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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
16. Dezember 2010 (16.12.2010)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2010/142371 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12N 15/11 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2010/003067

(22) Internationales Anmeldedatum:
19. Mai 2010 (19.05.2010)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2009 024 729.7 12. Juni 2009 (12.06.2009) DE
10 2009 024 730.0 12. Juni 2009 (12.06.2009) DE
10 2009 024 731.9 12. Juni 2009 (12.06.2009) DE
10 2009 024 732.7 12. Juni 2009 (12.06.2009) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **UNIVERSITÄTSKLINIKUM** [DE/DE]; Schleswig-Holstein Campus Lübeck, Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **SCZAKIEL, Georg** [DE/DE]; Fasanenring 7, 23527 Gross-Grönau (DE). **MESCALCHIN, Alessandra** [IT/DE]; Körnerstrasse 32a, 23564 Lübeck (DE). **DETZER, Anke** [DE/DE]; Fahlenkampsweg 46, 23562 Lübeck (DE). **ENGEL, Christina** [DE/DE]; Fishstrasse 6b, 23552 Lübeck (DE). **WEIRAUCH, Ulrike** [DE/DE]; Ratzeburger Allee 63, 23562 Lübeck (DE). **EROGULLARI, Alev** [TR/DE]; Fünfhausen 5-11, 23552 Lübeck (DE).

(74) Anwalt: **PERREY, Ralf**; Müller-Boré & Partner, Grafinger Strasse 2, 81671 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)*

— *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)*

— *mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)*

(54) Title: OLIGONUCLEOTIDES FOR INHIBITING AND FOR IDENTIFYING HUMAN ARGONAUTE PROTEINS

(54) Bezeichnung : OLIGONUKLEOTIDE ZUR HEMMUNG UND ZUM NACHWEIS VON HUMANEN ARGONAUTE-PROTEINEN

(57) Abstract: The invention relates to oligonucleotides that can specifically hybridise with mRNAs that code for argonaute proteins. Said oligonucleotides can inhibit the expression of argonaute proteins and can identify argonaute mRNA. The invention also relates to pharmaceutical compositions that contain these oligonucleotides, to methods for the specific inhibition of the expression of argonaute proteins and for the identification of argonaute mRNA, and to the use of said oligonucleotides for inhibiting the expression of argonaute proteins in a cell.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Oligonukleotide, die spezifisch an Argonaute-Proteine kodierende mRNAs hybridisieren können. Mit Hilfe dieser Oligonukleotide kann die Expression von Argonaute-Proteinen gehemmt und Argonaute-mRNA nachgewiesen werden. Die vorliegende Erfindung betrifft weiter diese Oligonukleotide enthaltende pharmazeutische Zusammensetzungen, Verfahren zur spezifischen Hemmung der Expression von Argonaute-Proteinen und zum Nachweis von Argonaute-mRNA, sowie die Verwendung dieser Oligonukleotide zur Hemmung der Expression von Argonaute-Proteinen in einer Zelle.

WO 2010/142371 A1

OLIGONUKLEOTIDE ZUR HEMMUNG UND ZUM NACHWEIS VON HUMANEN ARGONAUTE-PROTEINEN

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Oligonukleotide, die spezifisch an Argonaute-Proteine kodierende mRNAs hybridisieren können. Mit Hilfe dieser Oligonukleotide kann die Expression von Argonaute-Proteinen gehemmt und Argonaute-mRNA nachgewiesen werden. Die vorliegende Erfindung betrifft weiter diese Oligonukleotide enthaltende pharmazeutische Zusammensetzungen, Verfahren zur spezifischen Hemmung der Expression von Argonaute-Proteinen und zum Nachweis von Argonaute-mRNA, sowie die Verwendung dieser Oligonukleotide zur Hemmung der Expression von Argonaute-Proteinen in einer Zelle.

Die Familie der Argonaute (Ago)-Proteine ist eine hoch konservierte Proteinfamilie, deren Mitglieder Schlüsselfunktionen bei der RNA-vermittelten Interferenz (RNAi), d.h. dem durch kleine, nicht-kodierende RNAs vermittelten Gen-Silencing, innehaben. Ago-Proteine binden diese kleinen, nicht-kodierenden RNAs über ihre funktionellen Domänen, und können so unter anderem die Proteinsynthese kontrollieren oder die Stabilität von mRNA beeinflussen. Verschiedene Klassen von Ago-Proteinen lassen sich in allen höheren Eukaryonten finden, wo sie wichtige Funktionen in so verschiedenen Prozessen wie der Embryonalentwicklung, der Stammzellerneuerung oder der Zelldifferenzierung haben. Obwohl verschiedene Aspekte ihrer Biologie bereits erforscht wurden, sind viele Ago-Proteine noch immer nur sehr unzureichend charakterisiert.

Angesichts ihrer vielfältigen Funktionen werden Ago-Proteine auch mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht. So konnte gezeigt werden, daß bestimmte Ago-Proteine mit FMRp interagieren, dem Gen, das bei dem vererbten Fragiles-X-Syndrom betroffen ist. Außerdem wurden einige Ago-Proteine mit der Regulation von Onkogenen und mit bestimmten Formen von Krebs assoziiert.

Humanes Ago-1 ist ein Protein von 97,1 kDa. Es reguliert *small interfering RNA* (siRNA)-vermitteltes Silencing der Transkription durch Assoziation mit RNA Polymerase II (RNPII) und Induktion der Methylierung von Histonen, und es findet sich gehäuft in zytoplasmatischen Prozessierungskörperchen, den sogenannten P-Körperchen. Obwohl die Kristallstruktur der siRNA-bindenden Domäne von Ago-1, der sogenannten PAZ-Domäne, mit einem daran gebundenen doppelsträngigen siRNA-ähnlichen 9-mer bestimmt werden konnte, ist über die biologische Funktion von intaktem Ago-1 sehr wenig bekannt.

Humanes Ago-2 ist ein Protein von 97,25 kDa. Es ist eine Kernkomponente des RISC (*RNA-induced silencing complex*), in dem es Funktionen hat, die mit der Hemmung und dem Abbau von mRNA in Zusammenhang stehen. Bindung von microRNA (miRNA) oder *small interfering* RNA (siRNA) an mRNA innerhalb des RISC führt entweder zu Hemmung der Translation oder Zerstörung der mRNA. Ago-2 ist bei den Säugetieren das einzige Ago-Protein, das eine mRNA spaltende Aktivität aufweist. Des Weiteren konnte gezeigt werden, daß Ago-2 ein zentraler Regulator der miRNA Homeostase ist, und regulatorische Funktionen bei der Frühentwicklung und der Hämatopoiese innehat. Dennoch ist über viele Aspekte der biologischen Funktion von Ago-2 noch wenig bekannt.

Humanes Ago-3 liegt in zwei Splicing-Varianten vor, der Isoform a und der Isoform b. Die Ago-3b kodierende mRNA und das entsprechende Protein sind kürzer als bei der Isoform a (Tabelle 1), wobei die verbleibende Sequenz bei beiden Varianten identisch ist. Über die biologische Funktion dieser Ago-3 Varianten ist sehr wenig bekannt.

Tabelle 1: mRNA Länge und Molekulargewicht von Ago-3a und Ago-3b

	mRNA Länge (b)	MW Protein (kDa)
Ago-3a	3578	97,4
Ago-3b	3320	71,2

Über humanes Ago-4 und seine biologischen Funktionen ist noch sehr wenig bekannt.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, neue und effektive Systeme für die Untersuchung von Argonaute-Proteinen und deren biologischen Funktionen, sowie für die Prävention und Behandlung von Störungen oder Krankheiten, die mit Argonaute-Proteinen in Zusammenhang stehen, bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung gelöst. Insbesondere werden erfindungsgemäß anti-sense Oligonukleotide (asONs) für die spezifische Hemmung der Expression von Argonaute-Proteinen bereitgestellt, die nicht auf RNA-vermittelter Interferenz (RNAi) basieren, sondern einen RNAse H-abhängigen Weg benutzen. Diese asONs zeichnen sich durch besonders effektives Assoziationsverhalten an Argonaute-mRNA aus.

Dementsprechend betrifft ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein Oligonukleotid, umfassend eine oder mehrere der Sequenzen, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus SEQ ID NO: 1 (5´-TATTCCTGCCCCCGTAGAG-3´), SEQ ID NO: 2 (5´-GTTTTGTGTTGCTTTCACTCTCAG-3´), SEQ ID NO: 3 (5´-GTGTTTTGT GTTGCTTTCACTCTC-3´), SEQ ID NO: 4 (5´-GTTTTGTGTTGCTTTCACTCTC-3´), SEQ ID NO: 14 (5´-GATCTTAGGGATGTCCACCTC-3´), SEQ ID NO: 15 (5´-CACCT CGTAGTGGTACACGT-3´), SEQ ID NO: 16 (5´-GCTTGGGCTGCTCATCTATG-3´), SEQ ID NO: 18 (5´-AGAAAAATGAACGCCCCACA-3´), SEQ ID NO: 19 (5´-CTTCTG GAGCGGAGAAAAAT-3´), SEQ ID NO: 20 (5´-CTAGTGGCAGGTAGGTGTGT-3´), SEQ ID NO: 21 (5´-GTGCAGGTATAGAAACAGAT-3´), SEQ ID NO: 22 (5´-CAGACT TCTAGTGGCAGG TA-3´), SEQ ID NO: 23 (5´-CCCTGCCACAATATTACAGACTT-3´), SEQ ID NO: 24 (5´-GTTGCCCTGCCACAATATTA-3´), SEQ ID NO: 30 (5´-CAG GCAAAGATTGGAAAGGG-3´), SEQ ID NO: 31 (5´-CAAGTTTTGCATTTATCTTC-3´), SEQ ID NO: 32 (5´-TGCAAGTAGTCGTGTGAGTT-3´), SEQ ID NO: 33 (5´-AATT TGTACTGCAAGTAGTC-3´), SEQ ID NO: 34 (5´-GTTTATGAGATTTGGACCGT-3´), SEQ ID NO: 35 (5´-GAGAAGGCTAGTTTATGAGA-3´) und biologisch aktiven Derivaten davon. Der Begriff „biologisch aktive Derivate“ bezeichnet insbesondere Oligonukleotide, welche die gleiche Funktion wie das erfindungsgemäße Oligonukleotid aufweisen, also spezifisch an Argonaute-mRNA binden können, und mehr als 80%, bevorzugt mehr als 90%, besonders bevorzugt mehr als 95% Sequenzidentität zu dem erfindungsgemäßen Oligonukleotid zeigen.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Oligonukleotids ist das Argonaute-Protein Argonaute-2 (Ago-2) und das erfindungsgemäße Oligonukleotid umfaßt eine oder mehrere der Sequenzen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4 und biologisch aktiven Derivaten davon.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Oligonukleotids ist das Argonaute-Protein Argonaute-1 (Ago-1) und das erfindungsgemäße Oligonukleotid umfaßt eine oder mehrere der Sequenzen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 14, 15, 16 und biologisch aktiven Derivaten davon.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Oligonukleotids ist das Argonaute-Protein Argonaute-3 (Ago-3) und das erfindungsgemäße Oligonukleotid umfaßt eine oder mehrere der Sequenzen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 und biologisch aktiven Derivaten davon. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfaßt das erfindungsgemäße Oligonukleotid eine oder mehrere der Sequenzen, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 20, 21, 22, 23, 24 und biologisch aktiven Derivate davon. In einer bevorzugten Ausführungsform liegt Ago-3 als Isoform Ago-3a vor. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform liegt Ago-3 als Isoform Ago-3b vor. Liegt Ago-3 als Ago-3b vor, so umfaßt das erfindungsgemäße Oligonukleotid bevorzugt eine oder mehrere der Sequenzen, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 20, 21, 22, 23, 24 und biologisch aktiven Derivaten davon.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Oligonukleotids ist das Argonaute-Protein Argonaute-4 (Ago-4) und das erfindungsgemäße Oligonukleotid umfaßt eine oder mehrere der Sequenzen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 30, 31, 32, 33, 34, 35 und biologisch aktiven Derivaten davon.

Der Begriff „Oligonukleotid“ bezeichnet ein natives, halbsynthetisches, synthetisches oder modifiziertes, einzel- oder doppelsträngiges Nukleinsäuremolekül aus Desoxyribonukleotiden und/oder Ribonukleotiden und/oder modifizierten

Nukleotiden. Geeignete modifizierte Nukleotide umfassen Nukleotide mit modifizierten Basen, Zuckern und/oder Phosphatgruppen. Beispiele für modifizierte Nukleotide sind sogenannte LNAs (*locked nucleic acids*), bei denen das C2- und C4-Atom der Ribose über eine Sauerstoff-Methylen-Brücke verbunden ist, sowie Morpholino-Derivate von Nukleotiden, Nukleotid-Phosphorothioate, oder 2'-fluoro- und 2'-alkyl-modifizierte Nukleotide. Weiter können die erfindungsgemäßen Oligonukleotide beispielsweise als sogenannte „Gapmere" vorliegen, also als Oligonukleotide, bei denen beispielsweise ein zentraler Abschnitt aus Desoxyribonukleotiden gebildet ist, der von Abschnitten aus 2'-O-methyl-modifizierten Ribonukleotiden flankiert ist.

Die Länge des erfindungsgemäßen Oligonukleotids unterliegt keinen besonderen Beschränkungen, wobei die Mindestlänge durch die Länge der Sequenzen SEQ ID NOs: 1 bis 4, 14 bis 16, 18 bis 24 und 30 bis 35 vorgegeben ist. In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt das erfindungsgemäße Oligonukleotid 28 oder weniger, bevorzugt 23 oder weniger, besonders bevorzugt 18 oder weniger Nukleotide. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform besteht das erfindungsgemäße Oligonukleotid aus einer der Sequenzen SEQ ID NOs: 1 bis 4, 14 bis 16, 18 bis 24 und 30 bis 35. Verfahren zur Herstellung und/oder Isolierung von Oligonukleotiden sind dem Fachmann aus dem Stand der Technik bekannt und umfassen beispielsweise chemisch-synthetische oder enzymatische Verfahren, sowie die intrazelluläre Expression und nachfolgende Aufreinigung der Oligonukleotide.

Das erfindungsgemäße Oligonukleotid hat in einer bevorzugten Ausführungsform die Fähigkeit, spezifisch an Ago-1-, Ago-2-, Ago-3- und/oder Ago-4-mRNA zu binden bzw. zu hybridisieren. Die Hybridisierung wird bevorzugt bei Bedingungen, die den physiologischen Bedingungen im Zytosol oder Zellkern einer Zelle entsprechen, durchgeführt. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Hybridisierung bei Bedingungen, die für die *in vitro* Hybridisierung förderlich sind, durchgeführt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Hybridisierung unter stringenten Bedingungen. Die genannten Bedingungen sind dem Fachmann aus dem Stand der Technik bekannt.

