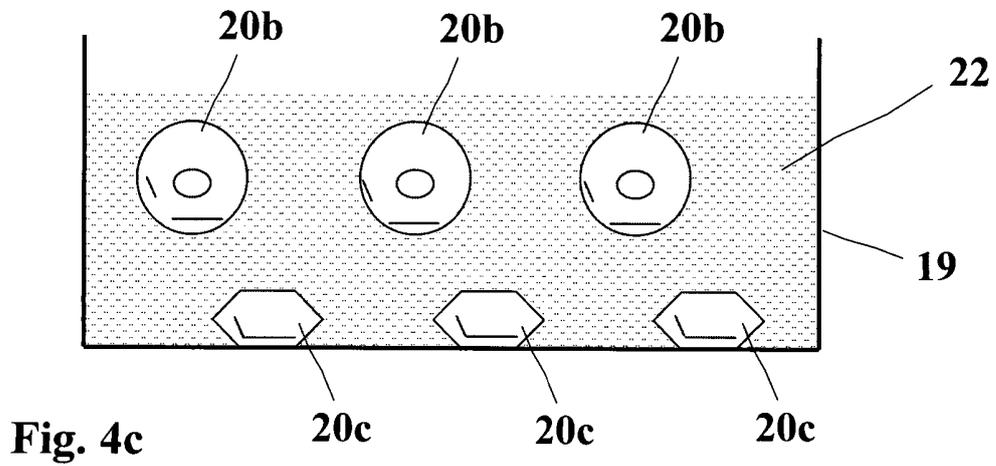
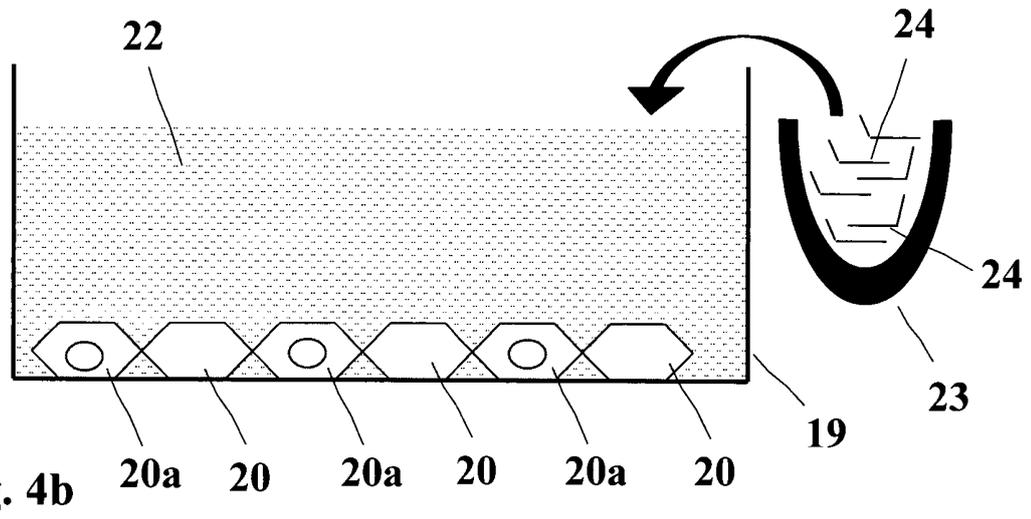
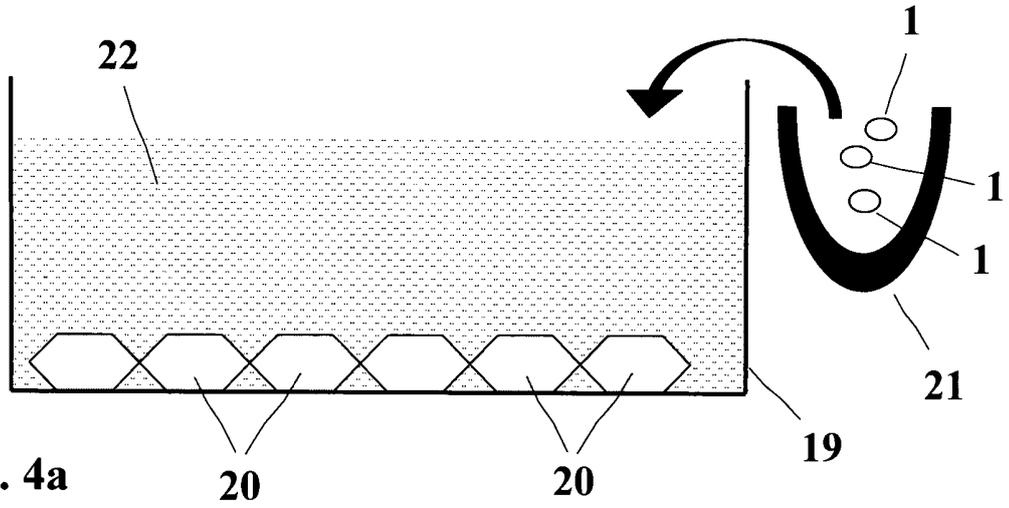
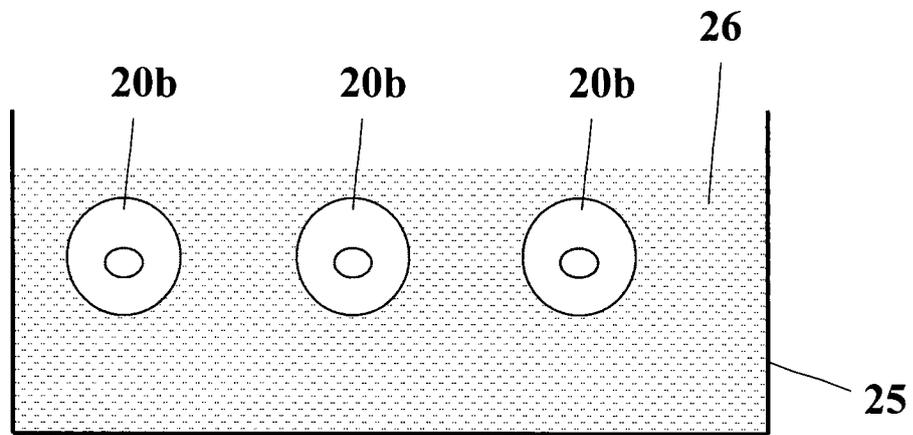


