



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 18 260 T2** 2005.07.14

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 041 144 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 18 260.3**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 106 453.6**

(96) Europäischer Anmeldetag: **29.03.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **04.10.2000**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **23.06.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.07.2005**

(51) Int Cl.⁷: **C12N 15/10**
C12Q 1/68

(73) Patentinhaber:

**Blind, Michael, 81245 München, DE; Famulok,
Michael, 53175 Bonn, DE; Kolanus, Waldemar,
81245 München, DE**

(74) Vertreter:

Bohmann & Loosen, 80331 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, CH, DE, DK, FR, GB, IE, IT, LI, NL

(72) Erfinder:

**Blind, Michael, 81245 München, DE; Famulok,
Michael, 81245 München, DE; Kolanus, Waldemar,
81245 München, DE**

(54) Bezeichnung: **Methoden zur Identifizierung und Validierung von funktionellen Zielen mittels Intrameren oder in vivo Selektion**

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

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Identifizieren eines Intramers, das in der Lage ist, an ein funktionales intrazelluläres Zielmolekül zu binden und dessen Funktion zu modifizieren, und die intrazelluläre Anwendung von funktionalen Nukleinsäuren, die als „Intramere“ bezeichnet werden, die die biologische Funktion einer intrazellulären Komponente beeinflussen (z. B. ihre Funktion innerhalb des Kontextes einer lebenden Zelle inhibieren, indem die Komponente spezifisch komplexiert wird). Es konnte gezeigt werden, dass a) Intramere innerhalb von Zellen in einen funktionellen Kontext plaziert werden können, unabhängig davon, ob das Zielmolekül natürlicherweise Nukleinsäuren bindet oder nicht; b) Intramere Wirkungen auf intrazelluläre Stellen vermitteln können, an denen eine Nukleinsäure normalerweise nicht gefunden wird. Dieses Verfahren ist nützlich, um die Aufklärung der biologischen Rolle einer großen Vielzahl von intrazellulären Komponenten zu ermöglichen. Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin Verfahren für die Expression von randomisierten Nukleinsäurebibliotheken innerhalb von Zellen, um funktionale Intramere zu identifizieren, die den Phänotyp der Zelle ändern, in der sie exprimiert werden. Dieses Verfahren ist, z. B., dafür nützlich, ein intrazelluläres Zielmolekül als für einen bestimmten zellulären Phänotyp funktional verantwortlich oder daran beteiligt zu identifizieren, ohne dass vorher die biologische Funktion der Komponente bekannt ist. Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung eine T7-RNA-Expressionskassette, die einen T7-Promotor umfasst.

[0002] In den vergangenen Jahren ist ein erheblicher Fortschritt bei der Identifizierung des vollständigen Satzes der genetischen Information verschiedener Organismen erzielt worden. Das Genom von Prokaryonten, wie beispielsweise *E. coli*, oder Eukaryonten, wie beispielsweise *S. cerevisiae* (Goffeau et al., *Science* 274 (1996), 546–567) und *C. elegans* (The *C. Elegans* Sequencing Consortium, *Science* 282 (1998); 2012–2018) ist vollständig sequenziert worden. Man hat geschätzt, dass das vollständige humane Genom in drei bis fünf Jahren bekannt sein wird. Die Herausforderung, der man sich nach diesen Erfolgen gegenüberstellt, besteht darin, ein jedes Gen mit einer Funktion zu versehen. Zum Beispiel besteht ein wesentliches Ziel darin, jene Genprodukte als potentielle Wirkstoffzielmoleküle zu identifizieren, die Schlüsselrollen in dem komplexen Netzwerk aus Proteinwechselwirkungen spielen, die letztendlich zu Erkrankungen führen (siehe z. B. Friedrich, *Nat. Biotechnol.* 14 (1996), 1234–7). Um diese Schlüssel-moleküle unter den 100 000 humanen Genen zu identifizieren, wird die Anzahl möglicher Kandidatenmoleküle definiert, indem die Proteinzusammensetzung verschiedener Entwicklungszustände oder Erkrankungszustände einer Zelle durch differenzielle Genexpression verglichen wird. Der tatsächliche Status der Proteinzusammensetzung einer Zelle kann erhalten werden, indem die mRNA einer Zelle analysiert wird (für Übersichten der verschiedenen Verfahren siehe Wan et al., *Nat. Biotechnol.* 14 (1996), 1685–1691). Dieses Verfahren liefert jedoch nur ein indirektes und nicht sehr genaues Maß für den gegenwärtigen Proteomstatus der Zelle, da die mRNA schon lange abgebaut sein kann, während das Protein noch vorhanden ist, oder eine große Menge an mRNA transkribiert worden ist, aber aus irgendwelchen Gründen nicht translatiert werden kann. Es ist auch nicht möglich, posttranslationale Modifikationen der exprimierten Proteine abzudecken. Ein alternativer Weg, um den Proteomstatus einer Zelle mittels „proteomics“ abzudecken, besteht in der 2D-Gelelektrophorese. Unter Verwendung dieses Verfahrens kann man versuchen, die Zusammensetzung aller exprimierten Proteine in einer Zelle zu einem gegebenen Zeitpunkt in der Form von getrennten Spots auf einem Gel abzudecken, wobei jeder Spot einem einzelnen Protein entspricht. Indem verschiedene Gele verglichen werden, können verschiedene Proteine oder Mengen an Proteinen identifiziert werden. Dieses Verfahren erlaubt jedoch derzeit bestenfalls, etwa 20 % der exprimierten Proteine in einem höheren Eukaryonten zu identifizieren. Der Nachweis von Proteinen mit einer geringen Kopienzahl ist dabei problematisch. Zusätzlich erlauben beide Verfahren lediglich, die Anwesenheit oder Abwesenheit von Genprodukten in einem speziellen Entwicklungszustand oder Erkrankungszustand zu betrachten. Sie erlauben nicht, festzustellen, ob oder ob nicht die identifizierten Unterschiede in dem Expressionsmuster den zellulären Status verursachen oder nur eine Konsequenz daraus sind.

[0003] Die direkte Analyse der Funktion, die ein bestimmter Proteinkomplex oder eine seiner Untereinheiten oder Domänen in einem zellulären Prozess aufweist, kann mittels des genetischen „Knock-out“ (homologe Rekombination, Antisense-Technologien), oder mittels Überexpression oder Mutation des Proteins erreicht werden. Dies führt jedoch immer zu einer Änderung der genetischen Information eines Organismus, was die Interpretation der Ergebnisse schwierig macht. Z. B. erlaubt der Knock-out eines Gens nicht, Rückschlüsse zu ziehen, welcher Teil oder welche Domäne eines Proteins für seine Funktion wichtig ist. Zusätzlich ist die Expression von anderen Genen in den meisten Fällen beeinflusst (für eine Übersicht siehe: Proteom Research: New Functions in Functional Genomics, Springer-Verlag (1997), 1–30).

[0004] Es besteht somit ein großer Bedarf für spezifische intrazelluläre Inhibitoren oder Modulatoren, die in einem bestimmten Zeitfenster angewandt werden können und die die Analyse eines bestimmten unveränderten Proteins innerhalb seines natürlichen Expressionsstatus erlauben [Spencer et al., *Science* 262 (1993),

1019–1024; Huang & Schreiber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997), 13396–13401]. Die meisten der derzeit bekannten Inhibitoren oder Modulatoren basieren auf membrangängigen kleinen organischen Molekülen, die oft eine beschränkte Spezifität aufweisen und nur für bestimmte Proteine verfügbar sind. Diese Beschränkung kann überwunden werden durch intrazelluläre Antikörper („Intrabodies“; siehe Richardson, Tibtech 13 (1995), 306–10) oder Peptidaptamere (siehe Colas et al., Nature 380 (1996) 548–550). Das Problem mit intrazellulären Antikörpern besteht jedoch darin, dass, beispielsweise, der extrazelluläre Antikörper auf das reduktive intrazelluläre Kompartiment angepasst werden muss. Verfahren, wie beispielsweise Dimerisierung von schwerer und leichter Kette und die Stabilisierung durch Disulfidbrücken oder Glykosylierung erfolgen intrazellulär mit einer sehr geringen Effizienz oder gar nicht und müssen durch kostenintensive Konstruktion der Polypeptidketten ausgeglichen werden.

[0005] Funktionale Nukleinsäuren, die innerhalb des Kontextes einer lebenden Zelle funktionieren, können dabei helfen, diesen Bedarf für spezifische intrazelluläre Inhibitoren oder Modulatoren zu befriedigen, die in einem bestimmten Zeitfenster angewandt werden können und die die Analyse eines bestimmten nicht veränderten Proteins innerhalb seines natürlichen Expressionsstatus erlauben.

[0006] Funktionale Nukleinsäuren sind eine einzelsträngige DNA (ssDNA) oder RNA (ssRNA) oder chemisch modifizierte Nukleinsäuren (ssNAMod), doppelsträngige DNA (dsDNA) oder RNA (dsRNA) oder chemisch modifizierte Formen davon (dsNAMod), die in der Lage sind, ein intrazelluläres Zielmolekül zu binden, zu modulieren oder katalytisch zu modifizieren, wodurch seine biologische Funktion beeinflusst wird. Eine funktionale Nukleinsäure kann beispielsweise durch in vitro-Selektion oder „SELEX“ (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment; siehe Tuerk und Gold, Science 249 (1990), 505–510; Ellington und Szostak, Nature 346 (1990), 818–822) oder durch Ribozyme, die allosterisch aktiviert werden können (Aptazyme; siehe Robertson und Ellington, Nat. Biotechnol. 17, (1999), 62–66) identifiziert werden. Es ist wohl bekannt, dass funktionale Nukleinsäuren, beispielsweise Aptamere, die durch in vitro-Selektion erzeugt wurden, an eine große Vielzahl von Liganden binden können, die von kleinen Molekülen und biologischen Cofaktoren bis hin zu natürlichen und synthetischen Polymeren reichen, einschließlich Proteinen, Polysacchariden, Glykoproteinen, Hormonen, Rezeptoren und Zelloberflächen. Im Allgemeinen können Nukleinsäuren in Zellen eingeführt werden durch Verfahren, die den Fachleuten üblicherweise bekannt sind, wie beispielsweise Lipofektion, Elektroporation oder mittels Vektoren, die hohe Transkriptionsraten erlauben, z. B. Plasmide mit RNA-Polymerase III-Promotoren, T7-RNA-Polymerase/Vakzinia-Virus-basierten Systemen oder Replikation, z. B. Semliki-Forst-Virus.

[0007] Beispiele für kleine, intrazellulär verabreichte Nukleinsäuren sind bisher auf Antisense-Nukleinsäuren, katalytische Antisense-Nukleinsäuren, wie beispielsweise Hammerhead-Ribozyme (Birikh et al., Eur. J. Biochem. 245 (1997), 1–16; Bramlage et al., Trends Biotechnol. 16 (1998), 434–438) und Nukleinsäureliganden beschränkt, die mittels eines Aptamermechanismus an bestimmte Zielmoleküle binden, die auf natürlicherweise Nukleinsäure bindende Proteine beschränkt sind, wie beispielsweise das Rev-Protein von HIV-1 (Good et al., Gene Ther. 4 (1997), 45–54; Symensma et al., J. Virol. 70 (1996), 179–187), RNA-Polymerase II von Hefe (Thomas et al., J. Biol. Chem. 272 (1997), 27980–27986), das SelB-Protein von E. coli (Klug et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997), 6676–6681). Diese Beispiele erfüllen jedoch nicht die Forderung nach spezifischen intrazellulären Inhibitoren oder Modulatoren, die routinemäßig in bestimmten Zeitfenstern angewendet werden können und die die Analyse einer bestimmten unveränderten zellulären Komponente erlauben, wie beispielsweise ein Protein innerhalb seines natürlichen Expressionsstatus. Bisher ist nur festgestellt worden, dass in vitro selektierte Aptamere, die an ein natürlicherweise Nukleinsäure bindendes Protein binden und üblicherweise eng verwandt sind mit entsprechenden natürlichen Nukleinsäuresequenzen, dies noch innerhalb der Zelle machen. Es ist noch nicht festgestellt worden, dass, beispielsweise, ein Aptamer allgemein verwendet werden kann, um die biologische Funktion von intrazellulären Zielmolekülen zu beeinflussen, einschließlich, beispielsweise, Hormone, biologischer Cofaktoren, nicht-Nukleinsäure bindender Proteine, Biopolymere etc.

[0008] Die internationale Patentanmeldung PCT/DK96/00231 beschreibt ein Verfahren zum Identifizieren von biologisch aktiven Peptiden und Nukleinsäuren. Dieses Dokument offenbart die grundsätzlichen Schritte, wie beispielsweise das Herstellen eines Pools von geeigneten Vektoren, die jeweils vollständig oder teilweise zufällige DNA-Sequenzen enthalten, die wirksame Transduktion der Vektoren in eine Anzahl von identischen eukaryontischen Zellen, das Screenen der transduzierten Zellen, um festzustellen, ob eine von ihnen ein geändertes bestimmtes phänotypisches Merkmal aufweist, das Auswählen und Klonieren der veränderten Zellen, das Isolieren und Sequenzieren der Vektor-DNA in den phänotypisch veränderten Zellen und das Ableiten der RNA-Sequenz aus der DNA-Sequenz. Die besagten Vektoren werden jedoch nicht weiter hinsichtlich der verwendeten Expressionskassetten charakterisiert.

[0009] Die der vorliegenden Erfindung somit zugrundeliegende technische Aufgabe besteht darin, Mittel bereitzustellen zum Identifizieren und Validieren von intrazellulären Zielmolekülen, einschließlich Zielmolekülen, die natürlicherweise nicht an Nukleinsäuren binden, und zum Modifizierung der Funktion des Zielmoleküls.

[0010] Die Lösung dieser technischen Aufgabe wird erreicht, indem die in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen bereitgestellt werden.

[0011] Die vorliegende Erfindung basiert auf der einzigartigen Einsicht, dass Nukleinsäureliganden gegen praktisch jegliche zelluläre Komponente gerichtet und leicht intrazellulär verwendet werden können, wobei

- a) sie noch ihr Zielmolekül in der intrazellulären Umgebung erkennen;
- b) sie dies selbst mit Zielmolekülen machen können, die von Natur aus keine Nukleinsäure binden;
- c) sie ihr Zielmolekül in subzellulären Kompartimenten, wie beispielsweise der zytoplasmatischen Phase der Zellmembran, lokalisieren können, wo Nukleinsäuren normalerweise nicht gefunden werden;
- d) sie die biologische Funktion des Zielmoleküls modulieren können, was Rückschlüsse hinsichtlich dessen biologischer Rolle erlaubt; und
- e) sie den Phänotyp der Zelle ändern können.

[0012] Dies erlaubt die allgemeine Anwendung von intrazellulären funktionalen Nukleinsäuren zum Validieren der Funktion von intrazellulären Zielmolekülen, insbesondere für die Auswahl oder Validierung von neuen Wirkstoff-Zielmolekülen. Sofern erwünscht, kann die funktionale Nukleinsäure innerhalb einer Expressionskassette oder eines anderen Sequenzkontextes plaziert werden, der nützlich sein kann, um

- a) die Stabilität der funktionalen Nukleinsäure innerhalb des zellulären Kompartiments zu erhöhen oder Signale bereitzustellen, z. B. für die richtige Termination einer funktionalen RNA-Sequenz, die unter der Kontrolle von RNA-Polymerasen exprimiert wird; und
- b) zusätzliche Sequenzinformation bereitzustellen, die für die richtige Lokalisierung der funktionalen Nukleinsäure erforderlich ist, beispielsweise, um die Nukleinsäure von dem Nukleus in das Zytoplasma zu überführen.

[0013] Nachdem sie einmal in die Zelle eingebracht sind, werden diese Nukleinsäuren ihre biologischen Wirkungen entfalten, die studiert werden können. Das Verfahren könnte somit einen erheblichen Beitrag auf dem Gebiet des „functional Genomics“ leisten.

[0014] Entsprechend betrifft in einem ersten Aspekt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Identifizieren eines Intramers, das in der Lage ist, ein funktionales intrazelluläres Zielmolekül zu binden und dessen Funktion zu modifizieren, welches umfasst:

- a) Herstellen einer Kandidatenmischung aus Nukleinsäuren;
- b) Kontaktieren der Kandidatenmischung aus Nukleinsäuren mit dem intrazellulären Zielmolekül oder einem Teil davon;
- c) Auswählen und Isolieren von Nukleinsäuren mit einer verglichen mit der Kandidatenmischung erhöhten Affinität zu dem Zielmolekül;
- d) reverses Transkribieren, sofern die Kandidatenmischung RNAs umfasst und Amplifizieren der in Schritt c) erhaltenen Nukleinsäuren;
- e) optional Wiederholen der Schritte b) bis d);
- f) Isolieren und Sequenzieren der Klone (Intramere), die in Schritt e) erhalten werden; und
- g) Testen, ob das Expressionsprodukt des Inserts des in Schritt f) erhaltenen Klons an das intrazelluläre Zielmolekül in vivo bindet und dessen Funktion beeinflusst, wobei eine T7-RNA-Expressionskassette als ein Zytoplasma-Expressionssystem verwendet wird, das einen T7-Promotor, eine stabilisierende 5'-Stamm-Schleife und einen 3'-Terminator T ϕ umfasst, wobei die Sequenz der T7-RNA-Expressionskassette ohne Insert wie folgt ist:

5'-GTTAAC-GCATGCTAATACGACTCACTATAG
GGAGACCACAACGGTTTCCCGGGCGCAAGTTACTAGT-TGGCCA-
AGATCT-TAATTAATAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGG
TCTTGAGGGGTTTTTGTCTGTCGAC-GCGGCCGC-3'

wobei das Insert zwischen der 5'-Stamm-Schleife und dem Terminator T ϕ mittels der XmaI- und PaeI-Restriktionsstellen eingeführt ist.

[0015] Bevorzugterweise wird Schritt g) ausgeführt, indem ein zytoplasmatisches Expressionssystem verwendet wird.

[0016] In einer bevorzugteren Ausführungsform umfasst das Verfahren der vorliegenden Erfindung weiterhin h) Kartieren der Bindungsstelle des Aptamers auf dem Zielmolekül.

[0017] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin Verfahren für die Expression randomisierter Nukleinsäurebibliotheken innerhalb von Zellen für die Identifizierung von funktionalen Intrameren, die den Phänotyp der Zelle ändern, in der sie exprimiert werden. Auf der Grundlage der Erkenntnis des Erfinders hinsichtlich der allgemeinen Anwendbarkeit von funktionalen Nukleinsäuren, um intrazelluläre Zielmoleküle zu beeinflussen, ist es auch denkbar, Bibliotheken aus randomisierten RNA-Sequenzen innerhalb von Zellen zu exprimieren. Diese komplexen Bibliotheken aus randomisierten Nukleinsäuren enthalten funktionale Moleküle, die an zelluläre Komponenten, wie beispielsweise Enhancer oder Repressoren von Signaltransduktionswegen, binden und ihre biologische Funktion modulieren, was zu einem geänderten Phänotyp der Zelle führt. Diese Moleküle können mit geeigneten Selektionsverfahren identifiziert werden. Die Modulation umfasst nicht notwendigerweise Mechanismen, die lediglich auf einer Bindung beruhen, sondern können auch, beispielsweise, katalytische Verfahren umfassen, wie beispielsweise ribozymatische Modifikation eines intrazellulären Zielmoleküls.