Das erfindungsgemäße Oligonukleotid kann Nukleotiddeletionen, -insertionen und/oder -substitutionen enthalten, solange die Fähigkeit, spezifisch an Ago-1-, Ago-2-, Ago-3- und/oder Ago-4-mRNA zu binden, im Wesentlichen erhalten bleibt. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt das erfindungsgemäße Oligonukleotid mindestens eine modifizierte Nukleosidverknüpfung. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind alle Nukleosidverknüpfungen modifiziert. Eine besonders bevorzugte modifizierte Nukleosidverknüpfung ist die Phosphorothioat-Verknüpfung.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid zur spezifischen Hemmung der Ago-1-, Ago-2-, Ago-3- und/oder Ago-4- Expression in einer Zelle. Der Begriff „Hemmung der Argonaute-Expression" bezeichnet eine Reduzierung der Expression von Argonaute-mRNA auf höchstens 50%, bevorzugt höchstens 35%, mehr bevorzugt höchstens 20% der normalen Expression von Argonaute-mRNA in einer Zelle.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Hemmung der Ago-2, Ago-1, Ago-3 und/oder Ago-4 Expression bereits vier Stunden nach Transfektion einer Zelle mit dem entsprechenden erfindungsgemäßen Oligonukleotid erreicht. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform dauert die Hemmung der Ago-2, Ago-1, Ago-3 und/oder Ago-4 Expression bis zu 120 Stunden, mehr bevorzugt bis zu 72 Stunden und besonders bevorzugt bis zu 48 Stunden nach Transfektion einer Zelle mit dem entsprechenden erfindungsgemäßen Oligonukleotids an. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Hemmung der Ago-2, Ago-1, Ago-3 und/oder Ago-4 Expression in einer Zelle *in vitro* durchgeführt. Die Zelle, in der die Expression von Ago-2, Ago-1, Ago-3 und/oder Ago-4 gehemmt wird, ist bevorzugt eine humane Zelle.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid zur Herstellung einer diagnostischen oder pharmazeutischen Zusammensetzung. Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung wird in einer bevorzugten Ausführungsform zur spezifischen Hemmung der Ago-2, Ago-1, Ago-3 und/oder Ago-4 Expression in einer Zelle verwendet. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die erfindungsgemäße diagnostische oder

pharmazeutische Zusammensetzung für die Prävention oder Behandlung einer Störung oder Krankheit, die mit Ago-2, Ago-1, Ago-3 und/oder Ago-4 in Zusammenhang steht, in einem Individuum verwendet. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung des erfindungsgemäßen Oligonukleotids oder des erfindungsgemäßen Vektors zur Hemmung der Expression von Ago-2, Ago-1, Ago-3 und/oder Ago-4 in einer Zelle. Dabei wird in einer bevorzugten Ausführungsform die Expression von Ago-2, Ago-1, Ago-3 und/oder Ago-4 in einer Zelle *in vitro* gehemmt.

Die Störung oder Krankheit, die mit Ago-2 in Zusammenhang steht, ist in einer bevorzugten Ausführungsform eine Störung oder Krankheit der Angiogenese, der Hämatopoese, der Embryogenese oder der microRNA-Biogenese, Chorea Huntington oder die Entstehung von Tumoren, insbesondere Tumoren der weiblichen Brust.

Die Störung oder Krankheit, die mit Ago-1 in Zusammenhang steht, ist in einer bevorzugten Ausführungsform eine Störung oder Krankheit der Angiogenese, der Hämatopoese, der Embryogenese oder der microRNA-Biogenese, Chorea Huntington oder die Entstehung von Tumoren.

Die Störung oder Krankheit, die mit Ago-3 in Zusammenhang steht, ist in einer bevorzugten Ausführungsform eine Störung oder Krankheit der Angiogenese, der Hämatopoese, der Embryogenese oder der microRNA-Biogenese, Chorea Huntington oder die Entstehung von Tumoren.

Die Störung oder Krankheit, die mit Ago-4 in Zusammenhang steht, ist in einer bevorzugten Ausführungsform eine Störung oder Krankheit der Angiogenese, der Hämatopoese, der Embryogenese oder der microRNA-Biogenese, Chorea Huntington oder die Entstehung von Tumoren.

Das Individuum, das eine mit Ago-2, Ago-1, Ago-3 und/oder Ago-4 in Zusammenhang stehende Störung oder Krankheit aufweist, kann jedes Wirbeltier sein und ist in einer bevorzugten Ausführungsform ein Säuger, besonders bevorzugt ein Mensch.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein Nukleinsäure-Konstrukt, umfassend mindestens ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid und mindestens eine detektierbare Markierung, sowie dessen Verwendung zum Nachweis von Ago-2, Ago-1, Ago-3 und/oder Ago-4 mRNA. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Ago-2, Ago-1, Ago-3 und/oder Ago-4 mRNA in einer Zelle nachgewiesen. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Ago-2, Ago-1, Ago-3 und/oder Ago-4 mRNA in einer Zelle *in vitro* nachgewiesen.

Der Begriff „detektierbare Markierung" beinhaltet geeignete, direkt oder indirekt nachweisbare Atome oder Moleküle, die in das erfindungsgemäße Oligonukleotid eingebaut und/oder daran gebunden sind. Geeignete Markierungen sind beispielsweise solche, die Fluoreszenzfarbstoffe und/oder beispielsweise Biotin und/oder Digoxigenin und/oder radioaktive Isotope umfassen. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die detektierbare Markierung ein Fluoreszenzfarbstoff.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft einen Vektor, umfassend mindestens ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid und/oder mindestens eine zum erfindungsgemäßen Oligonukleotid komplementäre Nukleinsäuresequenz, insbesondere DNA-Sequenz. Der erfindungsgemäße Vektor unterliegt keiner besonderen Einschränkung, wobei geeignete Vektoren im Stand der Technik bekannt sind. Der Vektor ist vorzugsweise zur Expression in einer eukaryontischen oder prokaryontischen Zelle befähigt. Dazu enthält der Vektor beispielsweise einen Promotor und gegebenenfalls geeignete regulatorische Elemente, wie Enhancer und Terminationssequenzen. Der Vektor kann auch zur stabilen Integration des erfindungsgemäßen Oligonukleotids in das genetische Material einer Zelle verwendet werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft eine Wirtszelle, welche mindestens ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid oder mindestens einen erfindungsgemäßen Vektor enthält. Geeignete Wirtszellen sind beispielsweise Säugerzellen, insbesondere menschliche Zellen.

Des Weiteren wird erfindungsgemäß eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend mindestens ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid oder mindestens

einen erfindungsgemäßen Vektor, bereitgestellt. Gegebenenfalls umfaßt die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung weiter einen oder mehrere pharmazeutisch verträgliche(n) Hilfsstoff(e) und/oder ein oder mehrere pharmazeutisch verträgliche(s) Verdünnungsmittel und/oder einen oder mehrere pharmazeutisch verträgliche(n) Träger. Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung wird vorzugsweise zur präventiven oder therapeutischen Behandlung einer Störung oder Krankheit, die mit Ago-2, Ago-1, Ago-3 und/oder Ago-4 in Zusammenhang steht, verwendet. Besonders bevorzugte Einsatzgebiete sind die Behandlung von Störungen oder Krankheiten der Angiogenese, der Hämatopoese, der Embryogenese oder der microRNA-Biogenese, von Chorea Huntington oder von Tumoren, insbesondere Tumoren der weiblichen Brust. Dementsprechend betrifft ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend mindestens ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid oder mindestens einen erfindungsgemäßen Vektor, gegebenenfalls in Verbindung mit einem oder mehreren pharmazeutisch verträglichen Hilfsstoff(en) und/oder Verdünnungsmittel(n) und/oder Träger(n) zur Verwendung in der präventiven oder therapeutischen Behandlung einer Störung oder Krankheit, die mit Ago-2, Ago-1, Ago-3 und/oder Ago-4 in Zusammenhang steht, in einem Individuum. Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung kann jegliche im vorliegenden Fachgebiet als geeignet betrachtete galenische Formen annehmen. Vorzugsweise ist sie fest, flüssig oder aerosolartig. Verabreichungsformen der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung unterliegen keinerlei bestimmten Beschränkungen. Geeignete Verabreichungsformen sind im Stand der Technik bekannt und umfassen beispielsweise orale, intravenöse, subkutane, intraperitoneale, intramuskuläre oder intratumorale Verabreichungsformen. Ebenso wird erfindungsgemäß eine diagnostische Zusammensetzung, umfassend mindestens ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid oder mindestens ein erfindungsgemäßes Nukleinsäure-Konstrukt, bereitgestellt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur spezifischen Hemmung der Expression von Ago-2, Ago-1, Ago-3 und/oder Ago-4 in einer Zelle, umfassend das Einbringen mindestens eines erfindungsgemäßen Oligonukleotids oder mindestens eines erfindungsgemäßen Vektors in die Zelle und

gegebenenfalls das Bereitstellen von geeigneten Hybridisierungsbedingungen, so daß die Expression von Ago-2, Ago-1, Ago-3 und/oder Ago-4 gehemmt wird. In einer bevorzugten Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren zur spezifischen Hemmung der Expression von Ago-2, Ago-1, Ago-3 und/oder Ago-4 in einer Zelle *in vivo*, d.h. innerhalb des tierischen oder menschlichen Körpers durchgeführt. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das genannte Verfahren *in vitro*, d.h. außerhalb des tierischen oder menschlichen Körpers durchgeführt. Verfahren zum Einbringen einer Nukleinsäure in eine Zelle sind im vorliegenden Fachgebiet wohlbekannt, und umfassen beispielsweise die Transfektion durch Elektroporation oder mit einem Transfektionsmittel wie z.B. Lipofectamin 2000. Die Hemmung der Ago-2, Ago-1, Ago-3 und/oder Ago-4 Expression in der Zelle hat vorzugsweise zur Folge, daß die RNA-vermittelte Interferenz (RNAi) der Zelle moduliert wird. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Zelle, deren Ago-2, Ago-1, Ago-3 und/oder Ago-4 Expression gehemmt werden soll, eine humane Zelle.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Ago-2, Ago-1, Ago-3 und/oder Ago-4 mRNA, umfassend das Inkontaktbringen des erfindungsgemäßen Konstrukts mit einer Ago-2, Ago-1, Ago-3 und/oder Ago-4 mRNA und das Bereitstellen von geeigneten Hybridisierungsbedingungen. Dieses Verfahren wird in einer bevorzugten Ausführungsform *in vitro* durchgeführt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Ago-2, Ago-1, Ago-3 und/oder Ago-4 mRNA in einer Zelle, umfassend das Einbringen des erfindungsgemäßen Nukleinsäure-Konstrukts in eine Zelle, das Bereitstellen von geeigneten Hybridisierungsbedingungen und das Nachweisen der detektierbaren Markierung. Verfahren zum Nachweis der jeweiligen Markierung sind im vorliegenden Fachgebiet wohlbekannt. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Zelle, in der Ago-2, Ago-1, Ago-3 und/oder Ago-4 mRNA nachgewiesen werden soll, eine humane Zelle. Dieses Verfahren wird in einer bevorzugten Ausführungsform *in vitro* durchgeführt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft einen Biochip/Microarray, umfassend ein oder mehrere immobilisierte(s) erfindungsgemäße(s) Oligonukleotid(e) und/oder ein oder mehrere immobilisierte(s) erfindungsgemäße(s) Nukleinsäure-Konstrukt(e). Der erfindungsgemäße Biochip/Microarray kann zum Nachweis von Ago-2, Ago-1, Ago-3 und/oder Ago-4 mRNA verwendet werden. Die vorliegende Erfindung umfaßt die Verwendung des erfindungsgemäßen Biochips/Microarrays zum Nachweis von Ago-2, Ago-1, Ago-3 und/oder Ago-4 mRNA.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung des erfindungsgemäßen Oligonukleotids oder des erfindungsgemäßen Nukleinsäure-Konstrukts für die Diagnose einer Störung oder Krankheit, die mit Ago-2, Ago-1, Ago-3 und/oder Ago-4 in Zusammenhang steht. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung des erfindungsgemäßen Oligonukleotids oder des erfindungsgemäßen Vektors zur Behandlung einer Störung oder Krankheit, die mit Ago-2, Ago-1, Ago-3 und/oder Ago-4 in Zusammenhang steht.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Behandlung einer Störung oder Krankheit, die mit Ago-2, Ago-1, Ago-3 und/oder Ago-4 in Zusammenhang steht, in einem Individuum, umfassend das Verabreichen mindestens eines erfindungsgemäßen Oligonukleotids und/oder mindestens eines erfindungsgemäßen Vektors oder der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung an das Individuum.

Die Störung oder Krankheit, die mit Ago-2 in Zusammenhang steht, ist in einer bevorzugten Ausführungsform eine Störung oder Krankheit der Angiogenese, der Hämatopoese, der Embryogenese oder der microRNA-Biogenese, Chorea Huntington oder die Entstehung von Tumoren, insbesondere Tumoren der weiblichen Brust.

Die Störung oder Krankheit, die mit Ago-1 in Zusammenhang steht, ist in einer bevorzugten Ausführungsform eine Störung oder Krankheit der Angiogenese, der Hämatopoese, der Embryogenese oder der microRNA-Biogenese, Chorea

Huntington oder die Entstehung von Tumoren.

Die Störung oder Krankheit, die mit Ago-3 in Zusammenhang steht, ist in einer bevorzugten Ausführungsform eine Störung oder Krankheit der Angiogenese, der Hämatopoese, der Embryogenese oder der microRNA-Biogenese, Chorea Huntington oder die Entstehung von Tumoren.

Die Störung oder Krankheit, die mit Ago-4 in Zusammenhang steht, ist in einer bevorzugten Ausführungsform eine Störung oder Krankheit der Angiogenese, der Hämatopoese, der Embryogenese oder der microRNA-Biogenese, Chorea Huntington oder die Entstehung von Tumoren.

Das Individuum, das eine mit Ago-2, Ago-1, Ago-3 und/oder Ago-4 in Zusammenhang stehende Störung oder Krankheit aufweist, ist in einer bevorzugten Ausführungsform ein Mensch.

Die Figuren zeigen:

Fig. 1: Schematische Darstellung der Ago-2 mRNA mit den Bindungsstellen für SEQ ID NOs: 1 bis 13.