Fig. 2

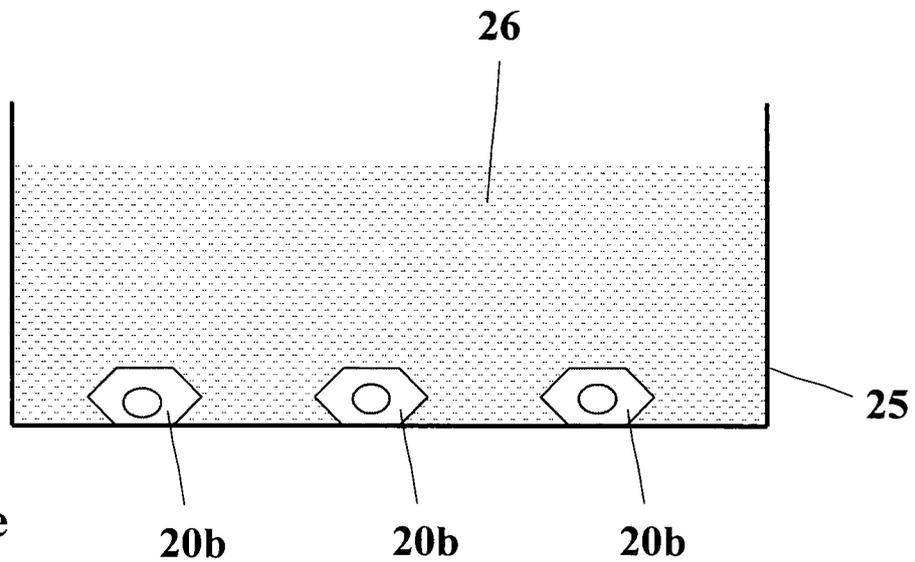


**Fig. 3**





**Fig. 4d**



**Fig. 4e**