[0018] Nachdem einmal ein bestimmter Phänotyp beobachtet wird, ist es möglich, das/die zellulären Zielmolekül(e), die für die phänotypische Veränderung verantwortlich sind, zu identifizieren. Dies kann durch Variationen verschiedener Technologien erfolgen, wie beispielsweise das „Drei-Hybrid-System“ (SenGupta et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93 (1996), 8496–8501) oder andere in den nachfolgenden Beispielen beschriebene Verfahren. Im Allgemeinen ist es möglich, das zelluläre Zielmolekül dadurch zu identifizieren, dass die Wechselwirkung zwischen der aktiven RNA aus der Bibliothek und dem Zielmolekül ausgenutzt wird. Dieses System ist für die targetierte Identifizierung von Schlüsselmolekülen nützlich, die an einem bestimmten Phänotyp beteiligt sind, bevorzugterweise einem Phänotyp, der mit bestimmten Erkrankungen verbunden ist. Es ist anderen, derzeit verfügbaren Verfahren überlegen, da es die Notwendigkeit vermeidet, eine große Anzahl von potentiellen Kandidaten zu screenen, die indirekt identifiziert worden sind, beispielsweise durch Proteomics, es identifiziert vielmehr die Schlüsselmoleküle in einem direkten phänotypischen Selektionsverfahren. Die identifizierten Schlüsselmoleküle sind potentielle Wirkstoffziehmoleküle; die Nukleinsäuremodulatoren sind nicht nur Zielmolekül-Validatoren, sondern auch potentielle Wirkstoff-Leads, die selbst direkt als Wirkstoffe, beispielsweise bei gentherapeutischen Ansätzen, verwendet werden könnten.

[0019] Entsprechend betrifft die vorliegende Erfindung in einem weiteren Aspekt ein Verfahren für die Identifizierung eines funktionalen intrazellulären Zielmoleküls, das mit einem besonderen Phänotyp verbunden ist und des entsprechenden Intramers, das in der Lage ist, an das Zielmolekül zu binden und dessen Funktion zu modifizieren, umfassend:

- a) Herstellen einer Kandidatenmischung aus Nukleinsäuren;
- b) Klonieren der Kandidatenmischung aus Nukleinsäuren in einen Vektor unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors, der optional einen selektierbaren Marker enthält, wobei der Vektor ein zytoplasmatisches Expressionssystem ist, das eine T7-RNA-Expressionskassette enthält, wobei die T7-RNA-Expressionskassette einen T7-Promotor, eine stabilisierende 5'-Stamm-Schleife und einen 3'-Terminator T ϕ umfasst, wobei die Sequenz der T7-RNA-Expressionskassette ohne Insert wie folgt lautet:

5'-GTTAAC-GCATGCTAATACGACTCACTATAG
GGAGACCACAACGGTTTCCCGGGCGCAAGTTACTAGT-TGGCCA-
AGATCT-TAATTAATAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGG
TCTTGAGGGGTTTTTTCGTCGAC-GCGGCCGC-3'

wobei das Insert zwischen der 5'-Stamm-Schleife und dem Terminator T ϕ mittels der XmaI- und PaeI-Restriktionsstellen eingefügt ist,

- c) Einführen des in Schritt b) erhaltenen Vektors in eine Reporter-Zelllinie, die positive oder negative phänotypische Selektion erlaubt;
- d) Auswählen von Zellen mit einem geänderten Phänotyp; und
- e) Bestimmen der Sequenz der in den Vektor von Schritt b) eingeführten Nukleinsäure (Intramer) und der Komponente, an die sie bindet.

Kurze Beschreibung der Figuren

A: Aufeinanderfolgende Kurzdarstellung der [Fig. 1](#) bis [Fig. 5](#) (für Beispiel 1)

[0020] Fig. 1: Auswahl und Charakterisierung von CD 18cyt-spezifischen RNA-Aptameren. A*, Konstruktion des synthetischen DNA-Pools und der primären 46-mer Aminosäuresequenz der kompletten zytoplasmatischen Domäne von $\beta 2$ -Integrin (CD18cyt), auf Sepharose immobilisiert und in der Selektion verwendet. B*, Sequenzen und vorhergesagte Sekundärstrukturen der einzelnen Aptamerklone D20, D28 D31 und D42. In Fettdruck gezeigte Nukleotide sind Teil der randomisierten Region. Man hat in einem Schadensselektionsexperiment gezeigt, dass die in Grauschattierung gehaltenen Aptamerregionen in den Klonen D28 und D20 die Minimalerfordernisse für das Beibehalten der CD 18cyt-bindenden Fähigkeit darstellen. Die Sequenz D42 wurde als Negativkontrolle verwendet; diese Sequenzen zeigen keine nachweisbare Bindung an CD18cyt.

[0021] Fig. 2: RNA Aptamer-Expressionssystem basierend auf Doppelinfektion mit rekombinanten Vaccinia Viren. A. Design der T7-RNA-Expressionskassette. B. Schematische Darstellung des auf Vaccinia Virus basierenden zytoplasmatischen RNA-Aptamer-Expressionssystems. C. Verlauf der Expression TR-kodierten Aptamers in vT7 koinfizierten Jurkat E6-Zellen veranschaulicht durch eine repräsentative „Dot-Blot“-Analyse für das Aptamer TR-D31 (rechtes Feld). 7 h nach Infektion werden maximale Niveaus der Aptamerexpression beobachtet. Die Quantifizierung (linkes Feld) wurde wie folgt durchgeführt: Totale zelluläre RNA wurde isoliert, auf die Blotmembran überführt und mit einem 5'-³²P-markiertem und zu der in allen TR-Konstrukten vorhandenen 3'-„Stemloop“-Struktur komplementäres Oligonukleotid hybridisiert. In vitro transkribiertes Aptamer TR-D20 wurde zum Vergleich und zur Quantifizierung in gleicher Weise behandelt. D. „Dot-Blot“-Analyse und Quantifizierung maximal exprimierter Aptamer-RNA. Jeder Punkt wurde auf einem Phosphorimager quantifiziert. Die Quantifizierung wurde wie für [Fig. 2c](#) beschrieben durchgeführt.

[0022] Fig. 3: Bestimmung der Gelmobilitäts-„Shift“ von endogenem, in Jurkat E6-Zelllysaten enthaltenem CD18, das an sein kognates Aptamer TR-D20 bindet. A. Gel-„Shift“-Experiment 1. Spur 1: Freie TR-D20-Aptamer-RNA; Spur 2: Veränderte Bande, die in Gegenwart von Jurkat E6-Zelllysate und 25 μ M unspezifischer Kompetitor-tRNA erhalten wurde; Spur 3: Mit der Negativkontrollsequenz TR-D42 wurde kein „Shift“ erhalten; Spur 4: Gleich wie Spur 2 mit 40 μ M unspezifischer Kompetitor-tRNA; Spur 6: Spezifische, überveränderte Bande, die in Gegenwart des Antikörpers MHM23, der die extrazelluläre $\beta 2$ -Domäne von LFA-1 erkennt, erhalten wurde; Spur 7: Spezifische, überveränderte Bande, die in Gegenwart des Antikörpers MEM170, der die extrazelluläre Domäne der β L-Untereinheit von LFA-1 erkennt, erhalten wurde. Das Bandenmuster dürfte Aptamer/Integrin-Komplexe von unterschiedlicher Stöchiometrie widerspiegeln. B. Gel-„Shift“-Experiment 2 mit zusätzlichen Kontrollen. Alle Gel-„Shift“-Experimente wurden in Gegenwart von 30 μ M tRNA als nicht-spezifischem Kompetitor durchgeführt. Spur 1: Freie TR-D20-Aptamer-RNA; Spur 2: Veränderte Bande, die in Gegenwart von Jurkat E6-Zelllysate erhalten wurde; Spur 3: Spezifische, überveränderte Bande, die in Gegenwart des Antikörpers MHM23 erhalten wurde; Spur 4: kein verändertes Aptamer wurde unter Bedingungen identisch zu denen in Spur 3 in Abwesenheit von Jurkat E6-Zelllysate erhalten; Spur 5: Spezifische, überveränderte Bande, die in Anwesenheit des Antikörpers MEM170 erhalten wurde; Spur 6: Kein Super-„Shift“ wurde in Gegenwart des Antikörpers OKT3 erhalten, der gegen den T-Zellrezeptor gerichtet ist. Die experimentellen Bedingungen waren ansonsten die gleichen wie in Spur 2; Spur 7: Kein verändertes Aptamer wurde unter Bedingungen identisch zu denen in Spur 6 in Abwesenheit von Jurkat E6 Zelllysate erhalten.

[0023] Fig. 4: Inhibition der PMA-stimulierten Zelladhäsion als Funktion der Aptamerexpression. A. Der CD18cyt-Binder TR-D20 reduziert die von Phorbol ester aktivierte Jurkat-Zelladhäsion an ICAM-1. Jurkat E6-Zellen, die mit rekombinanten Vaccinia Viren infiziert wurden, wurden an Plastikschalen anheften gelassen, die wie in dem Abschnitt Beispiel 1 beschrieben mit einer rekombinanten ICAM 1-Chimäre beschichtet waren. Die Jurkat E6-Zelladhäsion an ICAM-1 war in Anwesenheit mehrerer Kontrollviren (vT7/vTR, Wildtyp-Vaccinia Virus, vT7, vTR-D20) durch PMA überinduzierbar. Jedoch reduzierte die Induktion der Expression der CD 18cyt-spezifischen Aptamere (vT7/vTR-D20, rechtes Feld) die PMA-stimulierte Jurkat E6 Zelladhäsion, aber nicht die Basisadhäsion. Diese Resultate wurden mindestens dreimal unabhängig reproduziert. Der Prozentsatz reflektiert die Werte, die normalisiert wurden gegen stimulierte vT7/vTR Doppelinfektionen, die auf 100% gesetzt wurden. B. Humane, periphere, mononukleäre, Blutzellen sind gute Ziele für Proteinüberexpression durch rekombinante Vaccinia Viren. Zytoplasmatische Immunglobulin-(clg)-Fusionen von Cytohesin-1-Subdomänen wurden in permeabilisierten PBMC mit der Hilfe einer FITC-konjugierten antihuman Ig-Antikörperpräparation detektiert. Oberes Feld, links: Kontrollinfektion, keine rekombinanten Moleküle exprimiert; oberes Feld, rechts: clg-Domänen allein; unteres Feld, links: clg-PH; unteres Feld, rechts: clg-PH+c-Domäne. C. TR-D20 reduziert spezifisch die PMA-stimulierte Adhäsion von PBMC an ICAM-1. Aptamere oder Kontrollproteine wurden in PBMC durch rekombinante Vaccinia Viren wie oben beschrieben exprimiert. Die PMA-stimulier-

te Adhäsion dieser Zellen an ICAM-1 war gleich, wenn das TR-D42-Aptamer, clg oder clg-PH Kontrollproteine exprimiert wurden, aber die stimulierte Zelladhäsion war nach der Expression der intakten PH+c-Domäne von Cytohesin-1 (clg-PH+c) oder des TR-D20-Aptamers dramatisch reduziert.

[0024] Fig. 5: Bestimmung der Bindungsstelle der Aptamere TR-D20, TR-D28, TR-D31 und der Negativkontrollsequenz TR-D42 an CD18cyt unter Verwendung synthetischer, biotinylierter Peptidfragmente. Alle Gel-„Shifts“ wurden in Anwesenheit von 25 µM Streptavidin durchgeführt, um die Trennung der verschobenen gegenüber der nicht-verschobenen RNA zu verstärken. Gel-„Shift“-Experimente wurden in Anwesenheit von 4 nM radioaktiv markierter RNA und 40 µM nicht-spezifischem tRNA-Kompetitor durchgeführt. Spur 1: Freies Aptamer in Gegenwart von 25 µM Streptavidin und 40 µM unspezifischer Kompetitor-tRNA; Spuren 2, 4, 6 oder 3, 5, 7: Gleich wie Spur 1 in Gegenwart von jeweils 25 µM oder 12,5 µM der Peptide A23 (Spur 2,3), B16 (Spur 4,5) und C17 (Spur 6, 7).

B: Aufeinanderfolgende Kurzdarstellung er [Fig. 6–Fig. 12](#) (für Beispiel 2)

[0025] Fig. 6: Vektoren für die phänotypische Selektion. A. Schema wichtiger Eigenschaften des Plasmids pP1; CMV P: Promotorelement: unmittelbarer-früher Promotor des humanen Cytomegalovirus. Beispiel eines konstitutiven Promotorelements, das in einer großen Vielzahl von Zellen aktiv ist. In Abhängigkeit von den Zelllinien, der Anwendung usw. können andere häufig gebrauchte Promotoren oder Kombinationen von Promotorelementen (z.B. SV40 früher Promotor, Rous Sarkoma Virus unmittelbarer-früher Promotor usw.) verwendet werden; IL-2 P: IL-2-Promotor; neo: Selektierbarer Marker: Resistenzgen (Aminoglykosid-Phosphotransferase), das allgemein verwendet wird, um nach Zellen, die ein transfiziertes Plasmid enthalten, über Detoxifikation von Aminoglykosidantibiotika zu selektieren; hsv-thymidinkinase: Gen für die Thymidinkinase des Herpes Simplex Virus. B. Schema wichtiger Eigenschaften des Plasmids pP2; CMV P: vergleiche pP1; Pol III P: Promotorelement: RNA-Polymerase-III-Promotor; vai random vai: Zufallsbibliothek von Nukleinsäuren mit den adenoviralen VAI-RNA-Sequenzen, die den Export der funktionalen Nukleinsäure in das Zytoplasma erlauben. OriP: Episomale Replikation: Der Ausgangspunkt der Replikation des Epstein Barr Virus (EBV) und das nukleäre Antigen (EBNA-1) ermöglichen die episomale (extrachromosomale) Hochkopie-Replikation in und die Erhaltung in Primaten- und Hundezelllinien; EBNA-1: Gen für das nukleäre Antigen 1 des Epstein Barr Virus; hygromycin: Resistenz gegen Hygromycin kann genutzt werden, um für Zellen zu ko-selektieren die zwei Plasmide enthalten (z.B. ein zusätzliches Plasmid mit der Neo-Resistenz).

[0026] Fig. 7: Schema der funktionalen Selektion gegen die Induktion des Interleukin-2-Promotors in T-Zellen nach Stimulierung mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA). Die Proteinkaskade, die schematisch in diesem Beispiel gezeigt ist und in einer T-Zelle von Protein X über Y nach Z führt (gerade Pfeile), führt letztendlich zu der Aktivierung des Interleukin-2-Promotors (IL-2P) des Reporterkonstrukts IL2 P/HSV-Thymidinkinase. Transkription und Translation der mRNA der HSV-Thymidinkinase (mRNA HSV TK) führt zu der Expression der Herpes-Simplex-Thymidinkinase (HSV TK) (gestrichelte Pfeile repräsentieren Genexpression). Konstitutive Transkription der Sequenzen einer Nukleinsäurebibliothek (vai/random/vai) unter der Kontrolle eines RNA-Polymerase-III-Promotors (Pol III P) führt zur Bildung einer Zufalls-RNA-Bibliothek, die aufgrund ihrer adenoviralen VAI-Sequenz in das Zytoplasma exportiert wird. Wie in dieser Figur angegeben beeinflusst die Expression einer nicht-funktionalen Nukleinsäure die Induktion des IL-2P durch die Signaltransduktionskaskade X, Y, Z und die Expression der HSV TK nicht. Die Anwesenheit der HSV TK und von Ganciclovir wird durch die Produktion toxischer Stoffe zum Tod der T-Zelle führen. Kein Zelltod wird auftreten, wenn die exprimierte RNA-Bibliothek funktionale Sequenzen enthält, welche die Expression der HSV TK beeinflussen, beispielsweise durch Unterbrechung der Signaltransduktionskaskade indem eines ihrer Proteine inhibiert wird. Diese Zellen können dann selektiert werden (vergleiche [Fig. 8](#)).

[0027] Fig. 8: Gleiches phänotypisches Selektionsschema wie in [Fig. 7](#), jedoch wird in diesem Fall eine funktionale Nukleinsäure von Pol III/vai/random/vai exprimiert (gestrichelte Pfeile repräsentieren Genexpression). Die funktionale Nukleinsäure bindet in diesem Beispiel an Protein X und blockiert die Signalübertragung in der Kaskade von X zu Y (gerade Pfeile). Folglich wird die Induktion des IL-2-Promotors inhibiert und es wird keine HSV TK exprimiert. Die T-Zelle überlebt in Gegenwart von Ganciclovir und das Gen, das für die funktionale Nukleinsäure kodiert, kann isoliert werden.

[0028] Fig. 9: Vektoren für die funktionale Targetidentifizierung. A. Schema von wichtigen Eigenschaften des Plasmids pF1; CMV P: Promotorelement „unmittelbarer-früher Promotor des humanen Cytomegalovirus“. Beispiel eines konstitutiven Promotorelements, dass in einer großen Vielfalt an Zelltypen aktiv ist. IL-2 P: IL-2-Promotor; OriP: Episomale Replikation. Der Ausgangspunkt der Replikation des Epstein Barr Virus und das nukleäre Antigen (EBNA-1) ermöglichen die episomale (extrachromosomale) Hochkopie-Replikation in und die Er-

haltung in Primaten- und Hundezelllinien; EBNA-1: Gen für das nukleäre Antigen 1 des Epstein Barr Virus; cDNA-Bibliothek: Die cDNA-Bibliothek ist in diesem Beispiel von T-Zellen abgeleitet. Die Bibliothek wird benutzt, um für die Komplementation der inhibierten Signaltransduktionskaskade zu selektieren. Überexpression des Faktors, der durch die funktionale Nukleinsäure inhibiert ist, umgeht den Block in der Signalleitung, wodurch der IL-2-Promotor wieder in denjenigen Zellen induziert wird, die das Zielgen von Interesse enthalten; fNS-hsv thymidinkinase: Dieses Konstrukt erlaubt die Identifizierung des Produkts des Zielgens durch die Spezifität der Nukleinsäure-Protein-Wechselwirkung. Das Gen der funktionalen Nukleinsäure (fNS), in diesem Beispiel eine Aptamersequenz, wird in den 5'-UTR der Herpes-Simplex-Thymidinkinase kloniert. Nach Bindung des Aptamerliganden (der funktionalen Nukleinsäure) wird die Expression des Reporters HSV-TK mutmaßlich durch die Blockierung der Translation inhibiert; neo: Selektierbarer Marker und Resistenzgen (Aminoglykosid-Phosphotransferase), das allgemein verwendet wird, um nach Zellen, die ein transfiziertes Plasmid enthalten, über Detoxifikation von Aminoglykosidantibiotika zu selektieren. B. Schema wichtiger Eigenschaften des Plasmids pF2. CMV P: vergleiche Plasmid pF1; Pol III P: Promotorelement: RNA-Polymerase-III-Promotor; vai fNS vai: Funktionale Nukleinsäure (fNS) mit den adenoviralen VAI-RNA-Sequenzen, die den Export der funktionalen Nukleinsäure in das Zytoplasma erlauben; OriP: Vergleiche pF1; hygromycin: Resistenz gegen Hygromycin kann genutzt werden, um für Zellen zu ko-selektieren die zwei Plasmide enthalten (z.B. ein zusätzliches Plasmid mit der Neo-Resistenz); mlg: Oberflächenmarker, der die Affinitätsselektion transformierter Zellen erlaubt. Beispielsweise werden in diesem Beispiel die konstanten CH2- und CH3-Domänen des humanen IgG1 als eine Transmembranversion (mlg), die auf der Zelloberfläche präsentiert wird, exprimiert.

[0029] Fig. 10: Schema für die funktionale Zielmolekülidentifizierung. Die von Pol III/vai/fNS/vai exprimierte (gestrichelte Pfeile repräsentieren Genexpression) und in der phänotypischen Selektion identifizierte funktionale Nukleinsäure bindet an Protein X und blockiert die Signalleitung von X nach Y (gerade Pfeile) in der Kaskade nach Stimulierung mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) (vergleiche auch [Fig. 8](#)). Da Protein M (Klon einer T-Zell-cDNA-Bibliothek), das unter der Kontrolle des Promotors CMV P (vergleiche Beschreibung der [Fig. 9](#)) exprimiert wird, keinen Effekt auf die blockierte Kaskade hat, ist die Induktion des IL-2-Promotors (IL-2 P) inhibiert und deshalb kommt es nicht zur Expression der Reporterkonstrukte fNS-HSV-Thymidinkinase und mlg (vergleiche Beschreibung der [Fig. 9](#)). Da die T-Zellen das mlg nicht auf ihrer Oberfläche exprimieren, können sie nicht beispielsweise durch Verwendung von Antikörpern gegen mlg isoliert werden.