Fig. 2: Hemmung der Expression von humaner Ago-2 mRNA in ECV304 Zellen durch gegen Ago-2 mRNA gerichtete asONs. Die Expression von Ago-2 mRNA wurde gegen das Kontroll-Oligonukleotid asON scr (auch bezeichnet als T1-inv; SEQ ID NO: 36, 5`-TACCGCTCTTTTGACTTTTA-3`) (schwarzer Balken), das auf 100% gesetzt wurde, normalisiert. Als Positivkontrolle (weißer Balken) kam das asON ISIS136764 (SEQ ID NO: 37, 5`-CTGCTGGAATGTTTCCACTT-3`) zum Einsatz.

Fig. 3: Spezifität der Ago-2-spezifischen asONs gegenüber anderen humanen Argonaute-Proteinen (Agos). Die Expression der Ago mRNAs wurde gegen das Kontroll-Oligonukleotid asON scr, das auf 100% gesetzt wurde, normalisiert.

Fig. 4: Zeitkinetik der Hemmung der Expression von Ago-2 mRNA durch die asONs 1295/19 (SEQ ID NO: 1) und 3024/24 (SEQ ID NO: 3). Die Expression von Ago-2 mRNA wurde gegen das Kontroll-Oligonukleotid asON scr, das auf 100% gesetzt wurde, normalisiert.

Fig. 5: Schematische Darstellung der Ago-1 mRNA mit den Bindungsstellen für SEQ ID NOs: 14 bis 16.

Fig. 6: Hemmung der Expression von humaner Ago-1 mRNA in ECV304 Zellen durch gegen Ago-1 mRNA gerichtete asONs. Die Expression von Ago-1 mRNA wurde gegen das Kontroll-Oligonukleotid T1-inv, das auf 100% gesetzt wurde, normalisiert.

Fig. 7: Dosis-Wirkungs-Kurve für gegen Ago-1 mRNA gerichtete asONs. Die IC_{50}-Werte der asONs durch Transfektion von ECV304 Zellen mit aufsteigenden asON-Konzentrationen bestimmt. Die Daten der anschließenden quantitativen PCR wurden mit der Software GraFit 5 ausgewertet. Die Expression von Ago-1 mRNA wurde gegen das Kontroll-Oligonukleotid T1-inv, das auf 100% gesetzt wurde, normalisiert.

Fig. 8: Spezifität der Ago-1-spezifischen asONs gegenüber anderen humanen Argonaute-Proteinen (Agos). Die Expression der Ago mRNAs wurde gegen das Kontroll-Oligonukleotid T1-inv, das auf 100% gesetzt wurde, normalisiert.

Fig. 9: Zeitkinetik der Hemmung der Expression von Ago-1 mRNA durch das asON as343/21 (SEQ ID NO: 14). Die Expression von Ago-1 mRNA wurde gegen das Kontroll-Oligonukleotid T1-inv, das auf 100% gesetzt wurde, normalisiert.

Fig. 10: Schematische Darstellung der Ago-3a mRNA und der Ago-3b mRNA mit den Bindungsstellen für SEQ ID NOs: 18 bis 24. Die asONs asAgo3-1 und asAgo3-2 binden nur an Ago-3a mRNA, und die asONs asAgo3-6 und asAgo3-7 nur an Ago-3b mRNA. Alle anderen asONs binden an beide

Isoformen.

Fig. 11: Hemmung der Expression von humaner Ago-3a mRNA (A) und Ago-3b mRNA (B) in ECV304 Zellen durch gegen Ago-3a mRNA und/oder Ago-3b mRNA gerichtete asONs. Die Expression von Ago-3a mRNA und Ago-3b mRNA wurde gegen das Kontroll-Oligonukleotid T1-inv, das auf 100% gesetzt wurde, normalisiert.

Fig. 12: Spezifität der asONs asAgo3-1 und asAgo3-10 gegenüber anderen humanen Argonaute-Proteinen (Agos). Die Expression der Ago mRNAs wurde gegen das Kontroll-Oligonukleotid T1-inv, das auf 100% gesetzt wurde, normalisiert.

Fig. 13: Zeitkinetik der Hemmung der Expression von Ago-3a mRNA und Ago-3b mRNA durch die asONs asAgo3-1 (SEQ ID NO: 18) und asAgo3-10 (SEQ ID NO: 24). Die Expression von Ago-3 mRNA wurde gegen das Kontroll-Oligonukleotid T1-inv, das auf 100% gesetzt wurde, normalisiert.

Fig. 14: Schematische Darstellung der Ago-4 mRNA mit den Bindungsstellen für SEQ ID NOs: 30 bis 35.

Fig. 15: Hemmung der Expression von humaner Ago-4 mRNA in ECV304 Zellen durch gegen Ago-4 mRNA gerichtete asONs. Die Expression von Ago-4 mRNA wurde gegen das Kontroll-Oligonukleotid T1-inv, das auf 100% gesetzt wurde, normalisiert.

Fig. 16: Spezifität der Ago-4-spezifischen asONs gegenüber anderen humanen Argonaute-Proteinen (Agos). Die Expression der Ago mRNAs wurde gegen das Kontroll-Oligonukleotid T1-inv, das auf 100% gesetzt wurde, normalisiert.

Fig. 17: Zeitkinetik der Hemmung der Expression von Ago-4 mRNA durch die asONs as1842/20 (SEQ ID NO: 30) und as4510/20 (SEQ ID NO: 34). Die Expression von Ago-4 mRNA wurde gegen das Kontroll-Oligonukleotid T1-

inv, das auf 100% gesetzt wurde, normalisiert.

Die vorliegende Erfindung wird anhand der folgenden, nicht-einschränkenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1: Ago-2-spezifische anti-sense Oligonukleotide

Es wurden 13 vollständig Phosphorothioat-modifizierte asONs getestet (Tabelle 2). Die Lage der Bindungsstellen der asONs an Ago-2 mRNA ist in Fig. 1 dargestellt. Die asONs sind gegen Bereiche des offenen Leserasters (*open reading frame*, ORF) der Ago-2 mRNA, und gegen Bereiche der 3´ untranslatierten Region (3´-UTR) gerichtet.

Tabelle 2: Getestete Ago-2-spezifische asONs.

Name	Sequenz (5´nach 3´)	SEQ ID NO
asON 140/20	AATTTGATTGTTCTCCCGGA	5
asON 1295/19	TATTCCTGCCCCCGTAGAG	1
asON 2269/20	GGTAGAAGTCGAACTCGGTG	6
asON 2953/20	TTAAAAACAAGTAAATTGAA	7
asON 2966/20	GAGAATCATGTATTAAAAAC	8
asON 2978/20	ATCAATTTCATAGAGAATCA	9
asON ISIS136764	CTGCTGGAATGTTTCCACTT	10
asON 3022/24	GTTTTGTGTTGCTTTCACTCTCAG	2
asON 3024/24	GTGTTTTGTGTTGCTTTCACTCTC	3
asON 3024/22	GTTTTGTGTTGCTTTCACTCTC	4
asON 3025/21	GTTTTGTGTTGCTTTCACTCT	11
asON 3340/20	GATGATTAGACTGTCAGTAT	12
asON 3327/25	GACTGTCAGTATATTGTCTTTTTTC	13

Beispiel 2: Hemmung humaner Ago-2 mRNA

Die Fähigkeit der in Tabelle 1 gezeigten asONs, humane Ago-2 mRNA zu hemmen, wurde *in vitro* in der humanen Harnblasenkarzinomzelllinie ECV304 als Modellsystem getestet. ECV304 Zellen wurden mit 100 nM der spezifischen asONs durch Verwendung von Lipofectamin 2000 als Transfektionsmittel transfiziert. Nach

24 h in Kultur wurden die Zellen gesammelt, ihre RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben, und diese mittels quantitativer PCR amplifiziert. Die Wirkung der asONs auf die Ago-2 mRNA-Level ist in Fig. 2 gezeigt.

IC_{50}-Werte, d.h. die jeweilige asON-Konzentration, die benötigt wird, um 50% der Ago-2 mRNA Expression zu hemmen, wurden durch Transfektion von ECV304 Zellen mit aufsteigenden asON-Konzentrationen und nachfolgender quantitativer PCR bestimmt (Tabelle 3).

Tabelle 3: IC_{50}-Werte

Name	IC_{50} (nM)
asON 1295/19	≈ 70
asON ISIS136764	≈ 90
asON 3024/24	≈ 15

Beispiel 3: Spezifität Ago-2-spezifischer asONs

Die asONs 1295/19 und 3024/24 wurden auf ihre Spezifität für Ago-2 mRNA gegenüber anderen Ago mRNAs getestet. Die vier humanen Ago-Proteine weisen hoch homologe Sequenzen auf Nukleotid- und Peptidebene, mit bis zu 85% Aminosäureidentität, auf. 100 nM der asONs wurden in ECV304 Zellen mit Hilfe von Lipofectamin 2000 als Transfektionsmittel transfiziert. Nach 24 h in Kultur wurden die Zellen gesammelt, ihre RNA extrahiert, und in cDNA umgeschrieben. Die darauf folgende quantitative PCR wurde mit Primern für jedes Mitglied der humanen Ago-Familie durchgeführt. Die jeweiligen mRNA Expressionslevel für jedes Ago-Protein sind in Fig. 3 dargestellt.

Beispiel 4: Kinetik der Ago-2 mRNA Hemmung

Die asONs 1295/19 und 3024/24 hemmen die Expression von Ago-2 mRNA bereits 4 h nach Transfektion. Dieser Effekt dauert bis zu 48 h nach Transfektion an (Fig. 4).

Beispiel 5: Ago-1-spezifische anti-sense Oligonukleotide

Es wurden vier vollständig Phosphorothioat-modifizierte asONs getestet (Tabelle 4). Die Lage der Bindungsstellen der asONs an Ago-1 mRNA ist in Fig. 5 dargestellt. Alle asONs sind gegen Bereiche des offenen Leserasters (*open reading frame*, ORF) der Ago-1 mRNA gerichtet.

Tabelle 4: Getestete Ago-1-spezifische asONs.

Name	Sequenz (5´nach 3´)	SEQ ID NO
as343/21	GATCTTAGGGATGTCCACCTC	14
as365/20	CACCTCGTAGTGGTACACGT	15
as933/20	GCTTGGGCTGCTCATCTATG	16
as2339/22	TAGCTCATAGTGGAGTATCTGG	17

Beispiel 6: Hemmung humaner Ago-1 mRNA

Die Fähigkeit der in Tabelle 3 gezeigten asONs, humane Ago-1 mRNA zu hemmen, wurde *in vitro* in ECV304 Zellen als Modellsystem getestet. ECV304 Zellen wurden mit 100 nM der spezifischen asONs durch Verwendung von Lipofectamin 2000 als Transfektionsmittel transfiziert. Nach 24 h in Kultur wurden die Zellen gesammelt, ihre RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben, und diese mittels quantitativer PCR amplifiziert. Die Wirkung der asONs auf die Ago-1 mRNA-Level ist in Fig. 6 gezeigt.

IC_{50}-Werte, d.h. die jeweilige asON-Konzentration, die benötigt wird, um 50% der Ago-1 mRNA Expression zu hemmen, wurden durch Transfektion von ECV304 Zellen mit aufsteigenden asON-Konzentrationen bestimmt. Nach quantitativer PCR wurden die Daten mit Hilfe der Software GraFit 5 ausgewertet (Fig. 7).

Beispiel 7: Spezifität Ago-1-spezifischer asONs

Alle asONs wurden auf ihre Spezifität für Ago-1 mRNA gegenüber anderen Ago mRNAs getestet. Die vier humanen Ago-Proteine weisen hoch homologe Sequenzen auf Nukleotid- und Peptidebene auf. 100 nM der asONs wurden in ECV304 Zellen

mit Hilfe von Lipofectamin 2000 als Transfektionsmittel transfiziert. Nach der Transfektion wurde RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Die darauf folgende quantitative PCR wurde mit Primern für jedes Mitglied der humanen Ago-Familie durchgeführt. Die jeweiligen mRNA Expressionslevel für jedes Ago-Protein sind in Fig. 8 dargestellt.

Beispiel 8: Kinetik der Ago-1 mRNA Hemmung

Das asON as343/21 hemmt die Expression von Ago-1 mRNA bereits 4 h nach Transfektion. Dieser Effekt dauert bis zu 72 h nach Transfektion an (Fig. 9).

Beispiel 9: Ago-3-spezifische anti-sense Oligonukleotide

Es wurden zwölf vollständig Phosphorothioat-modifizierte asONs getestet (Tabelle 5). Die Lage der Bindungsstellen der asONs an Ago-3a mRNA bzw. Ago-3b mRNA ist in Fig. 10 dargestellt. Die asONs asAgo3-6 und asAgo3-7 sind gegen Bereiche der 5´ untranslatierten Region (5´-UTR) der Ago-3b mRNA gerichtet. Die übrigen asONs sind gegen Bereiche des offenen Leserasters (*open reading frame*, ORF) der Ago-3a mRNA bzw. Ago-3b mRNA gerichtet.

Tabelle 5: Getestete asONs.

Ziel-mRNA	Name	Sequenz (5´nach 3´)	SEQ ID NO
Ago-3a	asAgo3-1	AGAAAAATGAACGCCCCACA	18
	asAgo3-2	CTTCTGGAGCGGAGAAAAAT	19
Ago-3b	asAgo3-6	CGTCTAAATCTACCTGTTCACTCTC	25
	asAgo3-7	AAGTAACGTCTAAATCTACCTGTTC	26
Ago-3a & Ago-3b	asAgo3-3	CTAGTGGCAGGTAGGTGTGT	20
	asAgo3-4	GCAGGTATAGAAACAGATCG	27
	asAgo3-5	GTGCAGGTATAGAAACAGAT	21
	asAgo3-8	CAGACTTCTAGTGGCAGGTA	22
	asAgo3-9	CCCTGCCACAATATTACAGACTT	23
	asAgo3-10	GTTGCCCTGCCACAATATTA	24
	asAgo3-11	GTGCAGGTATAGAAACAGAT	28
	asAgo3-12	CGCTGGTGCAGGTATAGAAA	29

Beispiel 10: Hemmung humaner Ago-3a mRNA bzw. Ago-3b mRNA

Die Fähigkeit der in Tabelle 5 gezeigten asONs, humane Ago-3a mRNA bzw. Ago-3b mRNA zu hemmen, wurde *in vitro* in ECV304 Zellen als Modellsystem getestet. ECV304 Zellen wurden mit 100 nM der spezifischen asONs durch Verwendung von Lipofectamin 2000 als Transfektionsmittel transfiziert. Nach 24 h in Kultur wurden die Zellen gesammelt, ihre RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben, und diese mittels quantitativer PCR amplifiziert. Die Wirkung der asONs auf die Ago-3a mRNA-Level bzw. Ago-3b mRNA-Level ist in Fig. 11 gezeigt.

IC_{50}-Werte, d.h. die jeweilige asON-Konzentration, die benötigt wird, um 50% der Ago-3a mRNA bzw. Ago-3b mRNA Expression zu hemmen, wurden durch Transfektion von ECV304 Zellen mit aufsteigenden asON-Konzentrationen bestimmt. Nach quantitativer PCR wurden die Daten mit Hilfe der Software GraFit 5 ausgewertet (Tabelle 6).

Tabelle 6: IC_{50}-Werte

Ziel mRNA	asON	IC_{50} Ago-3a (nM)	IC_{50} Ago-3b (nM)
Ago-3a	asAgo3-1	≈ 10	nd
Ago-3a & Ago-3b	asAgo3-3	> 30	≈ 10
	asAgo3-10	≈ 10	≈ 5

Beispiel 11: Spezifität Ago-3-spezifischer asONs

Die asONs asAgo3-1 und asAgo3-10 wurden auf ihre Spezifität für Ago-3a mRNA bzw. Ago-3b mRNA gegenüber anderen Ago mRNAs getestet. 100 nM der asONs wurden in ECV304 Zellen mit Hilfe von Lipofectamin 2000 als Transfektionsmittel transfiziert. Nach der Transfektion wurde RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Die darauf folgende quantitative PCR wurde mit Primern für jedes Mitglied der humanen Ago-Familie durchgeführt. Die jeweiligen mRNA Expressionslevel für jedes Ago-Protein sind in Fig. 12 dargestellt.

Beispiel 12: Kinetik der Ago-3a mRNA und Ago-3b mRNA Hemmung

Das asON asAgo3-1 hemmt die Expression von Ago-3a mRNA bereits 4 h nach Transfektion. Dieser Effekt dauert bis zu 72 h nach Transfektion an. Das asON asAgo3-10 zeigt eine ähnliche Kinetik und wirkt auf beide Ago-3 mRNA Isoformen (Fig. 13).

Beispiel 13: Ago-4-spezifische anti-sense Oligonukleotide

Es wurden sechs vollständig Phosphorothioat-modifizierte asONs getestet (Tabelle 7). Die Lage der Bindungsstellen der asONs an Ago-4 mRNA ist in Fig. 14 dargestellt. Die asONs as1842/20 und as1861/20 sind gegen Bereiche des offenen Leserasters (*open reading frame*, ORF) der Ago-4 mRNA gerichtet. Die übrigen asONs sind gegen Bereiche der 3´ untranslatierten Region (3´-UTR) gerichtet.

Tabelle 7: Getestete Ago-4-spezifische asONs.

Name	Sequenz (5´nach 3´)	SEQ ID NO
as1842/20	CAGGCAAAGATTGGAAAGGG	30
as1861/20	CAAGTTTTGCATTTATCTTC	31
as3996/20	TGCAAGTAGTCGTGTGAGTT	32
as4005/20	AATTTGTACTGCAAGTAGTC	33
as4510/20	GTTTATGAGATTTGGACCGT	34
as4520/20	GAGAAGGCTAGTTTATGAGA	35

Beispiel 14: Hemmung humaner Ago-4 mRNA

Die Fähigkeit der in Tabelle 7 gezeigten asONs, humane Ago-4 mRNA zu hemmen, wurde *in vitro* in ECV304 Zellen als Modellsystem getestet. ECV304 Zellen wurden mit 100 nM der spezifischen asONs durch Verwendung von Lipofectamin 2000 als Transfektionsmittel transfiziert. Nach 24 h in Kultur wurden die Zellen gesammelt, ihre RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben, und diese mittels quantitativer PCR amplifiziert. Die Wirkung der asONs auf die Ago-4 mRNA-Level ist in Fig. 15 gezeigt.

IC_{50}-Werte, d.h. die jeweilige asON-Konzentration, die benötigt wird, um 50% der Ago-4 mRNA Expression zu hemmen, wurden durch Transfektion von ECV304 Zellen mit aufsteigenden asON-Konzentrationen bestimmt. Nach quantitativer PCR wurden die Daten mit Hilfe der Software GraFit 5 ausgewertet (Tabelle 8).

Tabelle 8: IC_{50}-Werte

asON	IC_{50} (nM)
as1842/20	≈ 15
as4510/20	≈ 10

Beispiel 15: Spezifität Ago-4-spezifischer asONs

Die asONs as1842/20 und as4510/20 wurden auf ihre Spezifität für Ago-4 mRNA gegenüber anderen Ago mRNAs getestet. Die vier humanen Ago-Proteine weisen hoch homologe Sequenzen auf Nukleotid- und Peptidebene auf. 100 nM der asONs wurden in ECV304 Zellen mit Hilfe von Lipofectamin 2000 als Transfektionsmittel transfiziert. Nach der Transfektion wurde RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Die darauf folgende quantitative PCR wurde mit Primern für jedes Mitglied der humanen Ago-Familie durchgeführt. Die jeweiligen mRNA Expressionslevel für jedes Ago-Protein sind in Fig. 16 dargestellt.

Beispiel 16: Kinetik der Ago-4 mRNA Hemmung

Die asONs as1842/20 und as4510/20 hemmen die Expression von Ago-4 mRNA bereits 4 h nach Transfektion. Dieser Effekt dauert bis zu 48 h nach Transfektion an (Fig. 17).

Ansprüche

1. Oligonukleotid, umfassend eine oder mehrere der Sequenzen, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 1 bis 4, 14 bis 16, 18 bis 24 und 30 bis 35, für die spezifische Hemmung der Expression eines Argonaute-Proteins in einer Zelle.

2. Oligonukleotid nach Anspruch 1, bestehend aus einer der Sequenzen, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 1 bis 4, 14 bis 16, 18 bis 24 und 30 bis 35.

3. Oligonukleotid nach Anspruch 1, umfassend eine oder mehrere der Sequenzen, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 1, 2, 3 und 4, wobei das Argonaute-Protein Argonaute-2 (Ago-2) ist.

4. Oligonukleotid nach Anspruch 3, bestehend aus einer der Sequenzen, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 1, 2, 3 und 4.

5. Oligonukleotid nach Anspruch 1, umfassend eine oder mehrere der Sequenzen, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 14, 15 und 16, wobei das Argonaute-Protein Argonaute-1 (Ago-1) ist.

6. Oligonukleotid nach Anspruch 5, bestehend aus einer der Sequenzen, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 14, 15 und 16.

7. Oligonukleotid nach Anspruch 1, umfassend eine oder mehrere der Sequenzen, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 18, 19, 20, 21, 22, 23 und 24, wobei das Argonaute-Protein Argonaute-3 (Ago-3) ist.

8. Oligonukleotid nach Anspruch 7, bestehend aus einer der Sequenzen, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 18, 19, 20, 21, 22, 23 und 24.

9. Oligonukleotid nach Anspruch 7 oder Anspruch 8, wobei Ago-3 in der Isoform Ago-3a vorliegt.

10. Oligonukleotid nach Anspruch 7, wobei Ago-3 in der Isoform Ago-3b vorliegt, und wobei das Oligonukleotid eine oder mehrere der Sequenzen, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 20, 21, 22, 23 und 24, umfaßt.

11. Oligonukleotid nach Anspruch 8, wobei Ago-3 in der Isoform Ago-3b vorliegt, und wobei das Oligonukleotid aus einer der Sequenzen, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 20, 21, 22, 23 und 24, besteht.

12. Oligonukleotid nach Anspruch 1, umfassend eine oder mehrere der Sequenzen, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 30, 31, 32, 33, 34 und 35, wobei das Argonaute-Protein Argonaute-4 (Ago-4) ist.

13. Oligonukleotid nach Anspruch 12, bestehend aus einer der Sequenzen, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 30, 31, 32, 33, 34 und 35.

14. Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei die spezifische Hemmung der Expression eines Argonaute-Proteins in einer Zelle *in vitro* durchgeführt wird.

15. Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei das Oligonukleotid mindestens eine modifizierte Nukleosidverknüpfung aufweist.

16. Oligonukleotid nach Anspruch 15, wobei die modifizierte Nukleosidverknüpfung eine Phosphorothioat-Verknüpfung ist.

17. Vektor, umfassend ein Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 16.

18. Nukleinsäure-Konstrukt, umfassend ein Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 16 und eine detektierbare Markierung.

19. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 16, gegebenenfalls in Verbindung mit einem oder mehreren pharmazeutisch verträglichen Hilfsstoff(en) und/oder Verdünnungsmittel(n) und/oder Träger(n).

20. Diagnostische Zusammensetzung, umfassend ein Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 16 oder das Nukleinsäure-Konstrukt nach Anspruch 18.

21. Verfahren zur spezifischen Hemmung der Expression eines Argonaute-Proteins in einer Zelle *in vitro*, umfassend das Einbringen eines Oligonukleotids nach einem der Ansprüche 1 bis 16 oder des Vektors nach Anspruch 17 in die Zelle und das Bereitstellen von geeigneten Hybridisierungsbedingungen.

22. Verfahren zum Nachweis von Argonaute-mRNA in einer Zelle *in vitro*, umfassend das Einbringen eines Nukleinsäure-Konstrukts nach Anspruch 18 in eine Zelle, das Bereitstellen von geeigneten Hybridisierungsbedingungen und das Nachweisen der detektierbaren Markierung.

23. Verwendung eines Oligonukleotids nach einem der Ansprüche 1 bis 16 zur Hemmung der Expression eines Argonaute-Proteins in einer Zelle *in vitro*.

24. Verwendung eines Oligonukleotids nach einem der Ansprüche 1 bis 16 oder des Nukleinsäure-Konstrukts nach Anspruch 18 für die Diagnose einer Störung oder Krankheit, die mit einem Argonaute-Protein in Zusammenhang steht.

25. Verwendung eines Oligonukleotids nach einem der Ansprüche 1 bis 16 für die Behandlung einer Störung oder Krankheit, die mit einem Argonaute-Protein in Zusammenhang steht.

Figuren

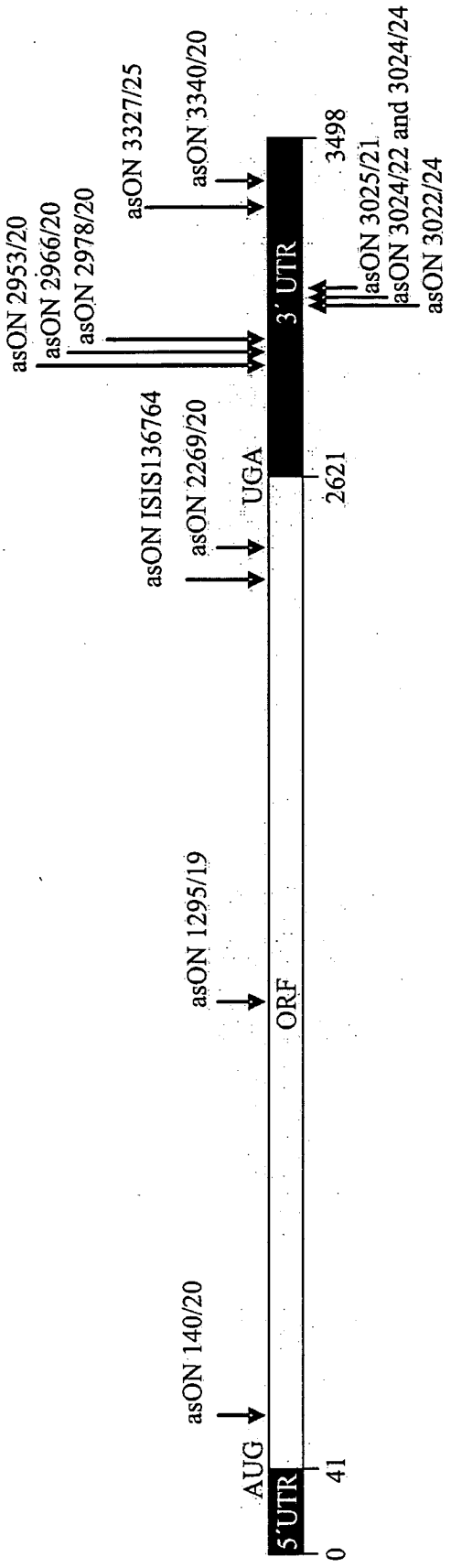

Fig. 1

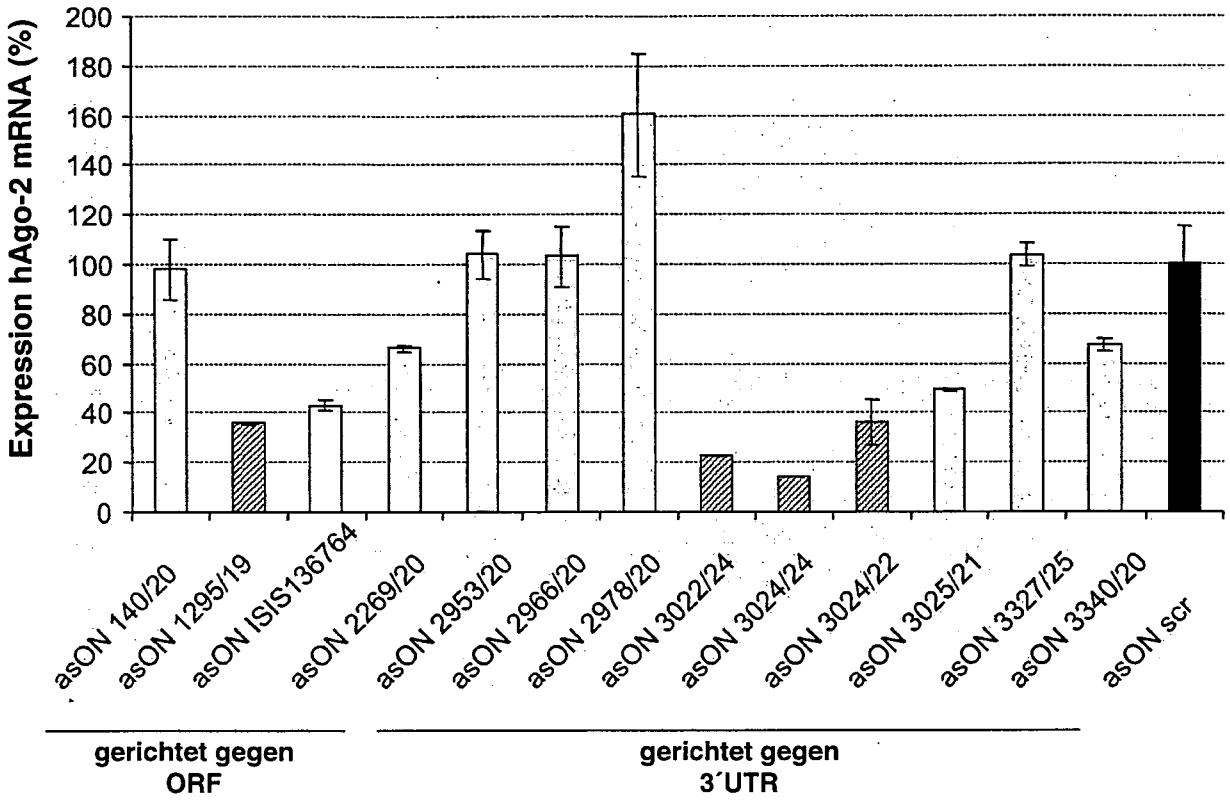
Expression hAgo-2 mRNA (%)
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
asON 140/20
asON 1295/19
asON ISIS136764
asON 2269/20
asON 2953/20
asON 2966/20
asON 2978/20
asON 3022/24
asON 3024/24
asON 3024/22
asON 3025/21
asON 3327/25
asON 3340/20
asON scr
gerichtet gegen ORF
gerichtet gegen 3´UTR