[0030] Fig. 11: Schema für die funktionale Zielmolekülidentifizierung. Gleich wie [Fig. 10](#), außer dass in diesem Beispiel das kognate Zielmolekül Protein X für die funktionale Nukleinsäure (fNS) von einer cDNA-Bibliothek (gestrichelte Pfeile repräsentieren Genexpression) exprimiert wird. Die Überexpression von Protein X umgeht den Block des endogenen Protein X durch die fNS. Daher wird die Signaltransduktionskaskade X, Y, Z (gerade Pfeile) nach Stimulierung mit PMA gerettet und die mRNA wird von IL-2-Promotor-Reporterkonstrukten transkribiert. Die Expression des Oberflächen mlg (vergleiche auch [Fig. 9](#)) erlaubt die Affinitätsisolierung der T-Zellen. Gleichzeitig bindet Protein X an die fNS, die in den 5'-UTR des fNS-HSV-TK-Konstrukts inseriert ist. Das resultiert in der Blockade der Translation der HSV TK. Die Abwesenheit des Enzyms Herpes-Simplex-Thymidinkinase ermöglicht den T-Zellen in der Gegenwart von Ganciclovir zu überleben und die positiven cDNA-Klone können isoliert werden.

[0031] Fig. 12: Schema der funktionalen Zielmolekülidentifizierung. Obwohl Protein X in diesem schematischen Beispiel durch die funktionale Nukleinsäure (fNS) blockiert wird, induziert das Protein N, das von der cDNA-Bibliothek exprimiert wird, die IL-2-Promotor-Reporterkonstrukte durch Deregelation der endogenen Signaltransduktionskaskade, indem es direkt auf Protein Z wirkt (vergleiche auch [Fig. 10](#), [Fig. 11](#)). Diese falsch positive Komplementation führt zu der Expression des mlg, welches die Isolierung der Zellen mit mlg-spezifischen Antikörpern erlauben würde. Da Protein N nicht der kognate Ligand für die funktionale Nukleinsäure ist, kann es nicht an die fNS in dem fNS-TK-mRNA-Konstrukt binden (vergleiche auch [Fig. 10](#), [Fig. 11](#)). Daher wird die Herpes-Simplex-Thymidinkinase exprimiert und die Zellen werden in Gegenwart von Ganciclovir getötet. Dieser Schritt eliminiert falsch positive cDNA-Klone, die durch Deregelung der Signaltransduktion wirken.

[0032] Die Kandidaten-RNAs oder DNAs umfassen funktionale Nukleinsäuren, z.B. einzelsträngige DNA (ssDNA) oder RNA (ssRNA) oder chemisch modifizierte Formen davon (ssNAmo), doppelsträngige DNA (dsDNA) oder RNA (dsRNA) oder davon chemisch modifizierte Formen davon (dsNAmo), die in der Lage sind ein intrazelluläres Zielmolekül zu binden, zu modulieren oder katalytisch zu modifizieren und dadurch seine biologische Funktion zu beeinflussen. Die funktionalen Nukleinsäuren können beispielsweise durch das „Screening“ großer, kombinatorischer Nukleinsäurebibliotheken (in vitro Selektion von Ribozymen, Aptazymen, Aptameren usw.) identifiziert werden. Kombinatorische Nukleinsäurebibliotheken, ob DNA oder RNA, enthalten gewöhnlich eine randomisierte Sequenz, die von feststehenden Regionen flankiert sind, die als Primer-Anheftungsstellen für die enzymatische Amplifikation über PCR oder im Fall von RNA über reverse Transkription

und PCR dienen. Die Bibliotheken können beispielsweise als ssDNA an einem automatisierten DNA-Syntheser unter Verwendung von 3'-Phosphoramidit-Chemie synthetisiert werden, wobei die randomisierte Region mit 3'-Phosphoramiditlösungen synthetisiert wird, die Mischungen der vier Basen A,C,G,T enthalten (Hermes et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87 (1990), 696–700). Die Verhältnisse zwischen den vier Monomeren können in Abhängigkeit von der Anwendung variiert werden. Die feststehenden Regionen enthalten für die Präparation der RNA einen RNA-Polymerase-Promotor, z.B. den T7-RNA-Polymerase-Promotor, der die Transkription der Templat-DNA in RNA ermöglicht. Falls nötig kann die ssDNA unter Verwendung enzymatischer Protokolle, z.B. der PCR, die einem Fachmann wohl bekannt sind, doppelsträngig gemacht werden. Für einen Überblick vergleiche Abelson, *Methods in Enzymology* 267 (1996), Seiten 275–426, Academic Press, San Diego. Bevorzugterweise enthält die Bibliothek 8 bis 200 randomisierte Nukleotide (Tuerk und Gold, *Science* 249 (1990), 505–510; Bartel und Szostak, *Science* 261 (1993), 1411–1418) mit Komplexitäten von 6×10^5 bis 1×10^{16} , welche in erfolgreichen Selektionsexperimenten eingesetzt wurden. Falls gewünscht kann die funktionale Nukleinsäure an andere Moleküle wie zum Beispiel chemisch reaktive Gruppen, Lipide, Peptide, Proteine usw., die der funktionalen Nukleinsäure zusätzliche Eigenschaften hinzufügen, kovalent angehängt oder nicht-kovalent gebunden werden. Funktionale Nukleinsäuren umfassen nicht Nukleinsäuren, die durch Nukleinsäurewechselwirkungen wirken, wie zum Beispiel Antisensemechanismen oder natürliche Ribozyme oder modifizierte und mutierte Formen davon, die Antisenseerkennung mit Phosphodiestererspaltungsaktivität kombinieren und beispielsweise in Gentherapieansätzen angewendet werden. Eine funktionale Nukleinsäure kann Teil eines Konstrukts mit zusätzlichen Sequenzen sein, ob natürlich oder nicht natürlich, die zusätzliche Funktionen hinzufügen, z.B. erhöhte Stabilität, Lokalisierungssignale oder enzymatische Aktivitäten. Darüber hinaus kann die funktionale Nukleinsäure selbst nach Bindung an ihr intrazelluläres Zielmolekül in einer zweiten Funktion, ob intrinsisch oder in einem Konstrukt mit zusätzlichen Sequenzen hinzugefügt, moduliert werden, z.B. Bindung eines dritten Liganden oder katalytisch aktiv zu sein.

[0033] Aptamere sind spezifische ligandenbindende Nukleinsäurerezeptoren (ssDNA, RNA, modD-NA or modRNA), die durch „Screening“ des „Formraums“ von enormen kombinatorischen Bibliotheken einzelsträngiger Nukleinsäuren durch in vitro Selektion isoliert werden können.

[0034] Die in vitro Selektion von Aptameren kann erreicht werden durch in Kontakt bringen einer Nukleinsäurebibliothek mit einem Zielmolekül, z.B. einem Protein, und dem Abtrennen der gebundenen Nukleinsäuren vom Rest der Nukleinsäuremischung. Die Abtrennung kann erreicht werden durch Zurückhalten der Nukleinsäure/Protein-Komplexe auf Nitrozellulosefiltern (Tuerk und Gold, *Science* 249 (1990), 505–510), Immobilisierung des Zielmoleküls auf einem festen Träger vor der Inkubation mit der Bibliothek und Entfernung nicht-gebundener Spezies durch Spülungen mit einem geeigneten Puffer (Nieuwieland et al., *Biochemistry* 34 (1995), 5651–5659) oder jeder anderen Methode, die die Abtrennung der Zielmolekül/Nukleinsäure-Komplexe von ungebundenen Spezies erlaubt. Nach Isolierung der gebundenen Spezies kann die DNA unter Verwendung von PCR amplifiziert werden oder im Fall von RNA durch reverse Transkription, PCR und Transkription. Dieser Zyklus kann mehrere Male wiederholt werden, um eine Bibliothek mit erhöhter Affinität für das Zielmolekül her vorzubringen. Darauf folgend können individuelle Aptamersequenzen durch Klonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte unter Verwendung von Standardmethoden identifiziert werden.

[0035] Nukleinsäureaptamere sind für weit mehr als hundert verschiedene Zielmoleküle beschrieben worden, was zeigt, dass Aptamere jetzt routinemäßig für beinahe jedes gewünschte Zielmolekül erhalten werden können (für Übersichtsartikel vergleiche z.B.: Osborne und Ellington, *Chem. Rev.* 97 (1997), 349–370; Famulok und Jenne, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2 (1998), 320–327).

[0036] Der Ausdruck Ribozyme wird in der vorliegenden Erfindung für katalytisch aktive Nukleinsäuren verwendet, die auf ein intrazelluläres Zielmolekül wirken, wodurch sie seine Funktion modifizieren. Nicht eingeschlossen sind in der vorliegenden Erfindung natürlich vorkommende Ribozyme, wie zum Beispiel Hammerhead-Ribozyme, Hairpin-Ribozyme oder Derivate davon, die durch Watson-Crick-Bindung an Nukleinsäuresubstrate und Phosphodiestererspaltung wirken und beispielsweise in Gentherapieansätzen verwendet werden (Bramlage, *Tibtech* 16 (1998), 435–438). Ribozyme mit neuen katalytischen Eigenschaften können unter Verwendung von in vitro Selektionsexperimenten isoliert werden. Zum Beispiel sind Ribozyme isoliert worden, die in der Lage sind RNA-Alkylierung, Bildung von Amidbindungen oder Porphyrinmetallierung zu katalysieren (Breaker, *Chem. Rev.* 97 (1997), 371–390).

[0037] Aptazyme können als Chimären zwischen einer katalytischen RNA und einem Aptamer betrachtet werden. Diese Chimären können rationell konstruiert werden in vitro von bestimmten kombinatorischen Bibliotheken selektiert werden (vergleiche Robertson und Ellington, *Nature Biotechnol.* 17 (1999), 62–66). Gewöhnlich wird die Aptamerdomäne eines Aptazyms als regulatorisches Modul für die allosterische Ribozymak-

tivierung oder- inhibition eingesetzt (Tang und Breaker, Chem. Biol. 4 (1997), 453–459; Tang und Breaker, RNA 3 (1997), 914–925, Tang und Breaker, Nucleic Acids Res. 26 (1998), 4214–4221; Araki et al., Nucleic Acids Res. 26 (1998), 3379–3384). Ebenso und konsequenterweise enthält ein Aptazym, wenn es selektiert wird, um von einem regulatorischen Molekül beeinflusst zu werden, eine Bindungsdomäne für dieses Molekül und kann sich daher auch wie ein Aptamer verhalten.

[0038] Intramere sind funktionale Nukleinsäuren (Aptamere, Aptazyme usw.), die exogen oder endogen in prokaryotische oder eukaryotische Zellen eingebracht werden und ein intrazelluläres Zielmolekül binden, modulieren oder enzymatisch modifizieren.

[0039] Modulation eines intrazellulären Zielmoleküls kann zum Beispiel die Inhibition oder Stabilisierung einer Protein/Protein-Interaktion oder Proteindomäne/Protein-Interaktion oder Protein/Nukleinsäure-Interaktion oder Protein/"Kleinmolekül"-Interaktionen usw. sein. Modulierung kann auch die Aktivierung oder Inhibition von Enzymen über verschiedene Mechanismen umfassen wie zum Beispiel Sequestrierung des Substrat (der Substrate), Bindung an die aktive Stelle, Induktion von Konformationsänderungen, allosterische Regulierung usw. Modulation eines intrazellulären Zielmoleküls kann durch beides, nicht-kovalente Interaktionen oder kovalente Modifikationen wie zum Beispiel Biotinylierung, erfolgen (Wecker et al., RNA 2 (1996), 982–94). Weitere Methoden, die zum Beispiel für auf Antikörpern basierende Ansätze entwickelt wurden, könnten auf das funktionale Nukleinsäuresystem adaptiert werden, wobei das Aptamer mit einem Molekül verbunden werden könnte, das in der Lage ist das gebundene Zielmolekül chemisch zu inaktivieren. Beispielsweise werden die intrazellulären, funktionalen Nukleinsäuren über eine kurze „Annealing“-Sequenz, die kovalent an dem Farbstoff Malachitgrün (MG) angehängt ist, markiert. Diese kurzen Oligonukleotide könnten exogen angewendet werden. MG absorbiert Licht bei einer sichtbaren Wellenlänge, die nicht signifikant durch Zellen absorbiert wird. Nach der Bestrahlung mit einem Laser wird das MG aktiviert und erzeugt kurzlebige Hydroxylradikale, die Proteine höchstwahrscheinlich durch Modifizierung der Aminosäureseitenketten inaktivieren [„Chromophore assisted laser inactivation (CALI)“, vergleiche: Liao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 91 (1994), 2659–63]. Der Inaktivierungsprozess tritt nur innerhalb einer kurzen Distanz von der Farbstoffgruppe auf. Daher kann das als Ziel gesetzte Protein oder die Untereinheit generell geschädigt werden ohne seine Nachbarn zu beeinflussen. Dies hat zwei Vorteile: Erstens würde das Aptamer nicht notwendigerweise an die aktive Stelle des Proteins binden müssen, sondern könnte mit einem benachbarten Epitop interagieren, das besser für die Bindung an eine Nukleinsäure geeignet sein könnte. Sogar obwohl das gebundene Epitop entfernt von der aktiven Stelle ist, wird das Protein immer noch spezifisch inaktiviert. Zweitens könnten mehrere Bestrahlungspulse Proteine mit hoher Abundanz, die anfangs in höheren Kopienzahlen als das spezifische Aptamer vorhanden sind, inaktivieren, da das Protein irreversibel inaktiviert wird und das Aptamer konstitutiv exprimiert werden kann.

[0040] Intrazelluläre Zielmoleküle umfassen kleine Moleküle, biologische Kofaktoren, natürliche Polymere wie zum Beispiel Proteine, Proteindomänen, Peptide und Nukleinsäuren, Glykoproteine, Hormone, Rezeptoren, Proteinkomplexe, Protein/Nukleinsäure-Komplexe, Toxine, Viren und andere Substanzen, die natürlicherweise in Zellen gefunden werden.

[0041] Phänotyp kann beispielsweise die Induktion oder Repression der Transkription eines bestimmten Gens, Prozesse, die mit Signaltransduktionskaskaden verbunden sind wie zum Beispiel Adhäsion als Antwort auf bestimmte Reize, Zelldifferenzierung, Apoptose usw. sein.

[0042] Phänotypische Selektion ist ein Prozess, in dem Nukleinsäure-Bibliotheken durch verschiedene Methoden, die dem Fachmann bekannt sind (Elektroporation, Lipofektion, Expression mit viralen Vektorsystemen, Expression von RNA-Polymerase-Promotoren enthaltenden Plasmiden usw.), in Zellen eingeführt werden. Diejenigen Zellen, die eine funktionale Nukleinsäure enthalten, die auf ein Zielmolekül wirkt, das in einen bestimmten Phänotyp involviert ist, werden auf der Basis ihres veränderten Phänotyps von dem Großteil zellulären Materials, das keinen veränderten Phänotyp zeigt, abgetrennt. Zellen, die in der phänotypischen Selektion verwendet werden umfassen Prokaryoten, Hefe, Insekten- oder Pflanzenzellen und bevorzugterweise Säugerzellen (z.B. CHO, HeLa, COS, MDCK, 293, WI38 und Jurkat E6-Zellen). Falls eine klare Trennung auf Basis des veränderten Phänotyps nicht möglich oder schwierig ist, können Reporterkonstrukte angewendet werden, die eine deutlichere oder bessere Unterscheidung erlauben. In einem positiven phänotypischen Selektionsexperiment, zum Beispiel der Induktion eines zellulären Promotor- oder Enhancer/Promotor-Konstrukts, wird ein Reportergen, das die Identifizierung des veränderten Phänotyps (hier die Induktion des Promotors) erlaubt, unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors in dem Reporterkonstrukt eingefügt. Reportergene, die in dieser Art von Selektion verwendet werden, sind beispielsweise Resistenzgene wie die Aminoglykosidphosphotransferase (Southern und Berg, J. Mol. Appl. Genet. 1 (1982), 327–341), die Aminoglykosidantibiotika (Neomycin, G418) inaktiviert und Zellen resistent gegen diesen Wirkstoff macht. Folglich werden

die Zellen, die das Gen für die funktionale Nukleinsäure beinhalten in Anwesenheit des Wirkstoffs überleben, wenn der induzierbare Promotor durch die Wirkung einer funktionalen Nukleinsäure (fNS) angeschaltet wird, und die Gene für die fNS können identifiziert werden. Beispielsweise könnten Säugerpromotoren, die von der Aktivierung durch den Transkriptionsfaktor NF B abhängig sind, durch die Inhibition des I B Proteins, das normalerweise den Import von NF B in den Zellkern verhindert, aktiviert werden (Rolfe et al., J. Mol. Med. 75 (1997), 5–17; Fuchs et al., Oncogene 17 (1998), 1483–90. Andere Beispiele von Promotoren, die durch einen inhibitorischen Mechanismus reguliert werden, sind bakterielle Transkriptionseinheiten, zum Beispiel das E.coli lac-Operon, das durch den lac-Repressor reguliert wird (Gilbert und Muller-Hill, Proc. Nat. Acad. Sci. 56 (1966), 1891–1898).

[0043] Negative phänotypische Selektion kann beispielsweise durch die Induktion eines Promotors stattfinden. In diesem Fall könnte das Reportergen ein Toxin sein [z.B. Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase (Fife et al., Gene Ther. 5 (1998), 614–620] oder Diphtherie-Toxin (Massuda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94 (1997), 14701–14706), das den Tod von Zellen fördert, wo keine funktionale Nukleinsäure den zellulären Signaltransduktionsweg inhibiert, der den Promotor induziert. Induzierbare Gene umfassen bakterielle, virale und eukaryontische Transkriptionseinheiten, z.B. im Arabinose-Operon (Wilcox et al., J. Biol. Chem. 249 (1974), 2946–2952), die frühen und späten Gene des Vaccinia Virus (Moss, Annu. Rev. Biochem. 59 (1990), 661–688) oder Promotoren der Immunglobulingene (Staudt et al., Ann. Rev. Immunol. 10 (1991), 373–398). Die in phänotypischen Selektionen verwendeten Promotoren können natürlich vorkommende Promotor/Enhancer-Elemente oder jegliche Kombinationen oder Modifikationen davon sein.

[0044] Reporterkonstrukte können positive und negative phänotypische Selektionen umfassen. Zum Beispiel kann eine negative phänotypische Selektion über die Expression eines Toxins (wie zum Beispiel dem Diphtherie-Toxin) unter der Kontrolle eines induzierbaren zellulären Promotors, wie dem Interleukin-2-Promotor in T-Lymphozyten, entstehen. Diese Genkonstrukte können in Zellen z.B. über Plasmide eingebracht werden und die Expression des Toxingens wird von der natürlichen, den Promotor induzierenden Maschinerie der Zelle vorangetrieben. Nur in denjenigen Zellen, in denen eine funktionale Nukleinsäure die Induktion des Toxin-Promotors inhibiert, wird das Toxin nicht exprimiert werden und die Zellen überleben und können selektiert werden.

[0045] Die Vektoren (Vektorelemente) und Protokolle für das Klonieren, das Transfizieren, die transiente Genexpression und das Erhalten stabiler transfizierter Zelllinien sind gut bekannt und in der Literatur beschrieben (Maniatis et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Spector et al., Cells: A Laboratory Manual (1998), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York). Vektoren für die Expression der Nukleinsäure-Bibliotheken können jegliche allgemein verwendeten Konstrukte sein um fremde Gene in Zellen einzuschleusen, zum Beispiel lineare PCR-Fragmente, Plasmide, DNA-Viren wie M13 oder Vaccinia, RNA-Viren wie Retroviren oder das Semliki Forest Virus. Die Gene für die Nukleinsäure-Bibliothek werden unter die Kontrolle geeigneter Promotoren gestellt, bevorzugt solche, die eine hohe Transkription der Nukleinsäuren ermöglichen.

[0046] Beispiele, die aber nicht darauf beschränkt sind, umfassen Polymerase-III-abhängige Promotoren, wie zum Beispiel der Hefe-RNase-P-Promotor (Good und Engelke, Gene 151 (1994), 209–214), Säuger-U6- oder -tRNA^{met}-Promotoren (Bertrand et al., RNA 3 (1997), 75–88) retrovirale „long terminal repeats“ (Rossi, Tibtech 13 (1995), 301–306), T7-RNA-Polymerase-Promotoren, wie in Beispiel 1 beschrieben, oder der subgenomische Promotor für die Semliki-Forest-Virus-Replikase (Tubulekas et al., Gene 190 (1997), 191–95).

[0047] Vektoren, die als Reporterkonstrukte benutzt werden, können Plasmide (z.B. pUC18, pYES2, pCDM8) oder virale Genome, wie zum Beispiel Adenovirus, AAV oder retrovirale Vektoren (Moloney Murine Leukemia Virus (MoMuLV), Gibbon Ape Leukemia Virus (GaLV) usw.) sein. Die Verwendung von stabil transfizierten Reporterzelllinien ist lediglich optional, sie stellt jedoch ein zuverlässiges System dar, um Zellen zu selektieren, welche die negative Selektion in Gegenwart eines Toxins überleben.

[0048] Unter Zielmolekülvalidierung versteht man die Identifizierung eines bestimmten zellulären Zielmoleküls als das für einen bestimmten Phänotyp verantwortliche Schlüsselmolekül. Sie umfasst die intrazelluläre Anwendung eines Nukleinsäuremodulators, der das Zielmolekül beeinflusst, um dessen Rolle in dem komplexen Netzwerk zellulärer Komponenten zu untersuchen. Das bevorzugte Ziel ist es zu untersuchen, ob das Zielmolekül für einen bestimmten zellulären Status oder Krankheitszustand verantwortlich ist und daher ein gutes Zielmolekül für Medikamente ist oder ob dies nicht der Fall ist.

[0049] Unter Zielmolekülidentifizierung versteht man die Verbindung einer zellulären Komponente mit einem bestimmten Phänotyp, gleichgültig ob seine biologische Funktion bekannt ist oder nicht. Die Zielmoleküliden-

tifizierung kann mittels eines funktionalen Nukleinsäuremodulators erfolgen, der durch phänotypische Selektion identifiziert worden ist. Das Zielmolekül, das durch solch einen Modulator beeinflusst wird, stellt wahrscheinlich das eigentliche Schlüssel-molekül oder ein Schlüssel-molekül, das für einen bestimmten Phänotyp verantwortlich ist. Das Zielmolekül kann durch seine Interaktion mit der funktionalen Nukleinsäure identifiziert werden. Beispielsweise wird das Hefe-Zwei-Hybrid-System, eine Modifikation des Zwei-Hybrid-Systems, verwendet, um RNA-Protein-Interaktionen nachzuweisen. Das Drei-Hybrid-System benutzt ein RNA-Hybrid als Zwischenglied zwischen zwei Hybrid-Proteinen. Die Interaktion der drei Komponenten dient zur Rekonstitution der transkriptionellen Aktivierung von Reportergenen durch einen Mechanismus ähnlich dem Zwei-Hybrid-System (SenGupta et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 93 (1996), 8496–8501). Die funktionale Nukleinsäure, die in das RNA-Hybrid kloniert ist, wird mit ihrem Zielprotein interagieren, das als Teil einer Protein-Hybrid-Bibliothek von zellulären Proteinen exprimiert wird. Daher werden die Reportergene in denjenigen Hefezellen exprimiert werden, welche beides enthalten, die funktionale Nukleinsäure und ihr Zielmolekül, und die Plasmide mit den Zielgenen können isoliert werden.

[0050] Ein anderer Ansatz ist es, das Zielmolekül über Komplementations-Klonierung zu identifizieren, wie in Beispiel 2 dargestellt. Diese Technik wurde erfolgreich angewandt, um Proteine zu isolieren, die Zelllinien, welche mutierte endogene Gene enthalten, funktional zu komplementieren, z.B. die Komplementations-Klonierung von NEMO, einer Komponente des I κ B-Kinase-Komplexes (Yamaoka et al., Cell 93 (1998), 1231–1240).

[0051] Hochspezifische Nukleinsäuremodulatoren zellulärer Zielmoleküle können beispielsweise routinemäßig durch Anwendung der Technologien SELEX, Aptazyme, Zwei- und Drei-Hybrid-Technologien oder durch die hier beschriebenen phänotypischen Selektionsmethode usw. erhalten werden. Die resultierenden Nukleinsäuremodulatoren können exo- oder endogen durch Methoden wie Elektroporation, Lipofektion, Expression mit viralen Vektorsystemen, Expression von Plasmiden, die RNA-Polymerase-Promotoren enthalten, usw. in Zellen eingebracht werden. Funktionale Nukleinsäuren können auf ihr Zielmolekül über verschiedene Mechanismen wirken; sie können ihr Zielmolekül entweder in Antikörper-ähnlicher Weise binden, wodurch sie seine biologische Funktion modulieren. Zum Beispiel sind chemisch modifizierte, nukleaseresistente Aptamere für die Bindung an extrazelluläre Wachstumsfaktoren wie den „basic fibroblast growth factor“ selektiert worden (bFGF; vergleiche: [Jellinek et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 11227–11231; Jellinek et al., Biochemistry 34 (1995), 11363–11372.], „human keratinocyte growth factor“ (hKGF; vergleiche: [Pagratis et al., Nature Biotech. 15 (1997), 68–73]), „platelet derived growth factor“ (PDGF; vergleiche: [Green et al., Biochemistry 35 (1996), 14413–14424]) oder „vascular endothelial growth factor“ (VEGF; vergleiche: [Green et al., Chem. Biol. 2 (1995), 683–695; Jellinek et al., Biochemistry 33 (1994), 10450–10456; Ruckman et al., J. Biol. Chem. 273 (1998), 20556–20567]). Diese Aptamere blockierten die Bindung ihres extrazellulären Zielmoleküls an seinen natürlichen Proteinrezeptor und modellierten dadurch die biologische Funktion des Wachstumsfaktors.

[0052] Während es Stand der Technik ist, die biologische Funktion eines extrazellulären Proteins zu modulieren, ist ein zentraler Aspekt der vorliegenden Erfindung, das enorme Potential von hochaffinen und hochspezifischen Nukleinsäurereagenzien zu nutzen, um ein gegebenes Zielmolekül in intrazelluläre Anwendungen zu modulieren. Dass dies in der Tat gemacht werden kann, wurde repräsentativ in dem System gezeigt, das beispielsweise in Beispiel 1 erläutert wurde:

Es wird ein Ansatz beschrieben, der auf der Erkennung zytoplasmatischer Integrindomänen durch synthetische, ligandenbindende RNA-Aptamere, die aus einer kombinatorischen RNA-Bibliothek isoliert wurden, beruht. Ein auf Vaccinia Virus basierendes System ermöglichte hohe zytoplasmatische Expression von RNA-Aptameren (Intrameren), die gegen die intrazelluläre Domäne des β 2-Integrins LFA-1 gerichtet waren, ein Transmembranprotein, das die Zelladhäsion an intrazelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) vermittelt. Die zytoplasmatische Expression von Integrin bindenden Intrameren reduzierte die induzierbare Zelladhäsion an ICAM-1 in zwei verschiedenen Zelltypen. Die Aptamere zielen spezifisch auf eine funktionale zytoplasmatische Subdomäne und definieren diese dadurch als wichtig für die Regulation der Zelladhäsion in Leukozyten.

[0053] Integrine sind vielseitige, heterodimere Transmembranproteine, die adhäsive Interaktionen mit der extrazellulären Matrix und zellspezifischen Gegenrezeptoren vermitteln. Sie sind in diverse biologische Prozesse eingebunden, die Apoptose, Zellzyklusregulierung, Zellwanderung, Blutgerinnung, Gedächtnis und Leukozytenfunktion umfassen (Hynes, Cell 69 (1992), 11–25). Die zytoplasmatischen Domänen der Integrine spielen wahrscheinlich durch die Vernetzung von Signalereignissen innerhalb der Zelle zu den extrazellulären Domänen eine wichtige Rolle in der Regulation der Zelladhäsion, die genauen Mechanismen sind jedoch unklar (Diamond und Springer, Curr. Biol. 4 (1994), 506–517; Dedhar und Hannigan, Curr. Opin. Cell Biol. 8 (1996), 657–669). Das beta 2-Integrin LFA-1 (α L/ β 2, Cd11a/CD18) vermittelt die Adhäsion von Leukozyten in Immun- und Entzündungsantworten durch Bindung an zelluläre Liganden (Lub et al., Immunol. Today 16 (1995), 479–483), die intrazellulären Adhäsionsmoleküle ICAM-1, -2, -3, -4. Eine große Datenmenge legt nahe, daß

die zytoplasmatischen Domänen der beta 2-Kette wahrscheinlich durch ihre Interaktionen mit intrazellulären Proteinen und/oder dem membranahen Zytoskelett (Stewart et al., J. Cell Biol. 140 (1998), 699–707) mit der Regulierung der durch LFA-1 vermittelten Haftfähigkeit in Verbindung steht; einige Kandidaten für die zytoplasmatischen Liganden sind kürzlich identifiziert worden (Hibbs et al., J. Exp. Med. 174 (1991), 1227–1238; Pavalko und LaRoche, J. Immunol. 151 (1993), 3795–3807; Sharma et al., J. Immunol. 154 (1995), 3461–3470; Kolanus et al., Cell 86 (1996), 233–242). Um weitere Einsichten in diese Mechanismen zu erlangen, wurde ein System entwickelt, das die spezifische Inhibition der von LFA-1 vermittelten „Inside-out“-Signaltransduktion in vivo erlaubt. Die Ziele waren die Selektion von Aptameren, die die zytoplasmatische Domäne von CD18 binden, die Entwicklung und Anwendung eines Systems, das hohe Expression von Aptameren im Zytoplasma von Leukozyten erlaubt und die Untersuchungen ihrer biologischen Effekte im Kontext lebender Zellen.

[0054] Kurzum, wie in Beispiel 1 unten genau beschrieben, waren die Autoren in der Lage

- a) RNA-Aptamere zu isolieren, die an ein immobilisiertes Peptid binden, welches der zytoplasmatischen Domäne des integralen Transmembranproteins LFA-1 (CD18, beta 2-Integrin) entspricht.
- b) zu zeigen, dass die Aptamere ihr Zielmolekül spezifisch erkennen, sogar wenn sie in einen andern Sequenzkontext in einer RNA-Expressionskassette kloniert sind. Diese Kassette wurde von einem T7-RNA-Polymerase-abhängigen Expressionssystem (Fuerst und Moss, J. Mol. Biol. (1989), 333–348) abgeleitet und enthielt eine 5'-„Stern-Loop-Struktur“, von der vorher gezeigt werden konnte, dass sie RNA-Moleküle im Zytoplasma durch Verhinderung ihres Abbaus stabilisiert. Des weiteren enthielt das 3'-Ende das T-Terminator-„Hairpin-Loop-Motiv“ als einen Terminator für die von der T7-RNA-Polymerase abhängigen Transkription. Ein anderes Beispiel für ein zytoplasmatisches System, das für RNA-Expression geeignet sein dürfte, basiert auf der RNA-abhängigen RNA-Replikase viraler Vektoren, wie dem Semliki Forest Virus (SFV) (Tubulekas et al. Gene 190 (1997), 191–195). Am bedeutsamsten war, dass gezeigt werden konnte, dass die von der T7-RNA-Expressionskassette entstehenden Aptamertranskripte richtig terminiert waren und ihre Bindungsaktivität für CD18cyt vollständig behielten. Nicht richtig terminierte Aptamersequenzen, die zusätzliche Sequenzinformation aus dem viralen Genom enthielten, wurden ebenfalls auf Bindung an CD18cyt getestet. Es wurde festgestellt, dass diese unerwünschte zusätzliche Sequenzinformation in vitro wahrscheinlich wegen der Störung der korrekten Aptamerfaltung zu einer drastisch reduzierten Bindungsaktivität dieser Aptamervarianten an CD18cyt führte. Dieses Ergebnis etabliert zwei sehr wichtige und überraschende Punkte. Es zeigt, dass es möglich ist, (i) das Aptamer im Kontext zusätzlicher Sequenzinformation, wie zum Beispiel von stabilisierenden Sequenzmotiven oder von RNA-Lokalisierungssignalen usw., zu exprimieren, was entscheidend für die breite Anwendung von endogener Aptamerexpression ist und (ii) kleine kompakte Aptamere, die in vitro selektiert wurden, auf modulare Art zu konstruieren, um die Aptamere mit zusätzlichen Eigenschaften zu versehen, was die angemessene und effiziente intrazelluläre Anwendbarkeit sicher stellt, ohne die Aptamerbindung an das Zielmolekül zu beeinflussen.
- c) zu zeigen, dass die selektierten Aptamere endogenes LFA-1 spezifisch in Rohextrakten von Jurkat-E6-Zellen erkennen. Sie tun dies auch im Kontext der RNA-Expressionskassette.
- d) ein auf Vaccinia Viren basierendes RNA-Expressionssystem zu entwickeln, das hohe zytoplasmatische Expression von RNA-Aptameren, die gegen die zytoplasmatische Domäne des Integrins LFA-1 gerichtet sind, ermöglichte.
- e) den Phänotyp von zwei verschiedenen Zelltypen, Jurkat E6 und peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC), durch die zytoplasmatische Expression von Aptameren, die in diesen Zellen die zytoplasmatische Domäne von LFA-1 binden, zu verändern. In diesem Fall reduzierte die zytoplasmatische Aptamerexpression spezifisch die induzierbare Zelladhäsion an das interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM 1). Dieses Ergebnis ist unerwartet und repräsentiert aus mehreren Gründen einen der zentralen Aspekte dieser Erfindung: i) Zum ersten Mal ist das intrazelluläre Zielmolekül ein Protein oder eine Proteindomäne ohne jede bekannte Affinität für Nukleinsäuren. Der neue und unerwartete Aspekt dieses Befunds ist, dass das in vitro selektierte Aptamer das Zielmolekül, für das es selektiert wurde, spezifisch in einem intrazellulären Kompartiment findet, das sehr verschieden von anderen Kompartimenten ist, weil es eine große Zahl von professionellen, RNA-bindenden Proteinen enthält (wie zum Beispiel Helikasen, ribosomale Proteine, hnRNP-Proteine usw.), die in hohen Kopienzahlen von mehreren Millionen pro Zelle vorkommen. Diese professionellen, RNA-bindenden Proteine können mit sehr hoher Affinität (K_d 10^{-9} – 10^{-8}) an spezielle RNA-Motive binden, aber sie können auch mit RNAs in einer mehr von der Sequenz unabhängigen Art mit immer noch relativ hoher Affinität interagieren [z. B. die hnRNP-Proteine A1 und C1]; K_d 10^{-7} – 10^{-6} M; vergleiche: Nagai und Mattaj (Eds.), RNA-Protein Interactions (1994), Oxford University Press, 138–140]. Trotz der Erwartung, dass diese professionellen, RNA-bindenden Proteine mit dem kognaten Aptamerzielmolekül um die Bindung an das Aptamer konkurrieren, wurde hier gezeigt, dass das Aptamer sein Zielmolekül innerhalb der Zelle finden kann und den Phänotyp der Zelle ändern kann. ii) Obwohl die in vitro Affinität des Aptamers für seine kognate CD18cyt-Proteindomäne verhältnismäßig niedrig war (K_d 10^{-6} – 5×10^{-7} M), erkennt es sein Zielmolekül mit unerwarteter Spezifität. Dies zeigt, dass dieses System nicht auf Zielmoleküle

beschränkt ist, die durch ein Aptamer mit Affinitäten erkannt werden, die signifikant höher sind, als die unspezifischen Interaktionen zwischen einem professionellen, RNA-bindenden Protein und einer Nukleinsäure. Dies eröffnet die hoch interessante Möglichkeit, Aptamere generell anzuwenden, sogar wenn sie ihre Zielmoleküle mit relativ niedriger Affinität binden. iii) Es wurde zu ersten mal gezeigt, dass funktionale Nukleinsäureliganden in zellulären Subkompartimenten wirken können, in denen Nukleinsäuren normalerweise nicht vorkommen. In diesem speziellen Fall findet das Aptamer sein Zielmolekül, obwohl es sogar in der negativ geladenen Plasmamembran inklusive dessen kompakten zytoskelettalen Proteinkortex verankert ist. Es konnte im Voraus nicht erwartet werden, dass das Zielmolekül für das Aptamer an diesen Stellen zugänglich sein würde.

f) die Bindungsstelle an die zytoplasmatische Domäne von LFA-1 (CD18cyt) für das Aptamer unter Verwendung synthetischer Peptide, die überlappende Regionen der zytoplasmatischen Domäne von LFA-1 enthalten, zu entschlüsseln. Dadurch wurde die Aptamerbindungsstelle auf CD18cyt als funktional wichtig für die stimulierte Zelladhäsion von LFA-1 an ICAM-1 bestimmt.

[0055] Das meiste unseres derzeitigen Wissens über die Faktoren und Mechanismen, welche die Integrinaktivierung kontrollieren, stammt bis heute von Mutationsanalysen der Integrindomänen. Diese Studie zeigt, dass es nunmehr möglich ist, dieses Thema unter Erhaltung der genetischen Integrität der Wildtyp-CD18-Domäne zu adressieren. Zum ersten Mal wurde gezeigt, dass die intrazelluläre Expression von CD18cyt-spezifischen Aptameren den funktionalen Zustand endogener LFA-1-Moleküle beeinflussen kann. Des weiteren wird der Nachweis erbracht, dass diese „Intramere“ auf eine spezifische Subdomäne des zytoplasmatischen $\beta 2$ -Rest abzielen, wodurch die Wichtigkeit dieser Region für die korrekte Funktion des endogenen LFA-1-Rezeptors hinsichtlich seiner Adhäsion an ICAM-1 nahegelegt wird.

[0056] Der gegenwärtige Stand der Technik ist in der Lage, Nukleinsäureliganden hervorzubringen, die beinahe jedes gegebene Zielmolekül mit hoher Affinität und Spezifität binden. Die Ausweitung auf die Automatisierung der Selektionsprozeduren dürfte die Herstellung solcher Verbindungen sogar beschleunigen. Obwohl der Prozess der in vitro Selektion von Nukleinsäureaptameren derzeit weitgehend manuell bewerkstelligt wird, ist von dem ersten voll automatisierten Selektionsprotokoll berichtet worden und es kann vermutet werden, dass es in Zukunft möglich sein wird, Hunderte Nukleinsäureliganden innerhalb von wenigen Tage zu isolieren, was den Prozess viel effizienter machen würde, als Verbindungsbibliotheken kleiner Moleküle nach möglichen Effektoren zu durchsuchen (vergleiche Cox. et al., Biotechnol. Prog. 14 (1998), 845–50).

[0057] Die oben beschriebene Methode wendet diese spezifischen Nukleinsäuremodulatoren an, um die Rolle einer intrazellulären Komponente in dem komplexen, intrazellulären, regulatorischen Netzwerk zu bestimmen oder herauszufinden, ob es der kausale Grund für einen gegebenen Phänotyp ist. Des weiteren ist es ein leistungsfähiges System, das die Validierung potentieller Medikamentenzielmoleküle ermöglicht.