Fig. 2

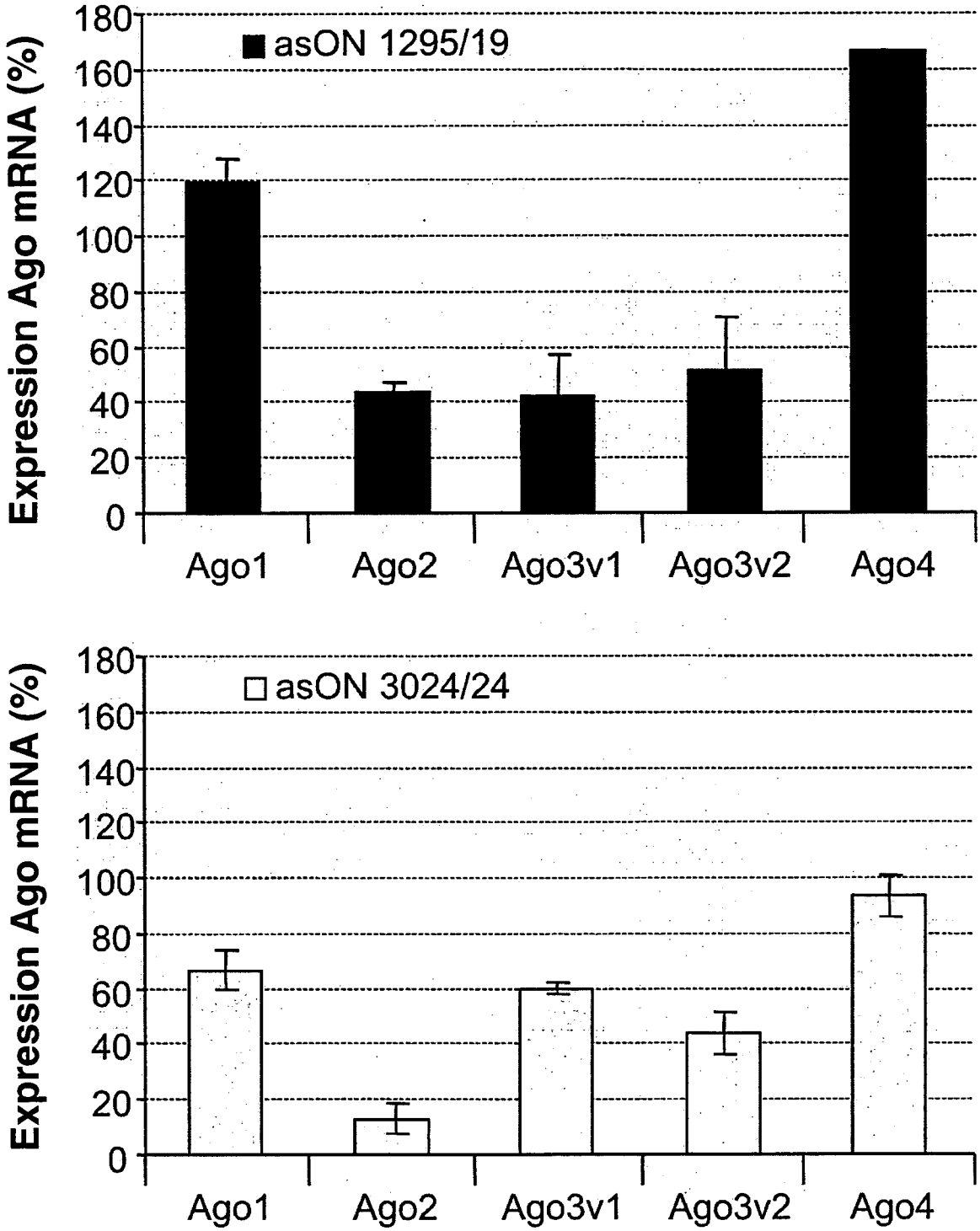
Expression Ago mRNA (%)
asON 1295/19
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Ago1
Ago2
Ago3v1
Ago3v2
Ago4
Expression Ago mRNA (%)
asON 3024/24
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Ago1
Ago2
Ago3v1
Ago3v2
Ago4

Fig. 3

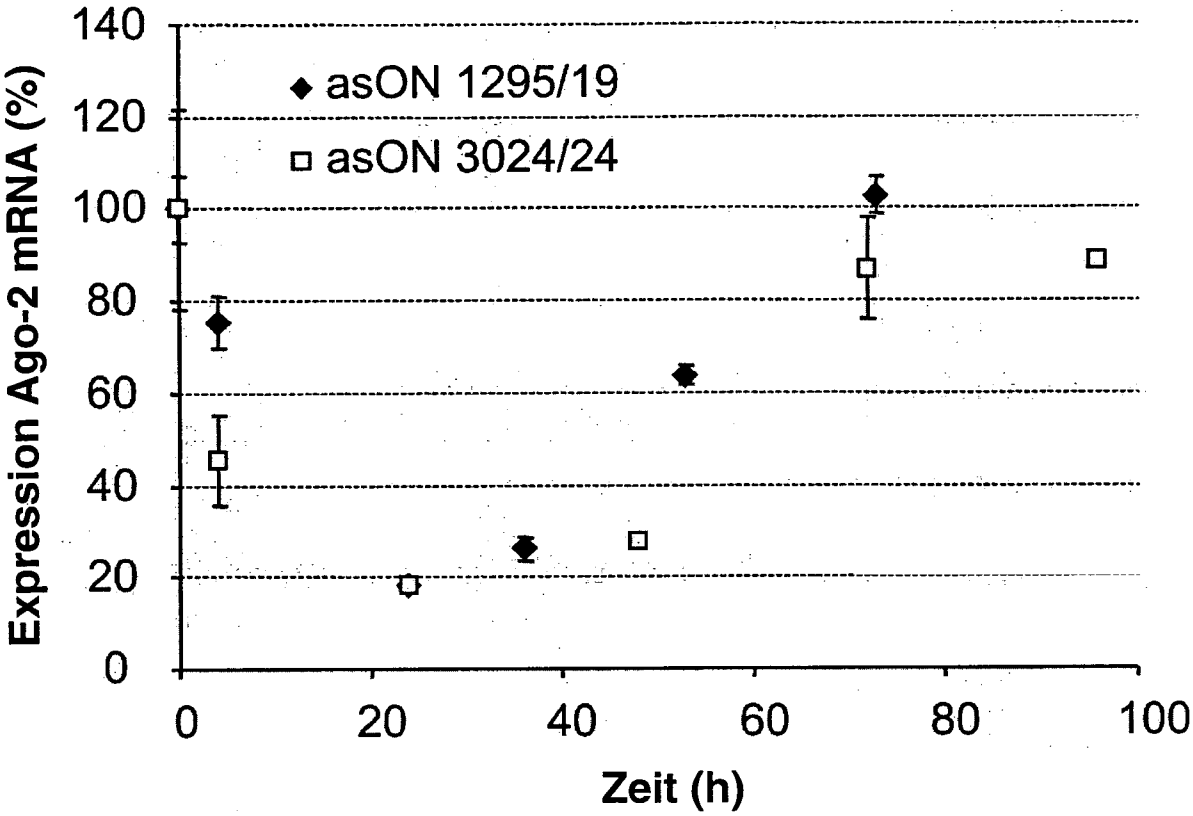
140
120
100
80
60
40
20
0
Expression Ago-2 mRNA (%)
asON 1295/19
asON 3024/24
0
20
40
60
80
100
Zeit (h)

Fig. 4

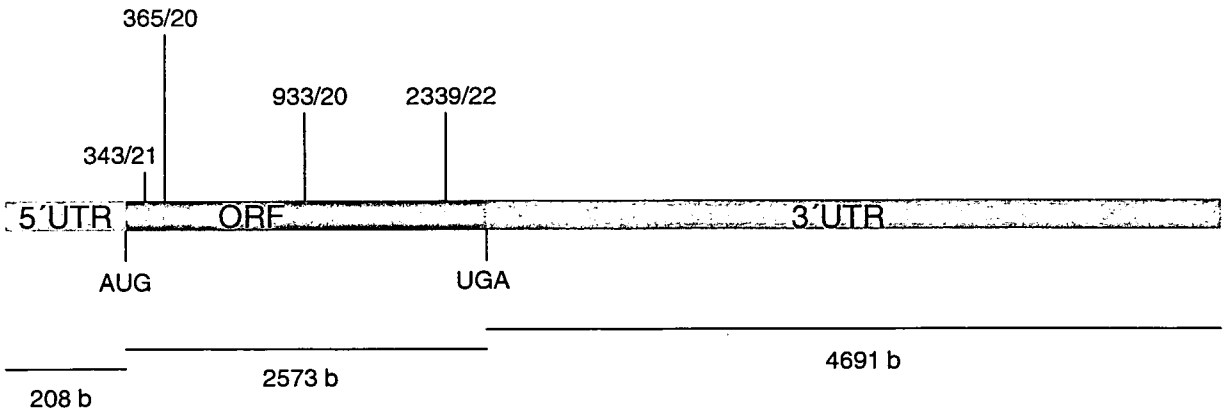
365/20
933/20
2339/22
343/21
5´UTR
ORF
3´UTR
AUG
UGA
4691 b
2573 b
208 b

Fig. 5

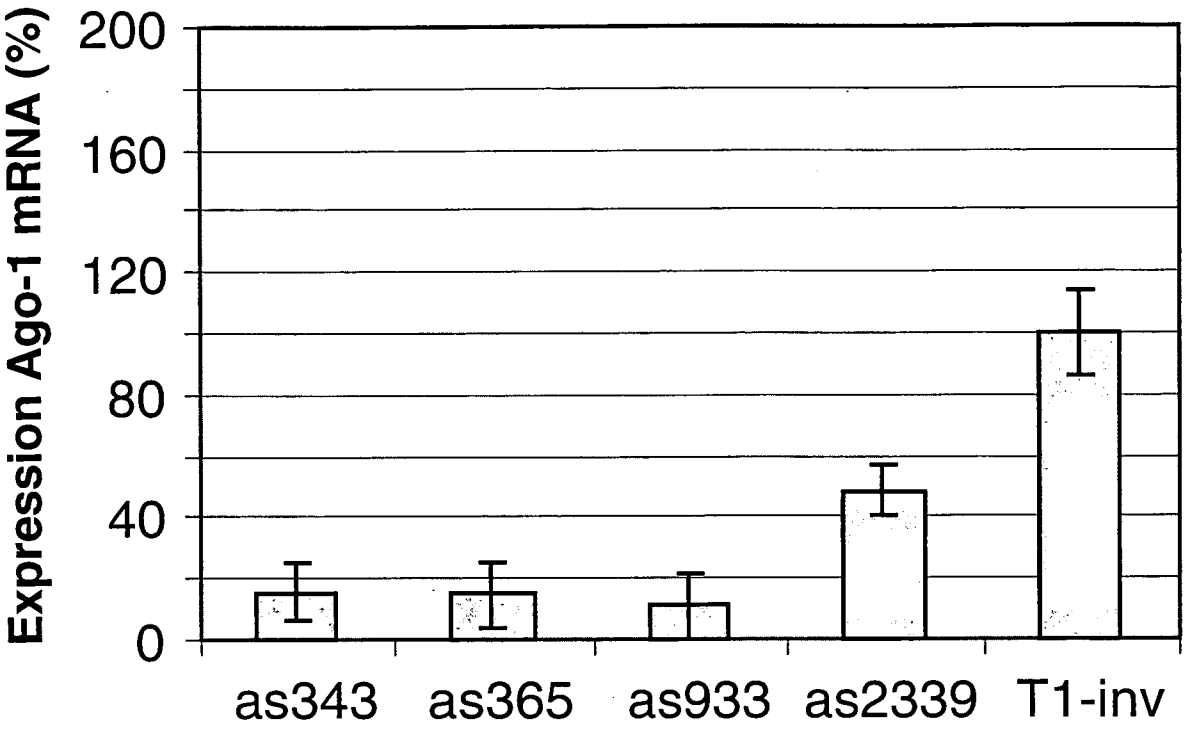
Expression Ago-1 mRNA (%)
200
160
120
80
40
0
as343
as365
as933
as2339
T1-inv