[0058] Die intrazelluläre Anwendung von funktionalen Nukleinsäureliganden kann leicht erreicht werden. In Abhängigkeit von der Eignung und den Fragestellungen kann die funktionale Nukleinsäure entweder endogen oder exogen verabreicht werden. In letzterem Fall werden bevorzugt chemisch modifizierte Formen angewendet, die den Abbau der funktionalen Nukleinsäure verhindern. Stabilisierende Modifizierungen umfassen beispielsweise RNA-Moleküle, in denen die 2'-Hydroxy-Funktion der Pyrimidinbasen durch 2'-Amino- oder 2'-Fluoro-Reste ersetzt ist. Endogene Transkriptionssysteme, wie zum Beispiel das in Beispiel 1 beschriebene, ermöglichen die effiziente intrazelluläre Expression funktionaler Nukleinsäuren. In Abhängigkeit von der Anwendung und der Wirkungsstelle werden geeignete Vektoren und Promotoren gewählt, welche dem Fachmann bekannt sind. Die funktionalen Nukleinsäuren können mit zusätzlichen Nukleinsäuredomänen konstruiert werden um die korrekte Faltung und Lokalisierung sicherzustellen.

[0059] In einem zweiten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren für die Expression von randomisierten Nukleinsäurebibliotheken in Zellen für die Identifizierung von funktionalen Intrameren, die den Phänotyp der Zelle ändern, in der sie exprimiert werden. Dass dies möglich ist, ist eine direkte Konsequenz der Wirksamkeit des oben beschriebenen Systems. Dieser Zielmolekül-Identifizierungsansatz ist nützlich bei der direkten Identifizierung einer zellulären Komponente als für einen besonderen Phänotyp wichtig oder als daran beteiligt, wie beispielsweise ein bestimmter Zustand, der mit einer Erkrankung verbunden ist. Auf der Grundlage des derzeitigen Wissens kann abgeschätzt werden, dass eine Nukleinsäurebibliothek, die in Zellen exprimiert wird, einzelne funktionale Nukleinsäuren enthält, die in der Lage sind, spezifisch eine zelluläre Komponente zu erkennen. Auf der Grundlage dieser Feststellungen, die im ersten Teil dieser Erfindung beschrieben worden sind, kann auch erwartet werden, dass dieses spezifische Erkennen beibehalten wird oder allgemein innerhalb des zellulären Kompartiments möglich ist. Zum Beispiel sollte die Bibliothek Moleküle enthalten, die in der Lage sind, Aktivatoren oder Inhibitoren von Signaltransduktionswegen zu binden oder zu modifizieren, wodurch der

Phänotyp moduliert wird, der mit der Kaskade verbunden ist. In einem derartigen Fall kann die Zelle, die die funktionale Nukleinsäure enthält, durch phänotypische Selektion (siehe Definition oben) isoliert werden. Sofern eine klare Abtrennung auf der Grundlage des geänderten Phänotyps nicht möglich oder schwierig ist, können Reporter-Konstrukte verwendet werden, die eine genauere oder bessere Unterscheidung erlauben. Dies kann erreicht werden ohne vorherige Kenntnis der Natur des Zielmoleküls oder seiner biologischen Funktion. Somit ist der erste Schritt dieses Verfahrens die phänotypische Selektion. Die Nukleinsäurebibliothek wird in die Zelle beispielsweise mittels Expressionsvektoren eingeführt. Eine phänotypische Selektion kann dann bevorzugterweise mittels Reporterkonstrukte durch entweder positive oder negative Selektion erreicht werden. Positive phänotypische Selektion könnte, beispielsweise, durch Expression eines geeigneten Zelloberflächenmarkers und nachfolgender Affinitätsisolierung der Zelle mit einem Oberflächenmarkerspezifischen Antikörper erfolgen. Negative phänotypische Selektion kann erfolgen mittels der Expression eines Toxins (wie beispielsweise des Diphtherie-Toxins oder Herpes simplex-Virus-Thymidin-Kinase) unter der Kontrolle eines induzierbaren zellulären Promotors. Diese Genkonstrukte können in Zellen beispielsweise durch Plasmide eingeführt werden und die Expression der Toxin-Gene wird durch die natürliche Promotor-induzierende Maschinerie der Zelle angetrieben werden. Nur bei jenen Zellen, in denen eine funktionale Nukleinsäure die Induktion des Toxin-Promotors inhibiert wird, wird das Toxin nicht exprimiert werden und die Zellen überleben und können selektiert werden. Nach der Anreicherung des selektierten Phänotyps werden die funktionalen Nukleinsäuremodulatoren durch Sequenzieren identifiziert und einzeln hinsichtlich ihrer Funktionalität getestet. Nachdem die funktionale Nukleinsäure identifiziert und hergestellt worden ist, kann sie wiederum verwendet werden, um ihren intrazellulären Wechselwirkungspartner zu identifizieren. Dies kann, beispielsweise, durch Standardverfahren zur Untersuchung von Protein/Nukleinsäure-Wechselwirkungen erreicht werden, wie beispielsweise das Screenen von Proteinen, die von cDNA-Bibliotheken gemäß dem Hefe-Drei-Hybrid-System exprimiert werden, um RNA/Protein-Wechselwirkungen in vivo nachzuweisen (siehe: SenGupta et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 93 (1996), 8496–8501). Bevorzugterweise erfolgt die Identifizierung mittels Komplementierung in homologen Zellen. Durch Expression von cDNA-Bibliotheken in homologen Zellsystemen können Klone isoliert werden, die die Signaltransduktionskaskade komplementieren, die durch die funktionale Nukleinsäure moduliert worden ist. Zur gleichen Zeit können Reportersysteme in Zellen konstruiert werden, bei denen die Aptamer/Zielmolekül-Wechselwirkung durch Systeme bestätigt wurde, wie beispielsweise das Drei-Hybrid-System (siehe: SenGupta et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 93 (1996), 8496–8501) oder den in Beispiel 2 beschriebenen Ansatz (siehe unten) für die positive Selektion, die negatives Selektionskorrekturlesen umfasst. Dies liefert ein zweifaches Ablesergebnis für die verlässliche Identifizierung jener Proteine, die eine Schlüsselrolle für einen bestimmten Phänotypen in einem Wildtyp-Kontext spielen.

[0060] Zusätzlich identifizieren die phänotypischen Selektionssysteme auch Nukleinsäureinhibitoren, die einfach für die Targetvalidierung verwendet werden könnten (siehe erster Teil dieser Erfindung). Dieses Verfahren liefert somit einen erheblichen Beitrag für das Gebiet des functional genomics/proteomics, da es Zielmoleküle direkt in einem unveränderten zellulären Status durch ihre Funktion und nicht ihre Gene oder das Vorhandensein in einer Zelle identifiziert. Deshalb ist das Verfahren der vorliegenden Erfindung dem Stand der Technik überlegen.

[0061] Die identifizierten funktionalen Nukleinsäuren können als Wirkstoff-Leads dienen oder können selbst als Therapeutika verwendet werden, insbesondere bei gentherapeutischen Ansätzen, oder in einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die eine funktionale Nukleinsäure umfasst, die durch die Verfahren der vorliegenden Erfindung identifiziert worden und die in der Lage ist, an funktionale intrazelluläre Zielmoleküle zu binden und deren Funktion zu modifizieren, optional in Kombination mit einem geeigneten pharmazeutischen Träger.

[0062] Beispiele für geeignete pharmazeutische Träger sind in der Technik gut bekannt und umfassen Phosphat-gepufferte Salinellösungen, Wasser, Emulsionen, wie beispielsweise Öl/Wasser-Emulsionen, verschiedene Arten von Benetzungsmitteln, sterile Lösungen etc. Derartige Träger können durch herkömmliche Verfahren formuliert und können einem Lebewesen in einer geeigneten Dosis verabreicht werden. Die Verabreichung von geeigneten Zusammensetzungen kann auf verschiedenen Wegen erfolgen, beispielsweise durch intravenöse, intraperitoneale, subkutane, intramuskuläre, topische oder intradermale Verabreichung. Der Verabreichungsweg hängt natürlich von der Art der Erkrankung und der Art der in der pharmazeutischen Zusammensetzung enthaltenen Verbindung ab. Das Dosierungsregime wird durch den behandelnden Arzt oder durch andere klinische Faktoren bestimmt. Wie in der Medizin gut bekannt, hängt die Dosierung für einen Patienten von vielen Faktoren ab, einschließlich der Größe des Patienten, der Körperoberfläche, des Alters, des Geschlechts, der speziell zu verabreichenden Verbindung, der Zeit und Art der Verabreichung, der Art der Erkrankung, des allgemeinen Gesundheitszustandes und anderen gleichzeitig verabreichten pharmazeutischen Wirkstoffen.

[0063] Bevorzugterweise wird die funktionale Nukleinsäure (z. B. Intramer) direkt an die Zielstelle, beispielsweise durch biolistische Abgabe, wie beispielsweise ein kolloidales Dispersionssystem, oder durch Katheter an eine Stelle in einer Arterie verabreicht. Die kolloidalen Dispersionssysteme, die zur Abgabe der pharmazeutischen Zusammensetzung verwendet werden können, umfassen Makromolekülkomplexe, Nanokapseln, Mikrosphären, Kügelchen und Lipid-basierte Systeme einschließlich Öl-in-Wasser-Emulsionen, (gemischte) Mizellen, Liposomen und Lipoplexe. Das bevorzugte kolloidale System ist ein Liposom.

[0064] Die Zusammensetzung des Liposoms ist gewöhnlicherweise eine Kombination aus Phospholipiden und Steroiden, insbesondere Cholesterin. Der Fachmann ist in der Lage, derartige Liposomen auszuwählen, die für die Abgabe des erwünschten Nukleinsäuremoleküls geeignet sind. Organspezifische oder Zell-spezifische Liposomen können verwendet werden, um eine Abgabe nur an der erwünschten Stelle zu erreichen. Das Targetieren von Liposomen kann von den Fachleuten durchgeführt werden, indem allgemein bekannte Verfahren angewendet werden. Dieses Targetieren umfasst passives Targetieren (unter Verwendung der natürlichen Tendenz der Liposomen, sich auf Zellen des RES in Organen zu verteilen, die sinusoidale Kapillaren enthalten) oder aktives Targetieren (z. B. durch das Koppeln der Liposomen mit einem spezifischen Liganden, z. B. einem Antikörper, einem Rezeptor, Zucker, Glykolipid, Protein etc., durch gut bekannte Verfahren). Bei der vorliegenden Erfindung werden monoklonale Antikörper bevorzugterweise verwendet, um Liposomen an spezifische Stellen vermittelt spezifischer Zell-Oberflächenliganden zu targetieren.

[0065] In einer noch bevorzugteren Ausführungsform ist das funktionale Nukleinsäuremolekül (z. B. Intramer) in einen rekombinanten Vektor integriert, bevorzugterweise einen Expressionsvektor. Um die Expression nur in dem Zielorgan zu erreichen, wird das funktionale Nukleinsäuremolekül, das DNA codiert, funktionsfähig mit einem Gewebe-spezifischen Promotor verbunden und für die Gentherapie verwendet. Zum Beispiel kann es mit dem CD4-Gen-Promotor (Zhao-Emonet et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 1442 (1998), 109–119), sekretorischen Leukoprotease-Inhibitorgen-Promotor (Robertson et al., *Cancer Gene Ther.* 5 (1998), 331–336) oder dem karzinoembryonalen Antigen-Promotor (Fichera et al., *Dis. Colon. Rectum.* 41 (1998), 747–754) verbunden sein. Andere Gewebe-spezifische Promotoren sind den Fachleuten auf dem Gebiet gut bekannt.

[0066] Bevorzugte rekombinante Vektoren sind virale Vektoren, beispielsweise Adenovirus, Herpesvirus, Vakzinia oder bevorzugterweise ein RNA-Virus, wie beispielsweise ein Retrovirus. Noch bevorzugter ist der retrovirale Vektor ein Derivat eines murinen oder eines Vogel-Retrovirus. Beispiele für derartige retrovirale Vektoren, die bei der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, sind murines Moloney-Leukämie-Virus (MoMuLV), murines Harvey-Sarkom-Virus (HaMuSV), murines Säugetiervirus (MuMtV) und Rous-Sarkoma-Virus (RSF). Am bevorzugtesten wird ein nicht humaner retroviraler Primatenvektor verwendet, wie beispielsweise der Gibbon Ape Leukemia Virus (GaLV), der einen breiteren Wirtsbereich bereitstellt verglichen mit murinen Vektoren. Da rekombinante Retroviren defekt sind, ist eine Unterstützung erforderlich, um infektiöse Partikel zu produzieren. Eine derartige Unterstützung kann, beispielsweise, durch Verwendung von Helferzelllinien bereitgestellt werden, die Plasmide enthalten, die alle Strukturgene des Retrovirus unter der Kontrolle von regulatorischen Sequenzen innerhalb des LTR enthalten. Geeignete Helferzelllinien sind den Fachleuten auf dem Gebiet gut bekannt. Diese Vektoren können zusätzlich ein Gen enthalten, das für einen selektierbaren Marker codiert, so dass die transduzierten Zellen identifiziert werden können. Darüber hinaus können die retroviralen Vektoren so modifiziert sein, dass sie Target-spezifisch werden. Dies kann, beispielsweise, erreicht werden, indem ein Polynukleotid eingeführt wird, das für einen Zucker, ein Glykolipid oder ein Protein, bevorzugterweise einen Antikörper, codiert. Die Fachleute kennen zusätzliche Verfahren zum Erzeugen von Ziel-spezifischen Vektoren. Weitere geeignete Vektoren und Verfahren für in vitro- oder in vivo-Gentherapie sind in der Literatur beschrieben und sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt; siehe, beispielsweise, WO 94/29469 oder WO 97/00957.

[0067] Eine pharmazeutische Zusammensetzung kann eine Verbindung enthalten, die die gleiche oder sogar eine verglichen mit der ursprünglichen funktionalen Nukleinsäure (Intramer) erhöhte Wirkung aufweist, die durch die Verfahren der vorliegenden Erfindung identifiziert wurde. Eine Strategie zur Erhöhung der Stabilität und der Verbesserung der Bindungsspezifitäten der funktionalen Nukleinsäuren, die durch die Verfahren hierin identifiziert worden sind, ist als post-SELEX-Modifikation oder Entwicklung von post-SELEX-modifizierten Aptameren (Eaton, *Cur. Opin. Chem. Biol.* 1 (1997), 10–16) beschrieben worden. Nach der Identifizierung der funktionalen Nukleinsäure wird eine zweite Nukleinsäurebibliothek von der Elternsequenz durch kombinatorische chemische Synthese und zufälligen Einbau von modifizierten Nukleosiden abgeleitet. Z. B. könnten die Purin-Reste mit Mischungen aus 2'-OH- und 2'-O-Methyl-substituierten Nukleosidphosphoramiditen synthetisiert werden. Die Verhältnisse können variiert werden und werden von der erwünschten Anwendung abhängen. Modifizierte Nukleoside, die in der chemischen Synthese enthalten sein können, sind den Fachleuten auf dem Gebiet ebenso bekannt und schließen, beispielsweise, Modifikationen an der 5'-Position von Pyrimidinen,

8'-Position von Purinen oder der 2'-Position von allen Nukleotiden ein. Modifikationen schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf Vinyl-, Prenyl-, Fukose-, Biotin- oder Arginin-Gruppen, die den Nukleinsäuren zusätzliche chemische Eigenschaften verleihen. In einem zweiten SELEX-Experiment wird die modifizierte zweite Bibliothek mit dem Liganden in Kontakt gebracht und jene Klon identifiziert, die die gleichen oder verbesserte Bindungseigenschaften verglichen mit der Ausgangssequenz aufweisen. Die Identifizierung der modifizierten Positionen in den gewinnenden Oligonukleotiden kann erreicht werden, beispielsweise, durch alkalische Hydrolyseinterferenzexperimente, da die 2'-O-Methyl-Substitutionen die benachbarte Phosphodiesterbindung gegenüber alkalischer Hydrolyse schützen. Unter Verwendung dieses Verfahrens sind Sekundäraptamere gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) identifiziert worden, die VEGF mit einer 17-fach erhöhten Affinität binden, wahrscheinlich infolge zusätzlicher hydrophober Kontakte, die durch Dimethylsubstitutionen vermittelt werden, und eine 8-fach erhöhte Stabilität gegenüber Abbau ($t_{1/2} = 171$ h) in unverdünntem Rattenurin (Green et al., *Cur. Biol.* 2 (1995), 683–695) aufweisen. Die solchermaßen erhöhte Wirksamkeit (z. B. bessere Affinitäten oder bessere zelluläre Aufnahme) kann den Nukleinsäuren durch chemische Substitution zugefügt werden und die stabilisierten Formen könnten für die exogene Abgabe der funktionalen Nukleinsäuren als pharmazeutische Formulierungen nützlich sein, was die Notwendigkeit beseitigen würde, die Gene für die funktionalen Nukleinsäuren in die Zielzellen einzuführen.

[0068] Darüber hinaus könnten die funktionalen Nukleinsäuren als funktionale Leads verwendet werden, um Bibliotheken kleiner Moleküle auf neue Wirkstoffe zu screenen. Wenn beispielsweise die funktionale Nukleinsäure als ein Inhibitor für ein Enzym durch die Bindung der aktiven Stelle wirkt, kann diese Wechselwirkung verwendet werden, um auf kleine Moleküle zu screenen, die an der gleichen Stelle binden und als ein Mimetikum der funktionalen Nukleinsäure wirken. Ein weiteres Binden an die selbe Stelle legt nahe, dass das Molekül in der gleichen Art und Weise wie die funktionale Nukleinsäure wirken kann, nämlich durch Inhibieren der Enzymfunktion. Diese Mimetika aus kleinen Moleküle könnten, beispielsweise, identifiziert werden durch Variation des Drei-Hybrid-Systems und des reversen Zwei-Hybrid-Systems. Wie in dem Zielidentifizierungsverfahren beschrieben, bilden in dem Drei-Hybrid-System zwei Hybrid-Proteine und eine Hybrid-RNA einen Komplex und aktivieren Gentranskription in Hefe. In dem reverse Zwei-Hybrid-System, das von Leanna und Hannik, *Nucleic Acid Res.* 24 (1996), 3341–3347, vorgestellt worden ist, wird das Reporter-gen CHY2 die Aktivierung der Transkription transkribiert, die durch die Wechselwirkung der zwei Hybrid-Proteine vermittelt wird. Dies führt zum Zelltod von Hefezellen in Gegenwart von Cycloheximid. In einem Drei-Hybrid-System mit ähnlichen Reporter-konstruktionen, die für die Wechselwirkung der funktionalen Nukleinsäure und in diesem Beispiel nur dem Ziel-enzym konstruiert sind, wird die Inhibierung der Anordnung der drei Hybridkomponenten das Überleben der Zelle fördern. Entsprechend kann dieser Test verwendet werden, um Bibliotheken aus kleinen Molekülen auf Mimetika zu screenen, die mit der funktionalen Nukleinsäure um die Bindung an dem Zielenzym im Wettbewerb stehen und deshalb die Bildung des transkriptionsaktivierenden Komplexes verhindern. Diese Verbindungen können weiter auf ihre Fähigkeit getestet werden, das Enzym funktional zu inhibieren und können als Wirkstoffe oder Wirkstoff-Leads dienen.

[0069] Die funktionalen Nukleinsäuren der Erfindung oder die oben beschriebenen Verbindungen sind besonders nützlich für die Herstellung eines Medikaments für die Gentherapie. Sie könnten neben anderen Beispielen für die Behandlung von Erkrankungen verwendet werden, von denen vorgeschlagen wurde, dass sie Ziele für die Anwendung von intrazellulären Antikörpern wären, beispielsweise HIV-Infektionen (Chen et al., *Human Gene Ther.* 5 (1994), 595–601) oder Leukämien, Brust- und Ovarialkarzinoma (Richardson und Marasco, *Tibtech* 13 (1995), 306–310).

[0070] Schließlich können die funktionalen Nukleinsäuren, die durch das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung identifiziert worden sind, in einem Kit für die Diagnose von Erkrankungen enthalten sein, die mit einem speziellen intrazellulären Ziel, wie oben diskutiert, verbunden sind. Ein derartiger Kit kann verwendet werden, um zu bestimmen, ob dieses Ziel vorhanden ist, eine anormale Konzentration etc. aufweist.