Fig. 6

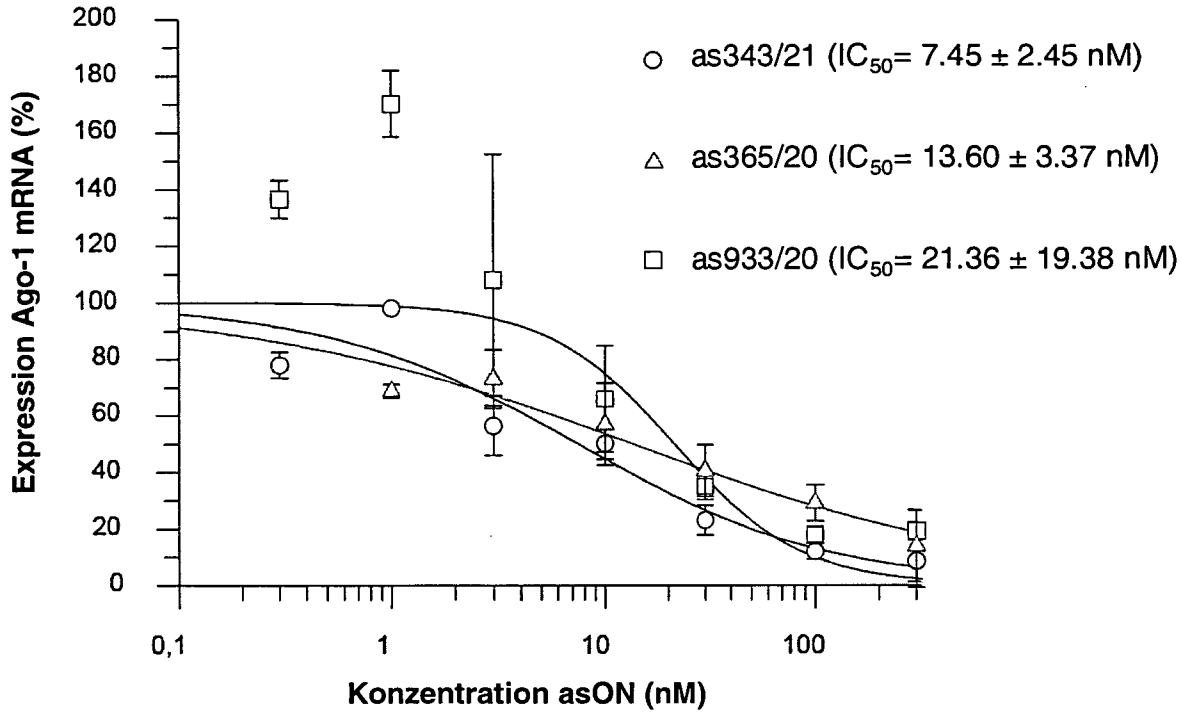
Expression Ago-1 mRNA (%)
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0,1
1
10
100
Konzentration asON (nM)
as343/21 (IC50= 7.45 ± 2.45 nM)
as365/20 (IC50= 13.60 ± 3.37 nM)
as933/20 (IC50= 21.36 ± 19.38 nM)

Fig. 7

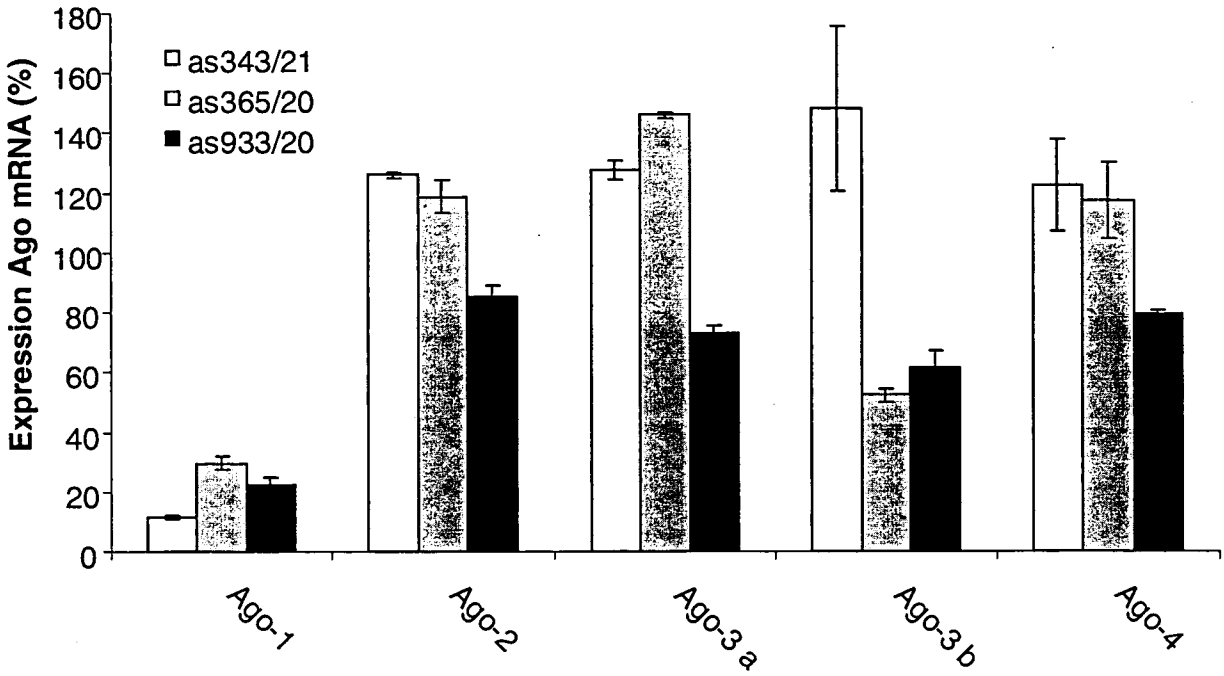
Expression Ago mRNA (%)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
as343/21
as365/20
as933/20
Ago-1
Ago-2
Ago-3a
Ago-3b
Ago-4

Fig. 8

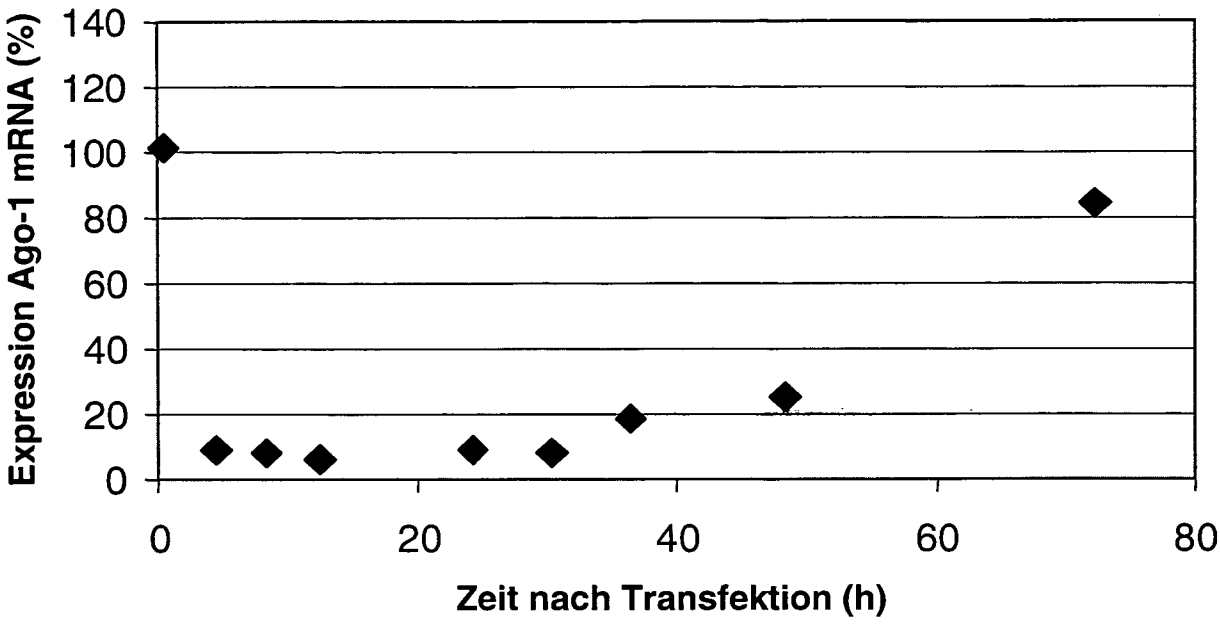
Expression Ago-1 mRNA (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
Zeit nach Transfektion (h)

Fig. 9

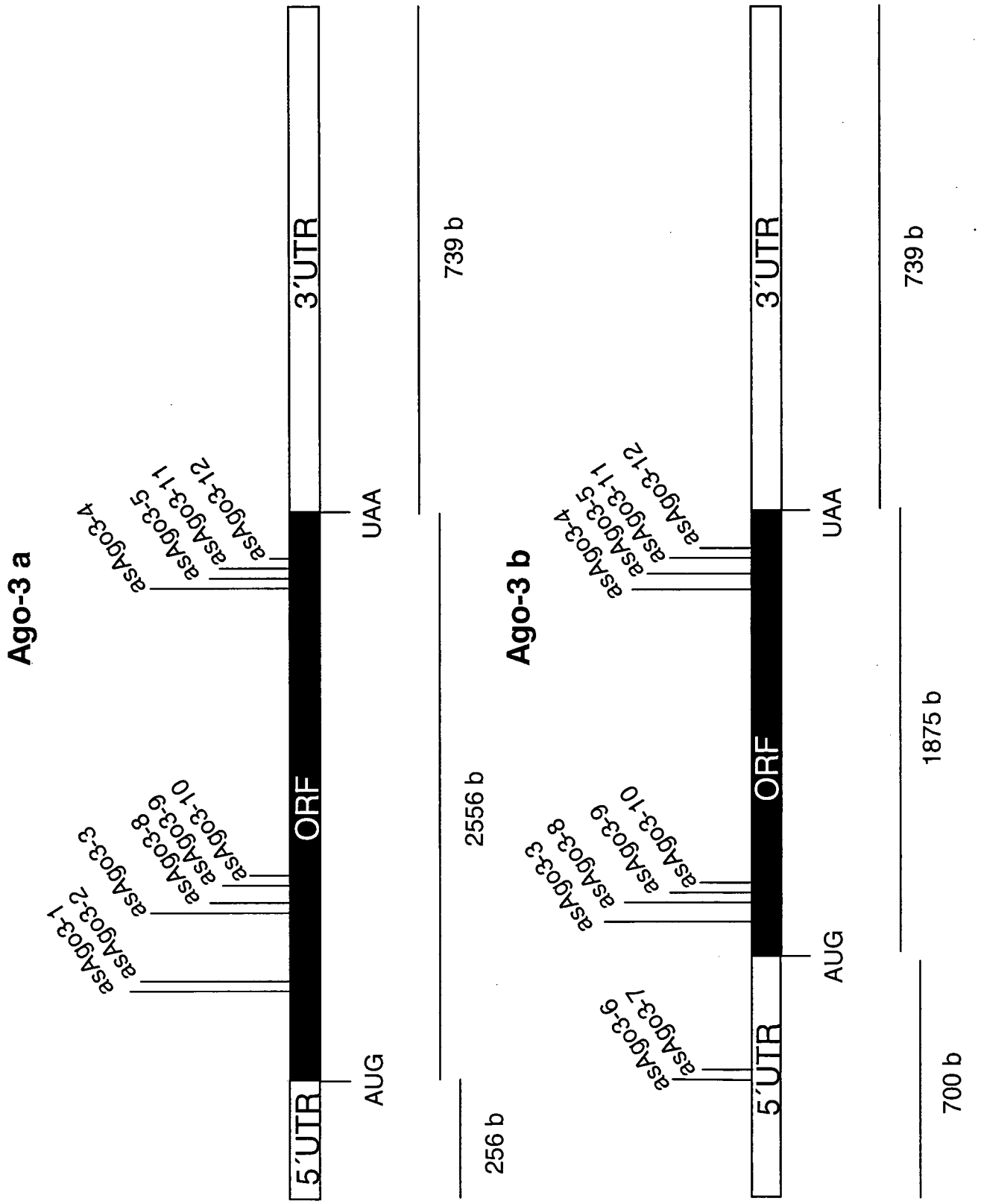
Ago-3 a
3´UTR
ORF
5´UTR
UAA
AUG
739 b
2556 b
256 b
asAgo3-4
asAgo3-5
asAgo3-11
asAgo3-12
asAgo3-10
asAgo3-9
asAgo3-8
asAgo3-3
asAgo3-2
asAgo3-1
Ago-3 b
3´UTR
ORF
5´UTR
UAA
AUG
739 b
1875 b
700 b
asAgo3-12
asAgo3-11
asAgo3-5
asAgo3-4
asAgo3-10
asAgo3-9
asAgo3-8
asAgo3-3
asAgo3-7
asAgo3-6

Fig. 10

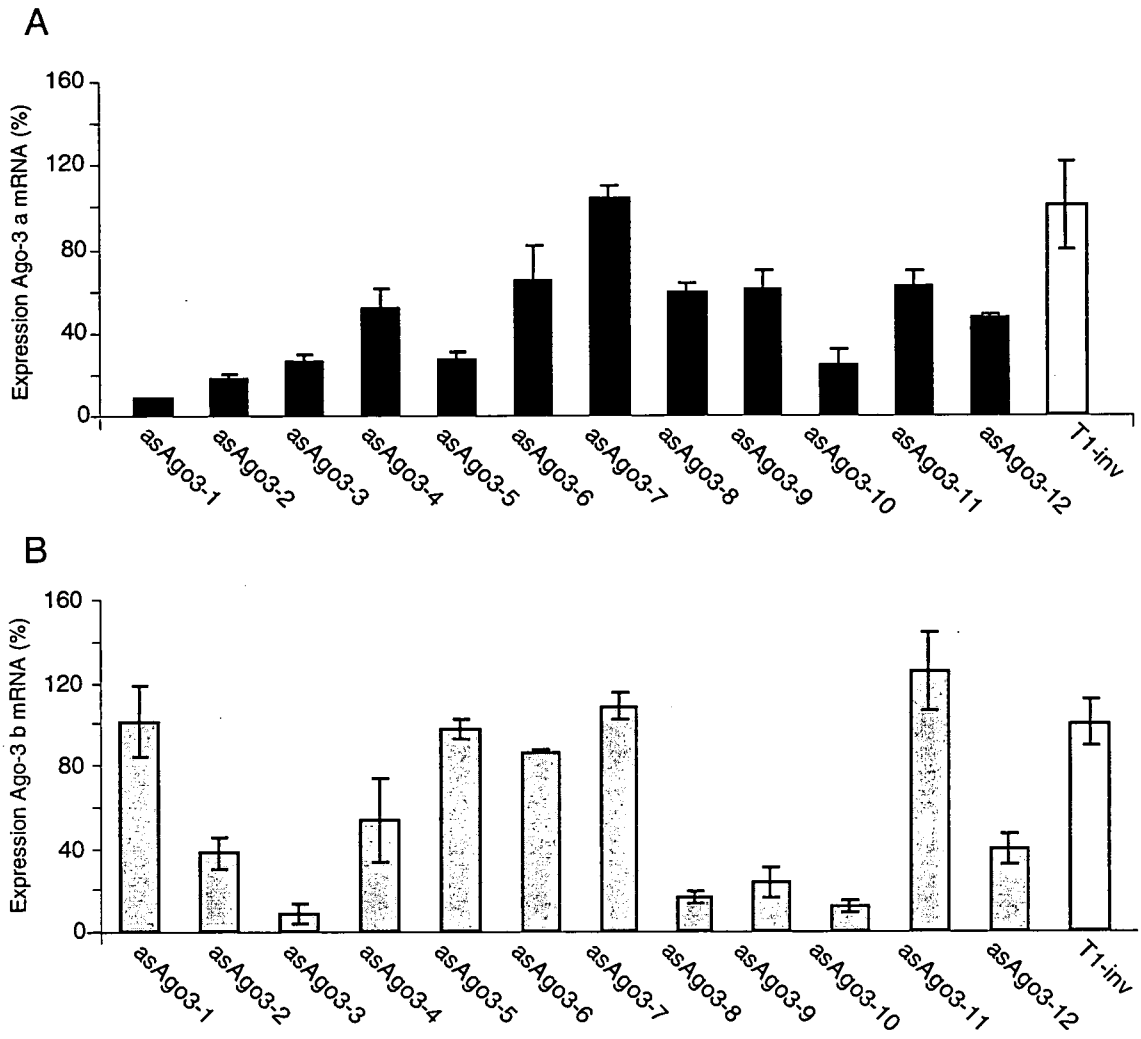
A
Expression Ago-3 a mRNA (%)
160
120
80
40
0
asAgo3-1
asAgo3-2
asAgo3-3
asAgo3-4
asAgo3-5
asAgo3-6
asAgo3-7
asAgo3-8
asAgo3-9
asAgo3-10
asAgo3-11
asAgo3-12
T1-inv
B
Expression Ago-3 b mRNA (%)
160
120
80
40
0
asAgo3-1
asAgo3-2
asAgo3-3
asAgo3-4
asAgo3-5
asAgo3-6
asAgo3-7
asAgo3-8
asAgo3-9
asAgo3-10
asAgo3-11
asAgo3-12
T1-inv