Beispiel 1: Cytoplasmatische RNA-Modulatoren einer inside-out Signaltransduktionskaskade

(a) In vitro Selektion von CD18-bindenden RNA Aptameren

[0071] Eine RNA Bibliothek mit einer Komplexität von 5×10^{14} unterschiedlichen Molekülen wurde synthetisiert durch in vitro T7-Transkription von dem PCR-amplifizierten DNA Pool MF76.1: 5'-TCTAATACGACTCACA-TATAGGGCGCTA AGTCCTCGCTCA-N40-ACGCGCGACTCGGATCCT-3'; Primer MF39.1: 5'-TCTAATACGACTCACTATAGGGCGCTAA GTCCTCGCTCA-3' (kursiv: T7-Promotor, fett: BamHI Restriktionsschnittstelle); Primer Mic20.1: 5'-GTAGGATTCGAGTCGCGCGT-3' (fett: BamHI Restriktionsschnittstelle) wie zuvor beschrieben (Klug et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997), 6676–6681). CNBr-aktivierte Sepharose wurde

mit synthetischen Peptiden derivatisiert (CD18cyt, MF2G) oder mit Tris-HCl (pH 8.0) alleine geblockt, gemäß dem Protokoll des Herstellers (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden). Für die Präselektion wurden entweder 50–75 µl Tris-blockierte oder MF2G-derivatisierte Sepharose mit 2–3 nmol ^{32}P -markierter RNA in 150 µl Bindungspuffer (Puffer B: 4,3 mM K_2HPO_4 , 1,4 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 1,0 mM MgCl_2 , 0,1 µM CaCl_2) für 1 h bei 23° C inkubiert. Die Aufschlammung wurde in eine Plastiksäule überführt und in kleinen Fraktionen (75 µl) mit Puffer B eluiert. Für die eigentliche Selektion wurden die initialen vier Fraktionen gefällt und mit 25–50 µl CD18cyt-Sepharose (4,5 mg/ml Gel) in 100 µl Puffer B für 1 h bei 23° C inkubiert. Die Entfernung von nicht-bindenden RNAs wurde erreicht durch Waschen mit 200 Sepharose-Volumen von Bindungspuffer (5–10 ml). Gebundene RNAs wurden durch Waschen mit auf 6M Guanidinium-HCl eingestellten Puffer B eluiert. Die eluierten Fraktionen wurden durch „Cherenkov-Zählung“ quantifiziert, mit Ethanol in Anwesenheit von 10–20 µg Glycogen gefällt und wie zuvor beschrieben revers transkribiert (Famulok, J. Am. Chem. Soc. 116 (1994), 1698–1706); die cDNA wurde PCR-amplifiziert, gefolgt von in vitro Transkription. Für den ersten Zyklus wurden 29 nmol RNA und 120 µl CD18cyt-Sepharose in einem Gesamtvolumen von 475 µl benutzt. Die RNA-Bibliothek wurde durch Bindung an ein auf einer Sepharosematrix immobilisiertes 46-mer Peptid, welches der kompletten zytoplasmatischen Domäne von CD18 (CD18cyt) entspricht, 11 Zyklen der in vitro Selektion unterworfen (Fig. 1A). Nach Zyklus 11 wurden bindende Sequenzen zur Einfügung einer PstI-Restriktionsschnittstelle mit den Primern Mic20.1 und SK40.4 (5'-TCTAATACGACTCACTATAGGGCTGCAGAGTCCTCGCTCA-3'; kursiv: T7-Promotor, fett: PstI-Restriktionsschnittstelle) PCR-amplifiziert, kloniert und sequenziert wie zuvor beschrieben (Famulok, J. Am. Chem. Soc. 116 (1994), 1698–1706). Vom angereicherten Pool wurden 80 Aptamere kloniert und sequenziert. Basierend auf Sequenzmotiven konnten diese Aptamere entweder in vier Klassen oder in verwaiste Sequenzen ohne jede offensichtliche Beziehung zueinander unterteilt werden.

(b) Konstruktion der zytoplasmatischen Antamer-Expressionskassette

[0072] Vier Sequenzen wurden für die zytoplasmatischen Expressionsstudien ausgewählt. Drei von ihnen, D20, D28, und D31 sind CD18-Binder, die vierte Sequenz, D42, ist eine nicht-bindende, negative Kontrollsequenz der selben Länge und mit Primerbindungsstellen identisch zu den spezifischen Aptameren (Fig. 1B). Zuerst wurde ein T7-RNA-Expressionskassettenvektor (TR) konstruiert, wo der T7 Promotor der Aptamer-codierenden DNA vorgeschaltet zwischen dem 5'- und 3'-„Stemloop“-Struktur lokalisiert ist, welche als RNA-stabilisierende Motive fungieren und für die Terminierung des T7-Transkripts benötigt werden (Fuerst and Moss, J. Mol. Biol. 206 (1989), 333–348) (Fig. 2A). Die Sequenz der T7-RNA Expressionskassette, TR, hier gezeigt ohne eingefügtes Aptamer (5'-GTTAACGCATGCTAATACGACTCACTATAG GGAGACCACAACGGTTTC-CCGGGCGCAAGTTACTAGT-TGGCCA-AGATCTTAATTAATAGCATAACCCCTTGGGG-CCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTGC TGTCGAC-GCGGCCGC-3'; fett: Restriktionsschnittstellen in der Reihenfolge in der sie auftreten HpaI, SphI, XmaI, SpeI, Ball, BglII, PaeI, SalI, NotI; Kursiv: T7-Promotor; unterstrichen: stabilisierender 5'-„Stemloop“ und 3'-Terminator T für korrekte Terminierung der TR-Aptamere) wurden eingefügt in den Vektor pTkg (Romeo und Seed, Cell 64 (1991), 1037–1046; Falkner und Moss, Virol. 62 (1988), 1849–1854) über HpaI- und NotI- Restriktionsschnittstellen, was in dem Transfer-TR-Vektor resultierte. Aptamer-kodierende Sequenzen wurden via XmaI und PaeI Restriktionsschnittstellen eingefügt (TR-Aptamer; zur Übersicht siehe Fig. 2A). Die resultierenden Transkripte werden TR-Aptamere genannt. Als Negativkontrolle wurde auch ein TR-Vektor, dem die Aptamersequenz fehlt, und einer, der die nicht-bindende negative Kontrollsequenz exprimiert, benutzt (TR-D42).

(c) In vitro Bindung von Aptameren und TR-Aptameren

[0073] In vitro Bindung an das CD18cyt-Peptid, immobilisiert auf einer Sepharose Matrix, wurde für mehrere Aptamere bestätigt (Fig. 1B). Hierfür wurde das zonale Elutions-, quantitative Affinitätschromatographie-Experiment verwendet wie in Dean et al., Affinity chromatography a practical approach (1991), pp 169–174, IRL Press, Oxford, UK beschrieben. Die Bindungsaffinität der monoklonalen Aptameren an das immobilisierte CD18cyt-Peptid betrug zwischen 500 und 6000 nM (Tabelle 1). Bindung von individuellen Aptameren an underivatisierte Sepharose wurde nicht beobachtet. Wichtigerweise wurde bestätigt, dass korrekt terminierte Aptamere das selbe in vitro Bindungsverhalten zum CD18cyt-Peptid zeigten, wenn sie im Kontext der flankierenden „Stemloop“-Strukturen exprimiert wurden. Jedoch zeigten nicht terminierte TR-Aptamere mit zusätzlichen 166 Basen nach dem Terminator T abgeleitet vom Transfer-TR-Vektor eine 2–3 fache Reduktion der Bindungsaffinität für CD18cyt. Vermutlich resultiert dieser Effekt aus der Beeinträchtigung der zusätzlichen Sequenz mit der korrekten Faltung der Aptamere. Diese Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist die Aptamere im Kontext von definierten, funktionellen Sequenzen zu platzieren, welche zusätzliche Funktionalitäten wie erhöhte Stabilität hinzufügen. Korrekte Terminierung ist ebenso notwendig, da die funktionellen Nukleinsäuren eine reduzierte Fähigkeit ihr Ziel zu binden zeigten, wenn zu umfangreiche zusätzliche Sequenzen in dem Molekül anwesend sind.

(d) Zytoplasmatische Expression der funktionalen Nukleinsäuren

[0074] Zytoplasmatische RNA-Expression beruht auf der Koinfektion der Zellen mit zwei rekombinanten Vaccinia Viren (Fuerst und Moss, J. Mol. Biol. 206 (1989), 333–348). Ein Virus, Vaccinia-T7 (vT7), kodiert für die Bakteriophage T7 RNA Polymerase; das andere, vTR-Aptamer, kodiert die Sequenz des TR-Aptamer und ist hergeleitet aus der homologe Rekombination zwischen Vaccinia Virus und dem TR-Aptamer Vektor. Die Vaccinia-Expressionskonstrukte (vTR-Aptamer) wurden hergeleitet über die Rekombination zwischen dem TR-Vektor und dem Wildtyp-Vaccinia-Virus (WR Stamm), hochtitrige Virus-Stocklösungen wurden wie beschrieben (Asubel et al. Current protocols in molecular biology (1987), Wiley, New York) hergestellt und Doppelinfektionen mit rekombinanten Vaccinia Viren und einem Vaccinia Virus kodierend für T7-RNA-Polymerase (vT7) wurden durchgeführt wie zuvor beschrieben (Kolanus et al., Cell 86 (1996), 233–242). In Kürze wurden 2×10^6 Zellen mittels Zentrifugation gesammelt, mit PBS gewaschen und in 300 µl RPMI-Medium resuspendiert. 100–150 µl von jedem Virus-Stock (MOI von ~10pfu/Zelle, beschallt für 10s) wurde zugegeben und für 2 h bei 37° C inkubiert, gefolgt von der Zugabe von 4 ml RPMI/10% Kälberserum und zusätzlicher Inkubation zwischen 1 bis 7 h.

[0075] Der Verlauf der RNA-Expression nach Koinfektion einer Jurkat E6-Zelllinie mit vT7 und vTR-D31 ist in [Fig. 2C](#) gezeigt. Maximalmengen an RNA werden 7 h nach Infektion erreicht, wie mittels „Dot-Blot“-Analyse unter Verwendung einer DNA-Hybridisierung-Probe komplementär zum 3'-Terminus der Aptamer-Expressionskassette quantifiziert wurde. Ungefähr 4×10^6 Jurkat E6-Zellen wurden mit Vaccinia Virus, welcher TR-Aptamer-RNA und T7-RNA-Polymerase exprimiert, infiziert. Die RNA wurde isoliert wie beschrieben (Asubel et al. Current protocols in molecular biology (1997), Wiley, New York) und auf eine Hybond N Membran (NEN Du Pont) als Punkt „geblottet“ gemäß dem Protokoll des Anbieters. Hybridisierung von virus-exprimierter RNA wurde für die Dauer von 1 h bei 55° C durch Inkubation von zellulärer RNA in Prä-Hybridisierungspuffer durchgeführt (5x SSC, 0,1% SDS, 5x Denhardt's Reagenz, 5% Dextransulfat, 100 µg/ml tRNA), gefolgt von Inkubation in Gegenwart von 20 pmol radioaktiv markierter Probe MicTR1/28.1 (5'-CAAAAACCCCTCAAGAC-CCGTTTAGAG-3') in einem Gesamtvolumen von 4.0 ml für 1 h. Die „Dot-Blots“ wurden dann bei 55° C für 30 min mit ~20 ml 2x SSC, 0,1% SDS (2x), 1x SSC, 0,1% SDS (2x) und 0,5x SSC, 0,1% (2x) gewaschen und durch Phosphor-Bildgebung quantifiziert. Die Analyse von allen TR-Transkripten in vivo bei diesem Peak ergab vergleichbare Aptamer-RNA-Niveaus von ungefähr 10^6 Kopien pro Zelle, jedoch nur in Anwesenheit von vT7 ([Fig. 2D](#)).

(e) Spezifität der TR-Aptamere gegenüber endogenem CD18/beta 2-Integrin

[0076] Bevor der biologische Effekt der TR-Aptamer-Expression untersucht wurde, musste bestätigt werden, dass die Aptamere ebenso in der Lage sind spezifisch an endogenes LFA-1 zu binden. Dies wurde gezeigt, indem radioaktiv markierte, in vitro vom TR-Aptamer Vektor transkribierte Aptamere mit zytoplasmatischem Rohlysat von Jurkat E6-Zellen inkubiert wurden und anschließender Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen. 4×10^7 Jurkat E6-Zellen wurden in 400 ml Lysepuffer (PBS, 0,5% Triton \times 100, 0,5 µg/ml Aprotinin, 0,5 µg/ml Leupeptin, 1mM PMSF, 1mM MgCl₂) lysiert und bei 0° C für die Dauer von 20 min inkubiert. Die Zellkerne wurden durch 10 min Zentrifugation bei 3000 g entfernt und der Überstand wurde durch 10 min Zentrifugation bei 10000 g geklärt. Zu 3 ml dieses Überstandes wurden 2 mg von gereinigtem monoklonalem Antikörper (MHM23, OKZ3) oder 2 ml Ascites-Flüssigkeit (MEM170) gegeben und auf 1x PBS in einem Gesamtvolumen von 7 µl eingestellt. Nach Inkubation bei 0° C für 2–3 h, wurden 5 µl PBS, das 3 mM DTT, 1 mM MgCl₂, 30 U Rnasin, 75–120 µM tRNA, 20% Glycerol und 7,5 mg BSA enthielt, zugegeben und für 15 min bei 0° C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 30–60 fmol 5'-³²P-markierte TR-Aptamere in 3 µl PBS, 1mM MgCl₂, für 30s auf 95° C erhitzt und für 10 min auf 23° C abgekühlt, zugegeben und bei 23° C für 30 min inkubiert. Das Lysat/Aptamer/Antikörper-Gemisch wurde auf ein natives, 2% Glycerin enthaltendes 4.5% Polyacrylamidgel geladen (Acryamid/Bis-Acrylamid 60:1) und bei 150 V für 2,5 h in 0,5 \times TAE Elektrophoresepuffer der Elektrophorese unterzogen.

[0077] Wie in [Fig. 3](#) in zwei stellvertretenden Experimenten gezeigt, ergab dies ein Muster von veränderten Banden, welche aptamer-spezifisch waren. Aptamer TR-D20 zeigte ein Bandenmuster mit signifikant reduzierter elektrophoretischer Mobilität ([Fig. 3A](#), Spuren 2, 4) im Vergleich zu Negativkontrollen der lysatfreien RNA (Spur 1) und nicht-bindendem TR-D42 (Spuren 3, 5) in Gegenwart eines 10^4 -fachen Überschusses an tRNA als nicht-spezifischem Kompetitor. Um zu testen, ob die „Shifts“ ebenso LFA-1 spezifisch waren, führten wir eine Über-„Shift“-Analyse mit den zwei unabhängigen, LFA-1 spezifischen Antikörpern MHM23 und MEM170 durch, welche entsprechend gegen die extrazelluläre Domäne der β - und α -Untereinheiten von LFA-1 gerichtet waren und dem Antikörper OKT3 als Negativkontrolle, welcher die ϵ -Kette des T-Zell-Antigenrezeptors erkennt. Die Zugabe sowohl von entweder MHM23 oder MEM170 (Spuren 6, 7) resultierte in einer überverän-

derden Bande. In [Fig. 3B](#) zeigen wieder beide LFA-1-spezifischen Antikörper MHM23 und MEM170 ([Fig. 3B](#), Spuren 3, 5) die überveränderten Banden, während mit dem nicht-verwandten Antikörper OKT3 kein Über-„Shift“ erhalten wurde (Spur 6). Die Experimente, welche in den Spuren 4 und 7 gezeigt werden, weisen nach, dass das Aptamer TR-D20 keine direkte Affinität entweder gegenüber dem spezifischen Antikörper MHM23 oder zu dem unspezifischen Antikörper OKT3 aufweist. Wenn das in Spur 2 gezeigten Gel-„Shift“-Experimente in Gegenwart von 2 mM unmarkiertem Aptamer TR-D20 als spezifischer Kompetitor wiederholt wurde, bewegte sich die gesamte TR-D20 RNA auf dem Niveau von ungebundener RNA (Daten nicht gezeigt). Analoge Resultate wurden mit TR-D28 und TR-D31 erhalten, was zeigt, dass die Aptamere endogenes CD 18 in Zellrohlysaten mit bemerkenswerter Spezifität erkennen.

(f) Bestimmung der Bindungsstelle der TR-Aptamere an der intrazellulären Domäne von CD18

[0078] Zur Bestimmung der Bindungsstelle der Aptamers auf CD18cyt wurden Gel-„Shift“-Experimente mit drei synthetischen CD18cyt Peptidfragmenten durchgeführt ([Fig. 5](#)). Gel-„Shifts“ unter Einsatz der synthetischen, biotinylierten Peptide wurden wie folgt durchgeführt: 5 µl von 3 nM radioaktiv markierter Aptamer-RNA in PBS pH7,4 wurden für 30 s auf 95° C erhitzt und für 10 min bei 23° C renaturiert. Die biotinylierten Peptide wurden mit 2 mg/ml Streptavidin in 20 mM Tris-HCl pH 7.4 in einem Gesamtvolumen von 6 µl inkubiert. Zu dieser Lösung wurde ein Prämix gegeben um die Konzentrationen im finalen 20 µl Reaktionsvolumen auf 1 × PBS, 1 mM DTT, 1 mM MgCl₂, 7,5 % Glycerin, 2,5 mg/ml BSA, 40 µM tRNA, 2 U/ml RNasin einzustellen und für 20 min bei 23° C vorinkubiert. Die Aptamerlösung (5 µl) wurde zugegeben, 20 min bei 23° C inkubiert und auf einem nativen 6% Polyacrylamidgel wie oben beschrieben einer Gelelektrophorese unterzogen.

[0079] Bindung an die Carboxy-terminale Hälfte von CD18cyt (Peptid A23) wurde bei keinem der Aptamere beobachtet, jedoch banden TR-D20, TR-D28 und schwächer TR-D31 alle sowohl an das N-terminale Peptid B 16 und den mittleren Teil C17. B16 und C17 überlappen um 8 Aminosäuren inklusive einer Anhäufung von drei basischen Argininresten. Das diese hoch positiv geladene Anhäufung von den Aptameren als Bindungsstelle auf CD18cyt ausgewählt wurde ist nicht überraschend, da ein Aptamer ein stark negativ geladenes Molekül darstellt. Wie erwartet zeigte die Negativkontrolle Aptamer TR-D42 keine Bindung an jedes der drei Fragmente, was bestätigte, dass die Peptidfragmenterkennung aptamer-spezifisch ist.

(g) Effekte der intrazellulären TR-Aptamere auf die integrin-vermittelte zelluläre Adhäsion an das interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM1)

[0080] Um zu überprüfen, ob die zytoplasmatische Expression von CD18-spezifischen Aptameren einen Effekt auf die biologische Aktivität dieses Integrins hat, wurden Adhäsionsexperimente mit Jurkat E6-Zellen oder mit peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) durchgeführt (Coligan et al., (1994) Current protocols in immunology (John Wiley & Sons, New York). Die Zellen wurden mit Vaccinia Viren, die CD18-spezifischen Aptamere oder unterschiedlichen Kontrollsequenzen kodierenden, infiziert und die Bindung dieser Zellen an einen wichtigen Liganden von LFA-1, das ICAM-1-Molekül, wurde in vitro festgestellt. Dieses System hat einen zussätzlichen Kontrolllevel, da bekannt war, dass die TR-Aptamer-Expression gänzlich von der Ko-Infektion von Zellen mit einer Virus exprimierenden T7-Polymerase abhängig ist ([Fig. 2D](#)). Das ICAM-1-RG Fusionsprotein wurde in COS Zellen exprimiert, von Kulturüberständen durch Protein A-Sepharose gereinigt, eluiert, in PBS resuspendiert und, wie beschrieben, auf Plastikschalen beschichtet (Kolanus et al., Cell 86 (1996), 233–242). 2 × 10⁶ Jurkat oder PBM-Zellen wurden mit rekombinanten Vaccinia Viren infiziert und für 4–8 h bei 37° C inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in RPMI-Medium resuspendiert und für 5 min bei 37° C mit oder ohne den Zusatz von 40 ng/ml PMA inkubiert. Den Zellen wurde anschließend für 10 min bei 37°C ermöglicht an die ICAM-1-Rg beschichteten Schalen zu adhären und der gebundene Anteil wurde mit Hilfe eines Fadenkreuzokulars bestimmt. [Fig. 4A](#) zeigt, dass infizierte Jurkat E6-Zellen eine bemerkenswerte Hintergrundbindung an ICAM-1 zeigten, aber dies war nichtsdestotrotz überinduzierbar durch Phorbol-12-Myristate-13-Acetat (PMA), einem wohl bekannten Förderer von LFA-1-vermittelter Leukozytenadhäsion (Lub et al., Immunol. Today 16 (1995), 479–483). Bemerkenswerterweise resultierte die Expression des TR-D20 Aptamers in Jurkat Zellen in einer fast vollständigen Blockade der induzierbaren Adhäsion, wohingegen der TR ohne Insert und Einzelinfektionen mit Wildtyp-Vaccinia Virus (wt), vT7 oder vTR-D20 nahezu keinen Effekt hatten.

[0081] Die Reproduzierbarkeit und die Erweiterung der Methode auf andere Systeme wurde mittels Durchführung von ähnlichen Studien mit humanen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) getestet. PBMC, die normalerweise schwer zu transfizieren sind, erwiesen sich als hervorragende Ziele für die durch rekombinante Vaccinia Viren vermittelte Genexpression. Eine durchflusszytometrische Analyse von mit Vaccinia exprimierten Kontrollproteinen, Derivaten von Subdomänen von Cytohesin-1, zeigt eindeutig, dass alle, Ig-Fusions-

proteine mit der Plextrin-Homologiedomäne (PH) von Cytohesin-1 (c-Ig-PH) und den PH+c-Domänen (clg-PH+c) oder der isolierter Ig-Anteil selbst (clg), auf gleich hohen Niveaus in humanen PBMC exprimiert wurden ([Fig. 4B](#)). Diese Kontrollen, die gewählt wurden, weil von dem zytoplasmatischen Cytohesin-1 vorher gezeigt werden konnte, dass es ein wichtiger Regulator der adhäsiven Funktion von beta 2-Integrinen ist (Kolanus et al., Cell 86 (1996), 233–242; Nagel et al., J. Biol. Chem. 273 (1998), 14853–14861; Nagel et al., Mol. Biol. Cell 9 (1998), 1981–1994), und die Aptamer-Viren wurden in Adhäsionsuntersuchungen wie oben beschrieben mit diesen Zellen getestet. Die PH+c-Domänen (clg-PH+c) von Cytohesin-1 hatten einen stark unterdrückenden Effekt auf die PMA-induzierbare Adhäsion, wohingegen beide, die isolierte PH-Domäne (clg-PH), die beträchtlich reduzierte Phospholipidbindung und Membranassoziation zeigt (Nagel et al., Mol. Biol. Cell 9 (1998), 1981–1994), oder das Kontrollprotein keinen Effekt hatten ([Fig. 4C](#)). Diese Ergebnisse stimmen mit veröffentlichten Daten überein, die in Jurkat E6-Zellen erhalten wurden (Nagel et al., J. Biol. Chem. 273 (1998), 14853–14861). Am wichtigsten zeigt [Fig. 4C](#) auch, dass die von dem TR-D20-Aptamer vermittelte Reduktion der PMA-induzierbaren Adhäsion in PBMC ähnlich zu der mit clg-Ph+c beobachteten ist, wohingegen die Negativkontrollsequenz TR-D42 keinen Effekt auf die beta 2-integrin-vermittelte Adhäsion an ICAM-1 hatte. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die adhäsive Funktion von LFA-1 durch die zytoplasmatische Expression eines Aptamers, das in vitro für Bindung an den zytoplasmatischen Teil des Rezeptors selektiert wurde, spezifisch in Jurkat E6 und PBM-Zellen reduziert wurde ([Fig. 4A](#), [Fig. 4C](#)) (Lub et al., Immunol. Today 16 (1995), 479–483).

Beispiel 2: Funktionale Zielmolekül-Identifizierung von intrazellulären Komponenten, die in die Induktion des IL2-Promotors involviert sind.

[0082] Beispiel 2 veranschaulicht ein positives Selektionsschema, das eine Korrektur durch negative Selektion einschließt um intrazelluläre Zielmoleküle zu isolieren, die an Signaltransduktionsereignissen teilnehmen, welche zur Induktion von Genen unter der Kontrolle des Interleukin-2-Promotors (IL-2 P) in T-Zellen führen. Nach Stimulierung des T-Zell-Rezeptors (TCR) werden Gene durch eine Signaltransduktionskaskade unter der Kontrolle des Interleukin-2-Promotors induziert. An der Signaltransduktionskaskade nehmen unter anderen Proteine teil wie zum Beispiel Proteinkinase C, Calcineurin, NF B usw. (vergleiche: Abbas et al. (Eds.), Cellular and molecular immunology 2nd ed. (1994), p. 162, W.B. Saunders Company). Die Blockade von Calcineurin durch immunsupprimierende Pharmazeutika wie zum Beispiel Cyclosporin A, FK 506 kann beispielsweise die Induktion des Promotors abschalten und folglich die Produktion zellulärer Zytokine. Dies wird in der Klinik genutzt um die Abstoßung von Organtransplantaten zu verhindern. Der IL-2-Promotor ist ein hervorragendes Modellsystem mit Calcineurin als einem Beispiel für klinisch relevante, funktionale Ziel- oder Schlüssel-moleküle, die identifiziert werden sollten.

a) Phänotypische Selektion

(1) Konstruktion der IL-2-Promotor Renorterzelllinie

[0083] Ein Reportergen, kodierend für ein Toxin (Herpes Simplex Virus Thymidin Kinase, HSV-TK) (Fife et al., Gene Ther. 5 (1998), 614–620) unter der Kontrolle des IL-2-Promotors ist in einen Vector geklont, der einen selektierbaren Marker (Aminoglycosid-Phosphotransesterferase, Neo) (Southern und Berg, J. Mol. Appl. Genet. 1 (1982), 327–341) enthält, der es erlaubt, diejenigen Zellen durch Detoxifikation der Aminoglycosid Antibiotica (Neomycin, G418) zu selektieren, welche die betreffenden Gene in ihren Chromosomen insertiert haben ([Fig. 1](#), Plasmid pP1). In T-Zellen eingeführt, wird der IL-2-Promotor nach Stimulation mit Phorbolestern oder durch den T-Zell-Rezeptor (TCR) induziert, und die Herpes Simplex Thymidin Kinase (HSV-TK) wird exprimiert. Die Zugabe von Ganciclovir bewirkt die Bildung von toxischen Verbindungen (z.B. Kanai et al., Cancer Res. 56 (1996), 1341–5) und nachfolgend den Zelltod.

[0084] Nach Transfektion einer Zelllinie (Jurkat E6 Zellen) und deren Kultivierung in Medium (RPMI, 10 % FCS, Gentamycin 50 µl/ml), welches (in Abhängigkeit von der minimalen letalen Konzentration für die verwendete Zelllinie) 0,1–1,5 mg/ml Neomycin enthält, sowie Isolierung von einzelnen Transfektanten werden die Zellen auf die Anwesenheit und Expression des Reportergens mittels Standardmethoden (z.B. Hybridisierung nach Northern, „Western Blotting“) untersucht.

(2) Konstruktion der RNA Expressionsvektoren

[0085] Eine Bibliothek einzelsträngiger DNA (ssDNA) wird z.B. durch Standard-Festphasensynthese synthetisiert, wobei die Region der Zufallsequenz von unveränderlichen Sequenzen, die als Primer-Hybridisierungsstellen dienen und Restriktionsschnittstellen für Endonukleasen zur Klonierung in die Expressionsvektoren ent-

halten, flankiert wird. Die doppelsträngige DNA (dsDNA) wird beispielsweise enzymatisch durch PCR oder Klenow-Protokolle hergestellt. Dies entspricht den Standardprotokollen zur Herstellung von Nukleinsäure-Bibliotheken für in vitro Selektionsexperimente (siehe z. B. Klug et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 94 (1997), 6676–81; Abelson, Methods in Enzymology 267 (1996), 275–81, Academic Press, San Diego).

[0086] Die Bibliothek der Zufallssequenzgene ist unter der Kontrolle eines RNA-Polymerase-III-Promotors (Pol III P) kloniert, welcher hohe Level an RNA-Expression erlaubt ([Fig. 6](#), Plasmid pP2). Zusätzlich ist die Bibliothek flankiert von konservierten Sequenzen, die in der Lage sind, eine Stammstruktur („Stern“) auszubilden, ähnlich der adenoviralen VAI-RNA endständigen Stammstruktur (VAI Zufallssequenz VAI) (Furtado et al., J. Virol. 63 (1989), 3423–3434). Die resultierenden RNA-Transkripte bestehen somit aus der folgenden Sequenz: 5'-GGGCACUCUCCGUG-N40-AACGGGGGAGCGCUCCUUUU-3', wobei „N40“ die vierzig aufeinanderfolgenden Zufallspositionen mit gleicher Stöchiometrie für alle vier Basen (A, C, G, U) repräsentiert. Es wurde vormals gezeigt, dass diese Konstrukte sehr effizient vom Zellkern in das Zytoplasma von eukaryotischen Zellen exportiert werden (Bertrand et al., Program & Abstracts RNA '98: The third annual meeting of the RNA Society 26. – 31.5.1998, University of Wisconsin, Madison). In dieser Ausführungsform wird der überwiegende.

[0087] Teil der RNA-Bibliothek in das Zytoplasma exportiert, wo sich die meisten Zielmoleküle befinden, die an der Induktion des IL-2-Promotors beteiligt sind.

[0088] Das Plasmid ([Fig. 6](#), Plasmid pP2) enthält zusätzlich einen selektierbaren Marker (Hygromycin; das Antibiotikum Hygromycin und Resistenzmarkergene sind käuflich und beschrieben, z.B. bei Invitrogen BV, Groningen, Niederlande) und Elemente für die episomale Replikation, um den Beibehalt des Plasmids sicherzustellen (OriP, EBNA1-Protein-Gen) (Yates et al., Nature 313 (1985), 812–815; Chittenden et al., J. Virol. 63 (1989), 3016–25). Dies könnte notwendig werden, wenn der Selektionsprozess über einen längeren Zeitraum andauert. Das Bibliotheksplasmid ist in die Reporterzelllinie transfiziert und der zeitliche Verlauf, die maximale RNA-Bibliotheksexpression und die RNA-Lokalisierung werden mit Hilfe von Standardtechniken, wie „Northern blots“ und in situ Hybridisierung bestimmt. In einem typischen Transfektionsexperiment werden 10^7 bis 10^8 Zellen durch Elektroporation oder Lipofektion transfiziert. RNA-Proben, die von transfizierten Zellen präpariert wurden, werden gemäß den in Beispiel 1 beschriebenen Methoden ((d) cytoplasmatische Expression von funktionalen Nukleinsäuren) isoliert und untersucht und alsdann mit einem radioaktiv-markierten „Antisense-Oligonukleotid“ (5'-AAAAGGAGCGCTCCCCCGTT-3') nachgewiesen. Die Untersuchung ergab Expression-Level von etwa 5×10^5 RNA-Kopien pro Zelle.

(3) Selektion

[0089] Nach Transfektion und Expression der RNA-Bibliothek werden die Reporterzellen (stabil transfizierte Jurkat-E6-Zellen) nun für den Phänotyp der inhibierten IL-2 Promotorinduktion selektiert. Die Zellen werden stimuliert mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) (50 ng/ml) (Kolanus et al., Cell 86 (1996), 233–242) und in der Anwesenheit von Ganciclovir (Obaru et al., Hum. Gene Ther. 7 (1996), 2203–08) inkubiert. Nur diejenigen Zellen, die eine funktionale Nukleinsäure aus der Bibliothek, welche die Induktion oder Expression des HSV-TK-Gens (siehe [Fig. 8](#): hemmendes Protein X der schematisch gezeichneten Signaltransduktionskaskade X, Y, Z) inhibiert, wird diese Selektion überleben. Die anderen Zellen werden absterben ([Fig. 7](#)). Um die Anreicherung von Zellen zu ermöglichen, kann die Stringenz der Selektion variiert werden, falls notwendig unter Verwendung von verschiedenen Konzentrationen an Ganciclovir und verschiedenen Inkubationszeiten oder wiederholten Zyklen von Stimulation und Inkubation mit dem Wirkstoff. Die verbleibenden Zellen können geerntet werden und die Plasmide, die das Gen für das inhibierende RNA-Molekül tragen, können zur Amplifikation in E.coli mit Hilfe „Hirt Supernatant Methode“ transfiziert werden. Die Zellen werden für 1–20 min. in 0,4 ml 0,6 % SDS, 10 mM EDTA aufgeschlossen. Die viskose Mischung wird mit einer Pipette in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 0,1 ml 5 M NaCl und Mischung werden die Proben für 5 Stunden auf Eis inkubiert. Nach 4 min. Zentrifugation wird der Überstand vorsichtig abgenommen, mit Phenol extrahiert und mit 10 µg linearem Polyacrylamid versetzt. Zweitens können alle funktionalen Nukleinsäuren eliminiert werden, die nur aufgrund der Inhibition des Toxins wirken und die Signaltransduktion nicht direkt beeinflussen.

(c) Identifizierung von funktionalen zellulären Zielmolekülen

(1) Konstruktion des Vektors für die Identifizierung des funktionalen Zielmoleküls:

[0090] Die wesentlichen funktionalen Elemente des geeigneten Plasmids sind in [Fig. 9](#) dargestellt.

Plasmid pF1:

– Promotor-Elemente:

CMV P: humaner Cytomegalovirus sehr früher ("immediate early") Promotor. Beispiel eines konstitutiven Promotors, der in einer Vielzahl von Zelltypen aktiv ist. In Abhängigkeit von Zelltyp, Anwendung etc. können andere häufig verwendete Promotoren oder Kombinationen von Promotorelementen (z.B. SV 40 früher Promotor, Rous Sarcoma Virus sehr früher Promotor etc.) benutzt werden (Spector et al., *Cell: A Laboratory Manual* (1998), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 67.2–67.3) IL-2 P: IL-2-Promotor.

– Episomale Replikation:

Der Ursprung der Replikation (OriP) und das nucleare Antigen (EBNA-1) des Epstein Barr Virus (EBV) ermöglichen die episomale Replikation (außerhalb des Chromosoms) in hoher Kopienzahl und Erhaltung in Primär- und Kanninchenzelllinien (Yates et al., *Nature* 63 (1989), 3016–25). Dies ist ein optionales Element, was es jedoch ermöglicht, die Selektion, wenn notwendig, über einen längeren Zeitraum fortzusetzen.

– cDNA-Bibliothek:

Die cDNA-Bibliothek in diesem Beispiel ist von T-Zellen abgeleitet. Die Bibliothek wird verwendet, um auf die Komplementierung der inhibierten Signaltransduktionskaskade zu selektieren. Die Überexpression des Faktors, der durch die funktionale Nukleinsäure inhibiert wird, sollte die Hemmung der Signalweiterleitung bewirken und der IL-2-Promotor sollte wieder in Zellen, die das betreffende Zielgen beinhalten, induziert werden. Die Konstruktion und Expression der cDNA-Bibliotheken ist dem Fachmann gut gekannt.

– fNS-hsv Thymidine-Kinase:

Dieses Konstrukt erlaubt die Identifizierung des Zielgenprodukts durch die Spezifität der Nukleinsäure-Protein-Interaktion. Das Gen der funktionalen Nukleinsäure (fNS) ist in die 5'-untranslatierte Führungssequenz („leader“) der Thymidin Kinase des Herpes Simplex Virus kloniert. Werstuck und Green konnten zeigen, dass Konstrukte, die Aptamersequenzen in der 5'-untranslatierten Führungssequenz enthalten, sehr nützlich für die Kontrolle der Genexpression sind (*Science* 282 (1998), 296–298). Infolge Bindung des Aptamer-Liganden (funktionale Nukleinsäure) ist die Expression wahrscheinlich aufgrund der Hemmung der Translation unterbunden.

– Selektierbare Marker:

Neo: gebräuchliches Resistenzgen (Aminoglycosid-Phosphotransesterferase), um mittels Detoxifikation der Aminoglycosid-Antibiotika Zellen zu selektieren, die das transfizierte Plasmid enthalten (Southern und Berg, *J. Mol. Appl. Genet.* 1 (1982), 327–341).

Plasmid pF2:

– Promotorelemente:

siehe pF1. Zusätzlich RNA-Polymerase-III-Promotor-(Pol III P)-VAI/fNS/VAI-Konstrukt. Dieses Konstrukt ermöglicht, wie im funktionalen Selektionsschritt beschrieben, die Transkription hoher Level und den Export von funktionalen Nukleinsäuren ins Cytoplasma.

– Episomale Replikation:

siehe pF1.

– Selektierbare Marker:

Die Resistenz gegenüber Hygromycin kann genutzt werden, um Zellen co-zuselektieren, die zwei Plasmide (z.B. ein zusätzliches Plasmid mit der Resistenz gegenüber Neo) beinhalten.

– mlg:

Dies ist ein Oberflächen-Marker, der die Affinitätsselektion von transformierten Zellen erlaubt. In diesem Beispiel sind die konstanten CH2- und CH3-Domänen von humanem IgG1 als Transmembranversion (mlg) exprimiert, was zu deren Präsentation an der Zelloberfläche führt. Die Zellen können beispielsweise mit Hilfe von immobilisierten, käuflichen Antikörpern (z.B. Affinipure Ziegen-Anti-humanIgG, Fc γ -Fragment, Dianova, Hamburg) isoliert werden. Fusionsproteine mit konstanten CH2- und CH3-Domänen von humanen Ig-Molekülen sind gut etablierte Techniken zur Expression von Proteinen (Kolanus, et al., *Cell* 86 (1996), 233–242).

(2) Der Selektionsprozess:

[0091] Nach Transformation der Plasmide pF1 und pF2 in eine T-Zelllinie (z.B. Jurkat-E6-Zellen) werden die Zellen in Gegenwart von Neomycin und Hygromycin co-selektiert. Die Pol-III-Transkripte der funktionalen Nukleinsäuren (fNS) werden die Signaltransduktionskaskade (schematische Proteine X, Y, Z) durch Bindung an das endogene Protein X hemmen. Die Überexpression der meisten Proteine (schematisch Protein M) aus der cDNA-Bibliothek wird keinen Effekt auf die Hemmung der Signaltransduktionskaskade haben und die IL2-Promotor-Konstrukte werden nicht induziert ([Fig. 10](#)). Die Expression des betreffenden Zielmoleküls (Protein X, [Fig. 11](#)) für die funktionale Nukleinsäure (fNS) aus der cDNA-Bibliothek führt zu der Komplementierung der Si-

gnalweiterleitung an den IL2-Promotor, indem die Hemmung der funktionalen Nukleinsäure umgangen wird. Die Reportergene für mlg und HSV-TK werden angeschaltet. mlg wird genutzt, um diejenigen Zellen durch Affinitätsisolation abzutrennen, bei denen der Signaltransduktionsweg wieder hergestellt ist. Weil die Level von Protein X durch stark exprimierende Promotoren innerhalb der T-Zellen auf gesättigten Konzentrationen gehalten werden, bindet das Protein X auch an die mRNA der HSV-TK und verhindert deren Expression durch Hemmung ihrer Translation. Die Zellen werden die Kultivierung in Gegenwart von Ganciclovir überleben. Falls notwendig können mehrere Runden der Geninduktion und -selektion wiederholt werden; schließlich können die Plasmide mit den cDNA-Genen isoliert werden, z.B. durch die „Hirt-Supernatant-Methode“.