Fig. 11

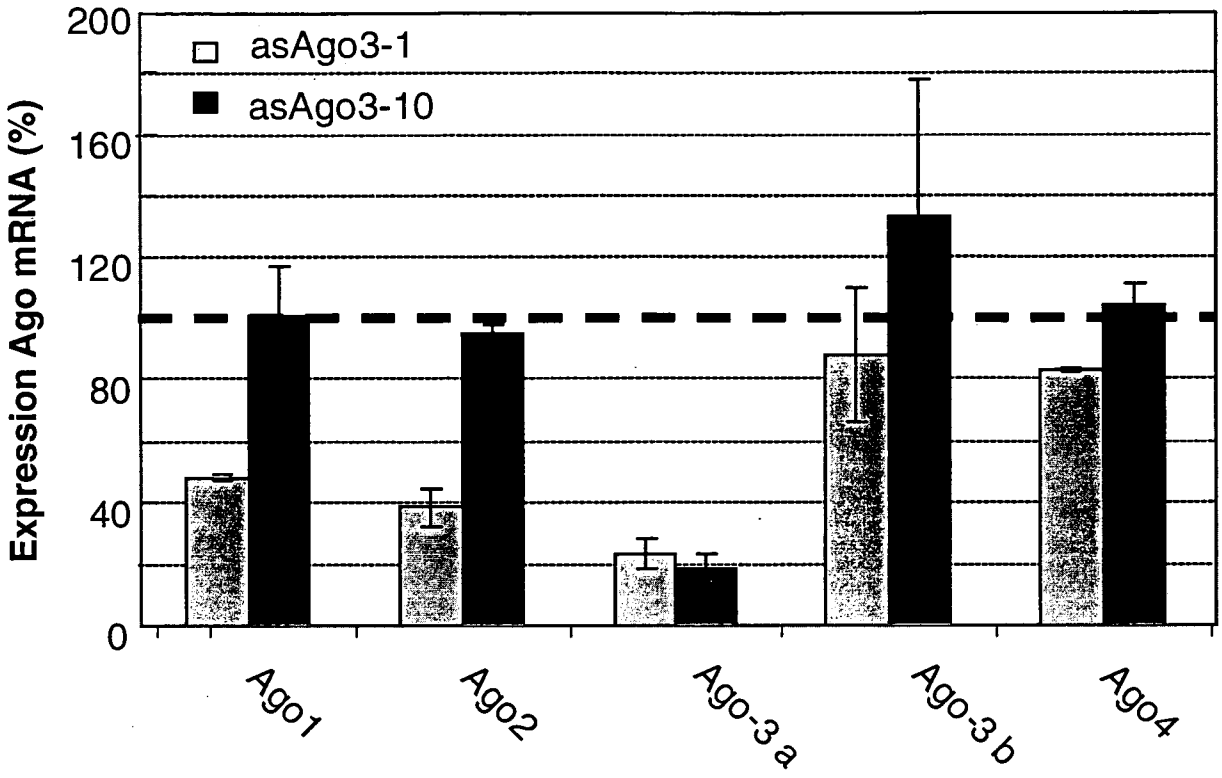
200
160
120
80
40
0
Expression Ago mRNA (%)
asAgo3-1
asAgo3-10
Ago1
Ago2
Ago-3 a
Ago-3 b
Ago4

Fig. 12

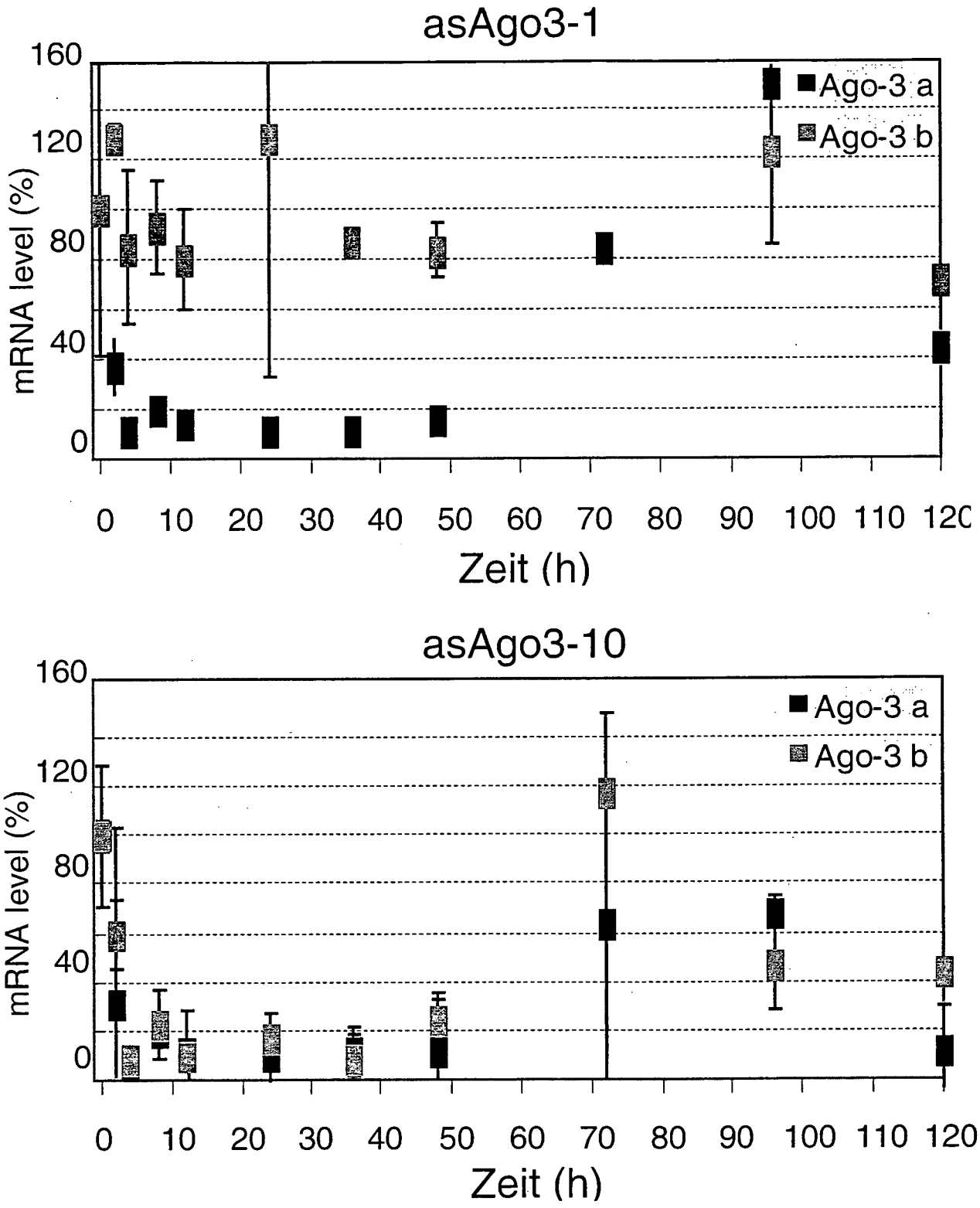
asAgo3-1
160
120
80
40
0
mRNA level (%)
Ago-3 a
Ago-3 b
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
Zeit (h)
asAgo3-10
160
120
80
40
0
mRNA level (%)
Ago-3 a
Ago-3 b
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
Zeit (h)

Fig. 13

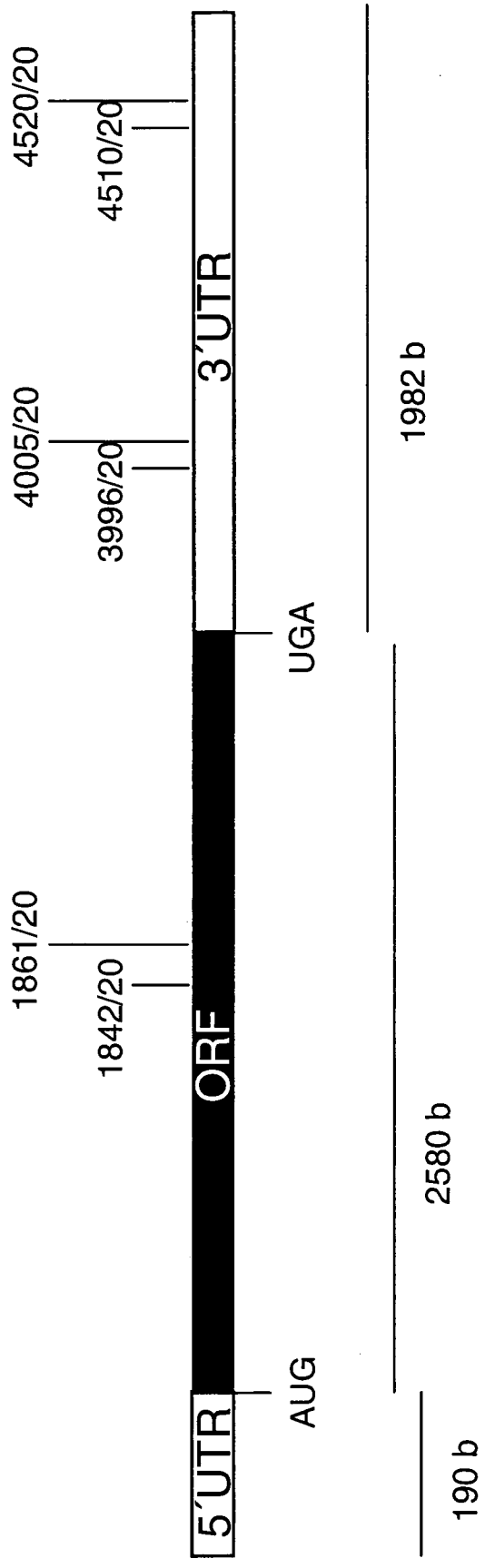
4520/20
4510/20
3´UTR
4005/20
3996/20
1982 b
UGA
1861/20
1842/20
ORF
2580 b
AUG
5´UTR
190 b

Fig. 14

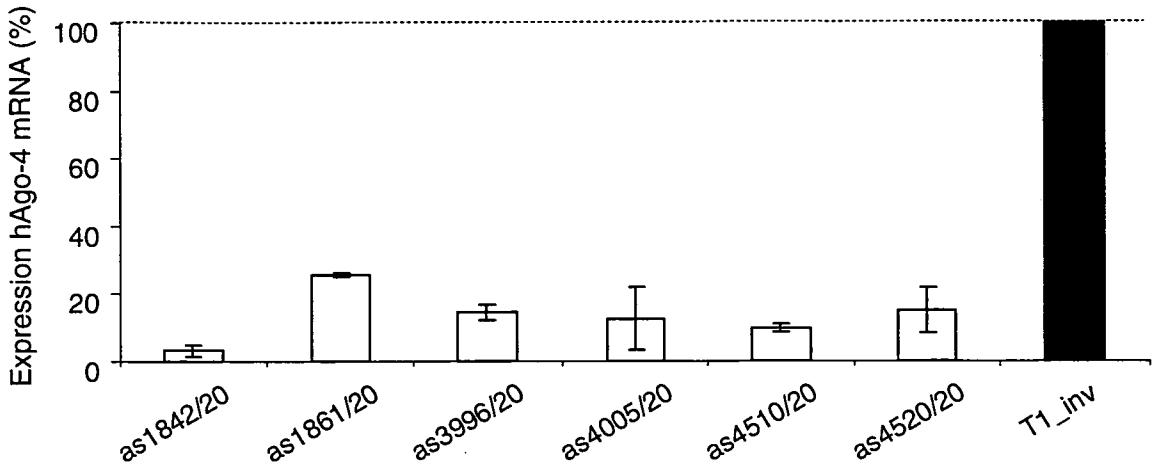
Expression hAgo-4 mRNA (%)
100
80
60
40
20
0
as1842/20
as1861/20
as3996/20
as4005/20
as4510/20
as4520/20
T1_inv

Fig. 15

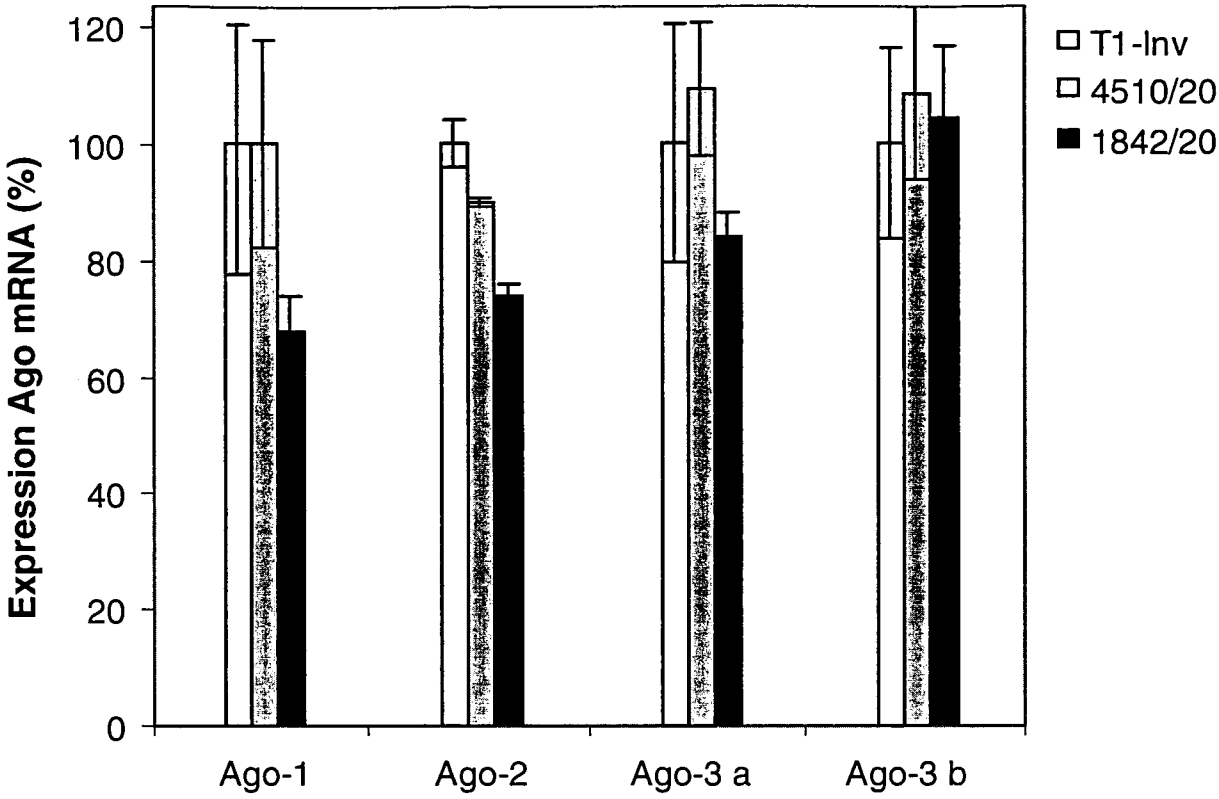
Expression Ago mRNA (%)
120
100
80
60
40
20
0
Ago-1
Ago-2
Ago-3 a
Ago-3 b
T1-Inv
4510/20
1842/20

Fig. 16

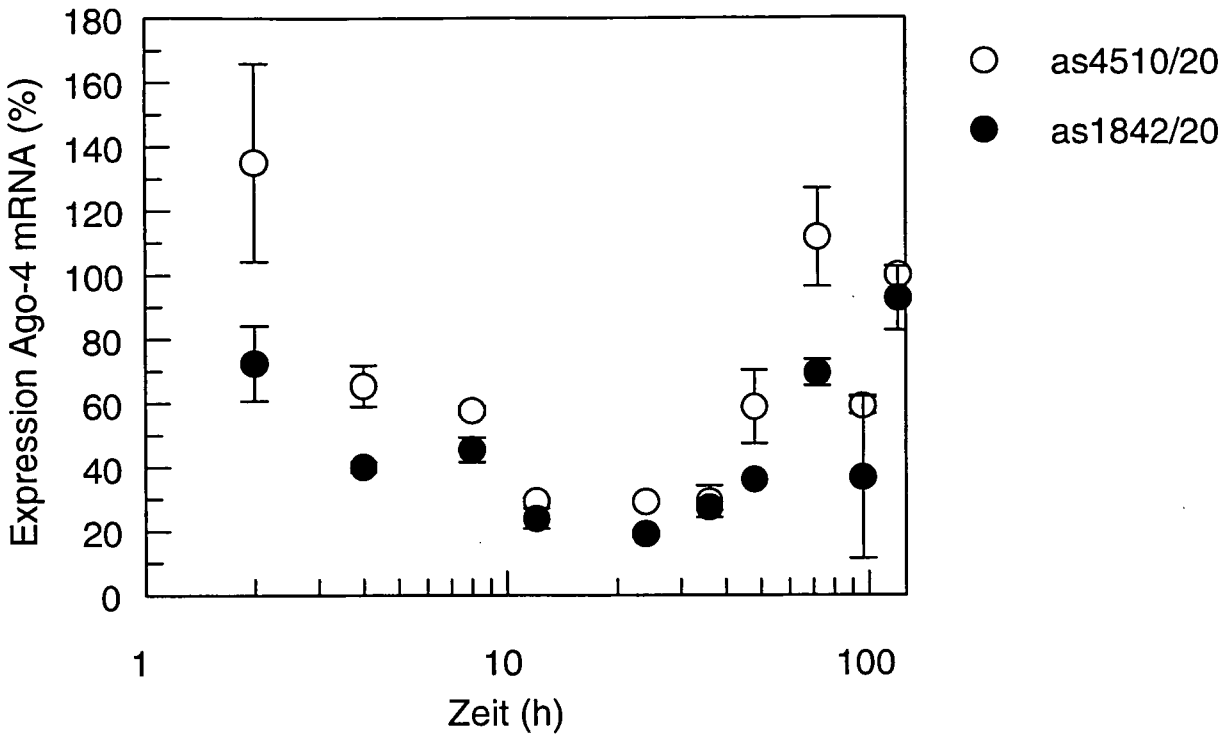
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Expression Ago-4 mRNA (%)
1
10
100
Zeit (h)
as4510/20
as1842/20

Fig. 17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/003067

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/11 C12N15/113

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)
C12N

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE, EMBL, INSPEC, CHEM ABS Data, SCISEARCH, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL [Online] 8 November 2002 (2002-11-08), "cs100c09.x1 Human Retinal pigment epithelium/choroid cDNA (Un-normalized, unamplified): cs Homo sapiens cDNA clone cs100c09 3', mRNA sequence." XP002592297 retrieved from EBI accession no. EMBL:CA389557 Database accession no. CA389557 the whole document -----	1,3,14, 17,18
Y	WO 2005/001031 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS INC [US]; WARD DONNA T [US]; WATT ANDREW T [US];) 6 January 2005 (2005-01-06) claims 22,23,45-58; examples 15-18; tables 1,2 -----	1-4, 14-25
	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family 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	Date of mailing of the international search report
16 Juli 2010	08/11/2010

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Steffen, Pierre

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/003067

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VICKERS T A ET AL: "Reduced levels of Ago2 expression result in increased siRNA competition in mammalian cells" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB LNKD- DOI:10.1093/NAR/GKM663, vol. 35, no. 19, 28 September 2007 (2007-09-28), pages 6598-6610, XP002480333 ISSN: 0305-1048 [retrieved on 2007-09-28] the whole document	1-4, 14-25
Y	MEISTER G ET AL: "Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs" MOLECULAR CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US LNKD- DOI:10.1016/J.MOLCEL.2004.07.007, vol. 15, no. 2, 23 July 2004 (2004-07-23), pages 185-197, XP003016606 ISSN: 1097-2765 the whole document	1-4, 14-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2010/003067

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   a. (means)

   ☒ on paper

   ☒ in electronic form

   b. (time)

   ☒ in the international application as filed

   ☒ together with the international application in electronic form

   ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2010/003067

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 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:

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 No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

See additional sheet

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

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.:

See supplemantry sheet

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International application No.
PCT/EP2010/003067

Continuation of Box III

The International Searching Authority has found that the international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims 3 and 4 (in full); claims 1, 2 and 14-25 (in part)

Oligonucleotide for specifically inhibiting the expression of an argonaute protein, various modifications thereof, vectors and nucleic acid constructs comprising said oligonucleotide, and pharmaceutical and diagnostic compositions and uses thereof, wherein the argonaute protein is argonaute 2 (Ago-2) and the oligonucleotide contains or consists of SEQ ID NOs: 1-4.

2. Claims 5, 6 (in full); claims 1, 2 and 14-25 (in part)

Oligonucleotide for specifically inhibiting the expression of an argonaute protein, various modifications thereof, vectors and nucleic acid constructs comprising said oligonucleotide, and pharmaceutical and diagnostic compositions and uses thereof, wherein the argonaute protein is argonaute 1 (Ago-1) and the oligonucleotide contains or consists of SEQ ID NOs: 14-16.

3. Claims 7-11 (in full); claims 1, 2 and 14-25 (in part)

Oligonucleotide for specifically inhibiting the expression of an argonaute protein, various modifications thereof, vectors and nucleic acid constructs comprising said oligonucleotide, and pharmaceutical and diagnostic compositions and uses thereof, wherein the argonaute protein is argonaute 3 (Ago-3) and the oligonucleotide contains or consists of SEQ ID NOs: 18-24.

4. Claims: 12, 13 (in full); claims 1, 2 and 14-25 (in part)

Oligonucleotide for specifically inhibiting the expression of an argonaute protein, various modifications thereof, vectors and nucleic acid constructs comprising said oligonucleotide, and pharmaceutical and diagnostic compositions and uses thereof, wherein the argonaute protein is argonaute 4 (Ago-4) and the oligonucleotide contains or consists of SEQ ID NOs: 30-35.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2010/003067

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005001031 A2	06-01-2005	EP 1631659 A2	08-03-2006

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2010/003067

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. C12N15/11 C12N15/113

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C12N

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

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

EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE, EMBL, INSPEC, CHEM ABS Data, SCISEARCH, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE EMBL [Online] 8. November 2002 (2002-11-08), "cs100c09.x1 Human Retinal pigment epithelium/choroid cDNA (Un-normalized, unamplified): cs Homo sapiens cDNA clone cs100c09 3', mRNA sequence." XP002592297 gefunden im EBI accession no. EMBL:CA389557 Database accession no. CA389557 das ganze Dokument -----	1,3,14, 17,18
Y	WO 2005/001031 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS INC [US]; WARD DONNA T [US]; WATT ANDREW T [US];) 6. Januar 2005 (2005-01-06) Ansprüche 22,23,45-58; Beispiele 15-18; Tabellen 1,2 -----	1-4, 14-25
	-/--	

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen [X] 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 naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
16. Juli 2010	08/11/2010

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Steffen, Pierre

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2010/003067

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	VICKERS T A ET AL: "Reduced levels of Ago2 expression result in increased siRNA competition in mammalian cells" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB LNKD- DOI:10.1093/NAR/GKM663, Bd. 35, Nr. 19, 28. September 2007 (2007-09-28), Seiten 6598-6610, XP002480333 ISSN: 0305-1048 [gefunden am 2007-09-28] das ganze Dokument	1-4, 14-25
Y	MEISTER G ET AL: "Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs" MOLECULAR CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US LNKD- DOI:10.1016/J.MOLCEL.2004.07.007, Bd. 15, Nr. 2, 23. Juli 2004 (2004-07-23), Seiten 185-197, XP003016606 ISSN: 1097-2765 das ganze Dokument	1-4, 14-25

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2010/003067

Feld Nr. I Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz(en) (Fortsetzung von Punkt 1 b) auf Blatt 1)

1. Hinsichtlich der **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz,** die in der internationalen Anmeldung offenbart wurde und für die beanspruchte Erfindung erforderlich ist, ist die internationale Recherche auf folgender Grundlage durchgeführt worden:

   a. (Form)

   [X] in Papierform

   [X] in elektronischer Form

   b. (Zeitpunkt)

   [X] in der eingereichten internationalen Anmeldung

   [X] zusammen mit der internationalen Anmeldung in elektronischer Form

   [ ] bei dieser Behörde nachträglich für die Zwecke der Recherche

   eingereicht wurde.

2. [ ] Wurden mehr als eine Version oder Kopie eines Sequenzprotokolls und/oder einer dazugehörigen Tabelle eingereicht, so sind zusätzlich die erforderlichen Erklärungen, dass die Information in den nachgereichen oder zusätzlichen Kopien mit der Information in der Anmeldung in der eingereichten Fassung übereinstimmt bzw. nicht über sie hinausgeht, vorgelegt worden.

3. Zusätzliche Bemerkungen:

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2010/003067

Feld Nr. II 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 internationaler Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche diese Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

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 Nr. III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Diese Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren 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 zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung solcher Gebühren aufgefordert.

3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren 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 Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Dieser internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfasst:
siehe Beiblatt

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Der Anmelder hat die zusätzlichen Recherchengebühren unter Widerspruch entrichtet und die gegebenenfalls erforderliche Widerspruchsgebühr gezahlt.

☐ Die zusätzlichen Recherchengebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt, jedoch wurde die entsprechende Widerspruchsgebühr nicht innerhalb der in der Aufforderung angegebenen Frist entrichtet.

☐ Die Zahlung der zusätzlichen Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN **PCT/ISA/** 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 3, 4(vollständig); 1, 2, 14-25(teilweise)

   Oligonukleotid für die spezifische Hemmung der Expression eines Argonaute-Proteins, diverse Modifikationen davon, Vektoren und Nukleinsäurekonstrukte umfassend besagtes Oligonukleotid, sowie pharmazeutische und diagnostische Zusammensetzungen und Anwendungen davon, wobei das Argonaute Protein Argonaute-2 (Ago-2) ist, und das Oligonukleotid die SEQ ID NO's: 1-4 umfasst oder daraus besteht.

   ---

2. Ansprüche: 5, 6(vollständig); 1, 2, 14-25(teilweise)

   Oligonukleotid für die spezifische Hemmung der Expression eines Argonaute-Proteins, diverse Modifikationen davon, Vektoren und Nukleinsäurekonstrukte umfassend besagtes Oligonukleotid, sowie pharmazeutische und diagnostische Zusammensetzungen und Anwendungen davon, wobei das Argonaute Protein Argonaute-1 (Ago-1) ist, und das Oligonukleotid die SEQ ID NO's: 14-16 umfasst oder daraus besteht.

   ---

3. Ansprüche: 7-11(vollständig); 1, 2, 14-25(teilweise)

   Oligonukleotid für die spezifische Hemmung der Expression eines Argonaute-Proteins, diverse Modifikationen davon, Vektoren und Nukleinsäurekonstrukte umfassend besagtes Oligonukleotid, sowie pharmazeutische und diagnostische Zusammensetzungen und Anwendungen davon, wobei das Argonaute Protein Argonaute-3 (Ago-3) ist, und das Oligonukleotid die SEQ ID NO's: 18-24 umfasst oder daraus besteht.

   ---

4. Ansprüche: 12, 13(vollständig); 1, 2, 14-25(teilweise)

   Oligonukleotid für die spezifische Hemmung der Expression eines Argonaute-Proteins, diverse Modifikationen davon, Vektoren und Nukleinsäurekonstrukte umfassend besagtes Oligonukleotid, sowie pharmazeutische und diagnostische Zusammensetzungen und Anwendungen davon, wobei das Argonaute Protein Argonaute-4 (Ago-4) ist, und das Oligonukleotid die SEQ ID NO's: 30-35 umfasst oder daraus besteht.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2010/003067

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2005001031 A2	06-01-2005	EP 1631659 A2	08-03-2006