[0092] Die Eleganz dieses Systems liegt in dessen zweifacher Auslesung. Das Zielgen wird durch zwei verschiedene Eigenschaften identifiziert. Sein Genprodukt muss in der Lage sein, die Funktion der Signaltransduktion in einem homologen System zur Affinitätsselektion der Zellen mittels mlg wieder herzustellen. Darüber hinaus schützt das Zielprotein die Zellen davor, abgetötet zu werden, da es spezifisch an die funktionale Nukleinsäure (RNA-Aptamer) bindet, welche in die 5'-UTR der HSV-TK-mRNA kloniert ist, welche wiederum durch das Zielprotein selbst induziert wird. Dieser Ansatz bedient sich alternativen Konformationen von RNA-Aptameren, die in Abhängigkeit von der An- oder Abwesenheit des betreffenden Aptamer-Liganden kontrolliert werden. Dieses ist Allgemeinwissen; detaillierte Strukturuntersuchungen von vielen Aptamer/Ligand-Komplexen mittels multi-dimensionaler NMR-Spektroskopie haben gezeigt, dass die RNA/Ligand-Komplexbildung stets begleitet wird von drastischen Konformationsänderungen und der konformellen Stabilisierung des bindenden RNA-Rezeptors, die nur in Gegenwart des betreffenden Liganden erfolgt (Patel et al., J. Mol. Biol. 272 (1997), 645–664; Partel, Curr. Opin. Chem. Biol. 1 (1997), 32–46; Fan et al., J. Mol. Biol. 258 (1996), 480–500; Dieckmann et al., RNA 2 (1996), 628–640; Yang et al., Science 272 (1996), 1343–47). Darüber hinaus haben Werstuck und Green (Science 282 (1998), 296–298) gezeigt, dass die Translation eines Gens verhindert werden kann, wenn eine Aptamersequenz in die untranslatierte Region eines Expressionsplasmids insertiert ist und wenn der betreffende Ligand des Aptamers zugegen ist, jedoch in der Abwesenheit des Liganden normal weiter läuft. Die Notwendigkeit, funktional und spezifisch in zwei unabhängigen Systemen zu sein, vermindert die Gefahr, falsch-positive cDNA-Klone zu erhalten. Klone, die den IL2-Promotor durch Deregulation der Signalweiterleitung aktivieren (z.B. Protein N, welches Protein Z beeinflusst, [Fig. 12](#)) sollten nicht in der Lage sein, die fNS in der HSV-TK-mRNA spezifisch zu binden und ihre Expression zu hemmen. Daher werden diese die Selektion aufgrund des Ganciclovir-vermittelten Zelltods nicht überleben. Letztendlich liefert das System spezifische Modulatoren die einfach in der hier beschriebenen Validierung von Zielmolekülen eingesetzt werden können, um komplexe Proteinnetzwerke innerhalb von Zellen zu erhellen.

Tabelle 1

Aptamer	Kds (μM)
D20	1.08
TR D20	1.37
TR-D20 RT	2.25
D28	0.55
TR D28	0.53
TR D28-RT	1.82

D31	6.14
TR D31	3.88
TR D31 RT	>13.7

[0093] Tabelle 1: Kds (μM) von CD 18cyt-bindenden Aptameren an die cytoplasmatische Domäne von CD18. TR zeigt die richtig terminierten TR-Aptamere im Kontext der TR-Vektor-Expressionskassette an. RT: Abschrift der nicht richtig terminierten TR-Aptamere mit zusätzlichen 166 Nukleotiden.

Patentansprüche

1. Verfahren für die Identifizierung eines Intramers, das in der Lage ist, an ein funktionales intrazelluläres Zielmolekül zu binden und dieses zu modifizieren durch einen Mechanismus, der verschieden ist von einem Antisense-Mechanismus, umfassend:

- a) Herstellen einer Kandidatenmischung von Nukleinsäuren;
- b) Kontaktieren der Kandidatenmischung von Nukleinsäuren mit dem intrazellulären Zielmolekül oder einem Teil davon;
- c) Auswählen und Isolieren von Nukleinsäuren mit einer verglichen mit der Kandidatenmischung erhöhten Affinität für das Zielmolekül;
- d) reverses Transkribieren, sofern die Kandidatenmischung RNAs umfasst, und Amplifizieren der in Schritt c) erhaltenen Schritte;
- e) optional Wiederholen der Schritte b) bis d);
- f) Isolieren und Sequenzieren von Klonen (Intrameren), die in Schritt e) erhalten werden; und
- g) Testen, ob das Expressionsprodukt des Inserts des in Schritt f) erhaltenen Klons in vivo an das intrazelluläre Zielmolekül bindet und dessen Funktion beeinflusst, wobei eine T7-RNA-Expressionskassette als ein zytoplasmatisches Expressionssystem verwendet wird, welches einen T7-Promotor, eine stabilisierende 5' Stamm-Schleife und einen 3' Terminator T ϕ umfasst, wobei die Sequenz der T7-RNA-Expressionskassette ohne Insert wie folgt ist:

5'-GTTAAC-GCATGCTAATACGACTCACTATAG
GGAGACCAACAACGGTTTCCCGGGCGCAAGTTACTAGT-TGGCCA-
AGATCT-TAATTAATAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGG
TCTTGAGGGGTTTTTGGCTGTCGAC-GCGGCCGC-3'

wobei das Insert zwischen der 5' Stamm-Schleife und dem Terminator T ϕ über die XmaI- und PaeI-Restriktionsstellen eingefügt ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, weiter umfassend

- h) Kartieren der Bindungsstelle des Intramers auf dem Zielmolekül.

3. Verfahren zum Identifizieren eines funktionalen intrazellulären Zielmoleküls, das mit einem besonderen Phänotyp verbunden ist, und des korrespondierenden Intramers, das in der Lage ist, an das Zielmolekül zu binden und dessen Funktion zu modifizieren durch einen Mechanismus, der verschieden ist von einem Antisense-Mechanismus, umfassend:

- a) Herstellen einer Kandidatenmischung von Nukleinsäuren;
- b) Klonieren der Kandidatenmischung von Nukleinsäuren unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors in einen Vektor, der optional einen selektierbaren Marker enthält, wobei der Vektor ein zytoplasmatisches Expressionssystem ist, das eine T7-RNA-Expressionkassette umfasst, wobei die T7-RNA-Expressionskassette einen T7-Promotor umfasst, eine stabilisierende 5' Stamm-Schleife und einen 3'-Terminator T ϕ , wobei die Sequenz der T7-RNA-Expressionskassette ohne Insert wie folgt ist:

5'-GTTAAC-GCATGCTAATACGACTCACTATAG
GGAGACCAACAACGGTTTCCCGGGCGCAAGTTACTAGT-TGGCCA-
AGATCT-TAATTAATAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGG
TCTTGAGGGGTTTTTGGCTGTCGAC-GCGGCCGC-3'

wobei das Insert zwischen der 5' Stamm-Schleife und dem Terminator T ϕ über die XmaI- und PaeI-Restriktionsstellen eingefügt ist;

- c) Einführen des in Schritt b) erhaltenen Vektors in eine Reporterzelllinie, die positive oder negative phänotypische Selektion erlaubt;
- d) Auswählen von Zellen mit einem geänderten Phänotyp; und
- e) Bestimmen der Sequenz der in den Vektor von Schritt b) eingefügten Nukleinsäure (Intramer) und der Verbindung, an die sie bindet.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Kandidatenmischung aus Nukleinsäuren einzelsträngige Nukleinsäuren umfasst.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die einzelsträngige Nukleinsäure eine RNA ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das funktionale intrazelluläre Zielmolekül ein Integrin ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 6, wobei die Reporterzelllinie von Schritt c) negative Selektion erlaubt.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Reporterzelllinie einen Vektor enthält, der einen selektierbaren Marker und ein Reportergen, das unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors für ein Toxin kodiert, umfasst, und wobei nur Zellen überleben werden, die den Vektor von Schritt b) exprimieren, der eine Nukleinsäure (Intramer) exprimiert, die eine Verbindung inhibiert, die für die Aktivierung des Promotors erforderlich ist, der das Toxingen steuert, und wobei in Schritt d) die überlebenden Zellen selektiert werden.
9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das Toxingen HSV-Thymidinkinase ist.
10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, wobei der Toxingen-steuernde Promotor ein IL-2-Promotor ist.
11. Wirtszelle, die einen oder mehrere der in den Ansprüchen 3 bis 5 beschriebenen Vektoren mit der Kandidatenmischung als Insertionen und den Vektor von Anspruch 8 enthält.
12. T7-RNA-Expressionskassette umfassend einen T7-Promotor, gefolgt von zwei Stamm-Schleifen-Strukturen zwischen denen einen Klonierungsstelle vorgesehen ist, wobei die Sequenz dieser T7-RNA-Expressionskassette die folgende Sequenz umfasst:
5'-GTTAAC-GCATGCTAATACGACTCACTATAG
GGAGACCACAACGGTTTCCCGGGCGCAAGTTACTAGT-TGGCCA-
AGATCT-TAATTAATAGCAATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGG
TCTTGAGGGGTTTTTGTCTGTCGAC-GCGGCCGC-3'
13. T7-RNA Expressionskassette nach Anspruch 12 umfassend die folgenden Restriktionsstellen: HpaI, SphI, XmaI, SpeI, BglII, PaeI, SalI und NotI, und wobei die Kassette weiter eine Aptamer-kodierende DNA umfasst, die zwischen den 5'- und 3'-Stamm-Schleifen-Strukturen mittels der XmaI- und PaeI-Restriktionsstellen eingefügt ist.
14. Verwendung des T7-RNA-Expressionssystems in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10.

Es folgen 12 Blatt Zeichnungen

A 5'-TC[T7-primer]GGGGCTAAGTCCTCGCTCA-N40-ACGCGCGACTCGGATCCT-3'
DNA-Pool

H₂N-KALIHLSDLREYRRFEKEKLKSQWNNDNPLFKSATTTVMNPKFAES-COOH

CD18-cyt (46-mer Peptid)

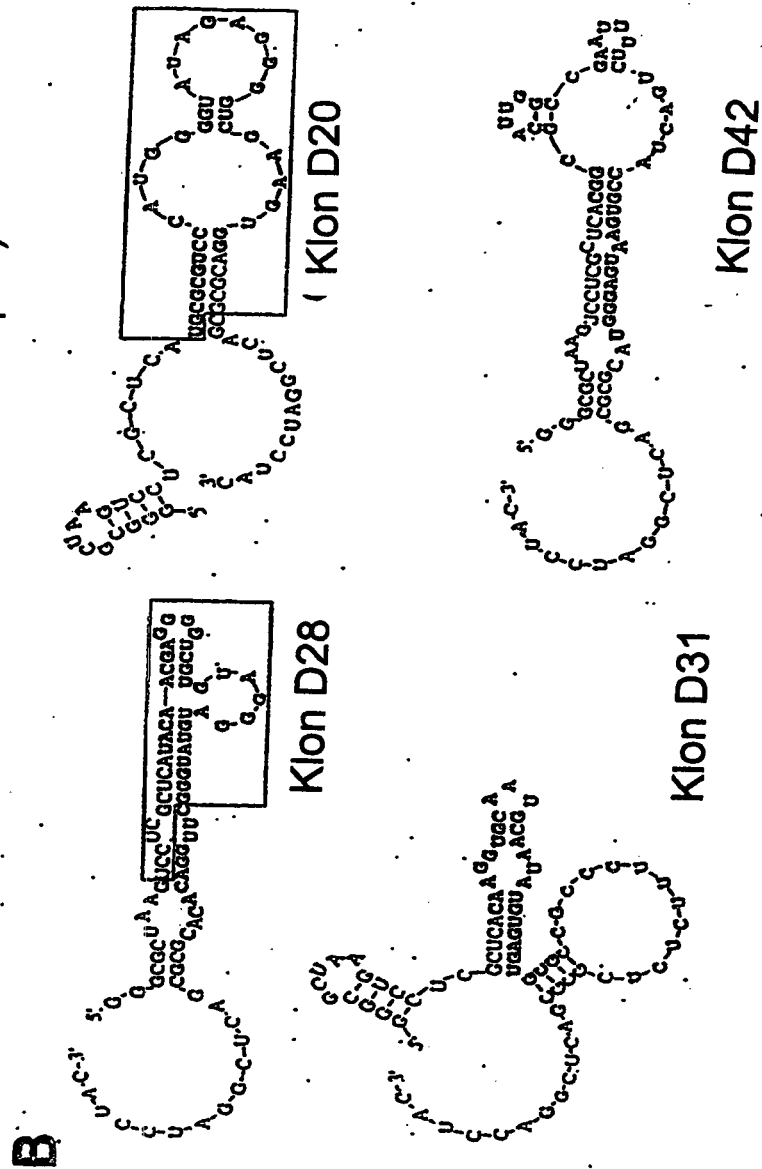


Fig. 1

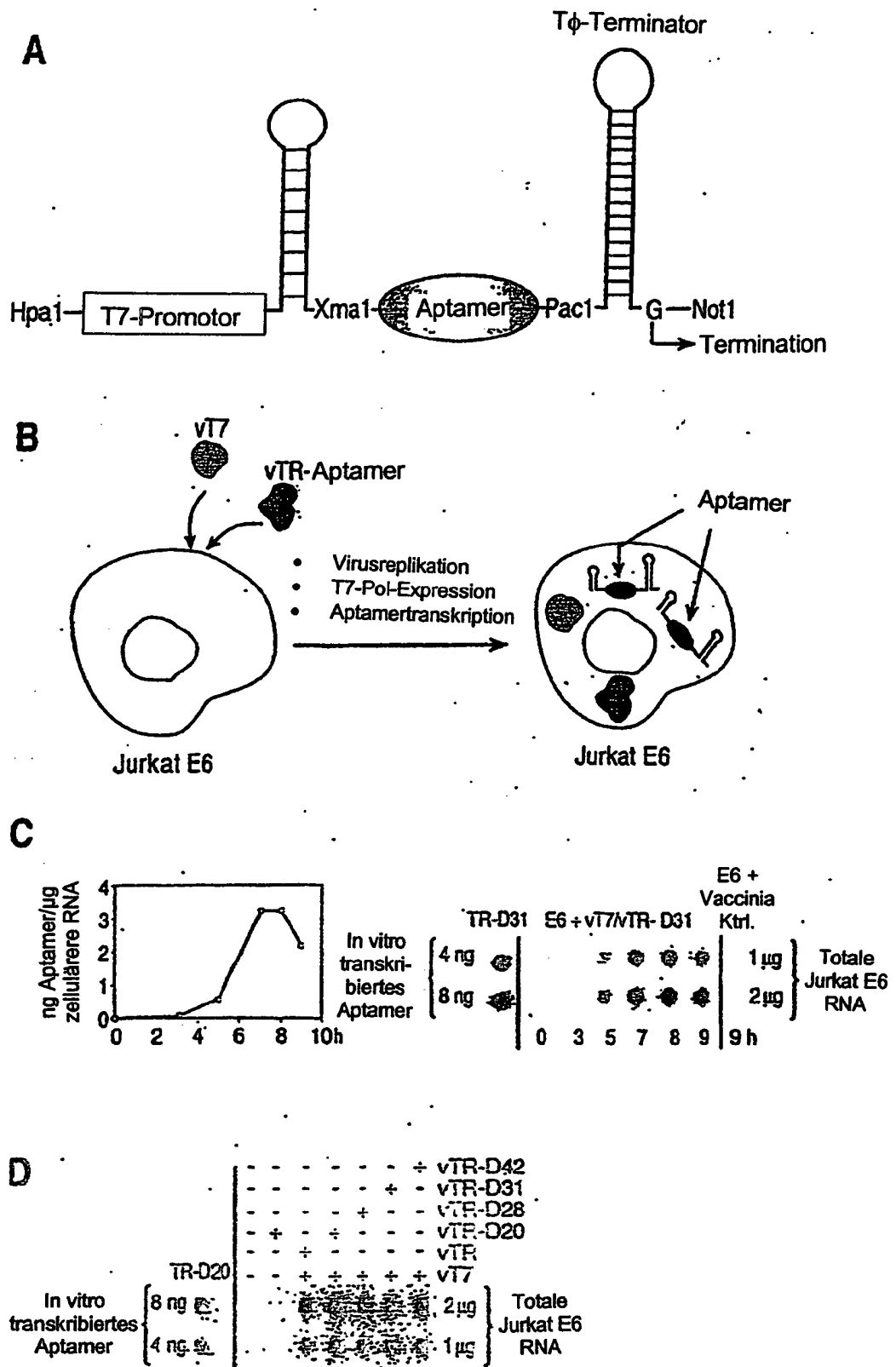


Fig. 2

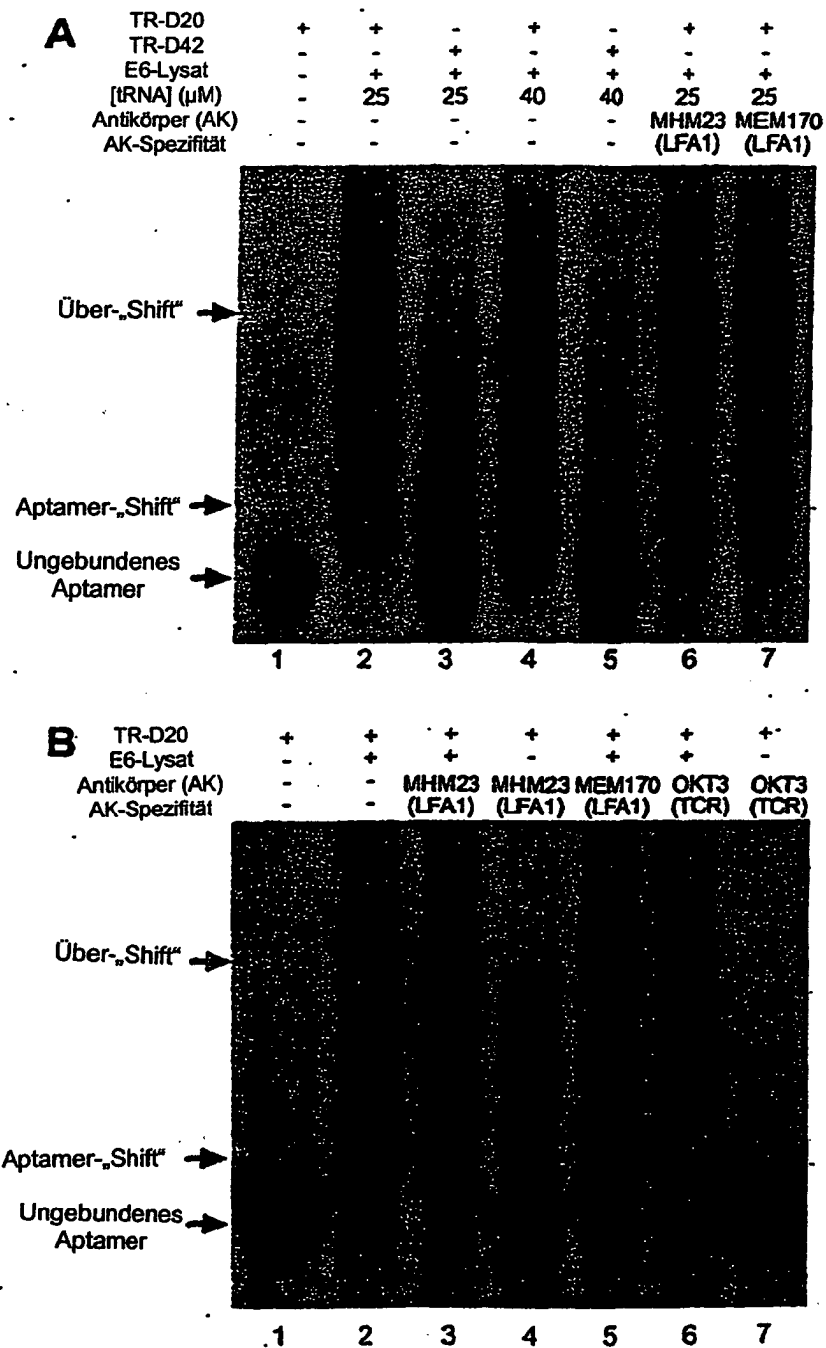


Fig. 3

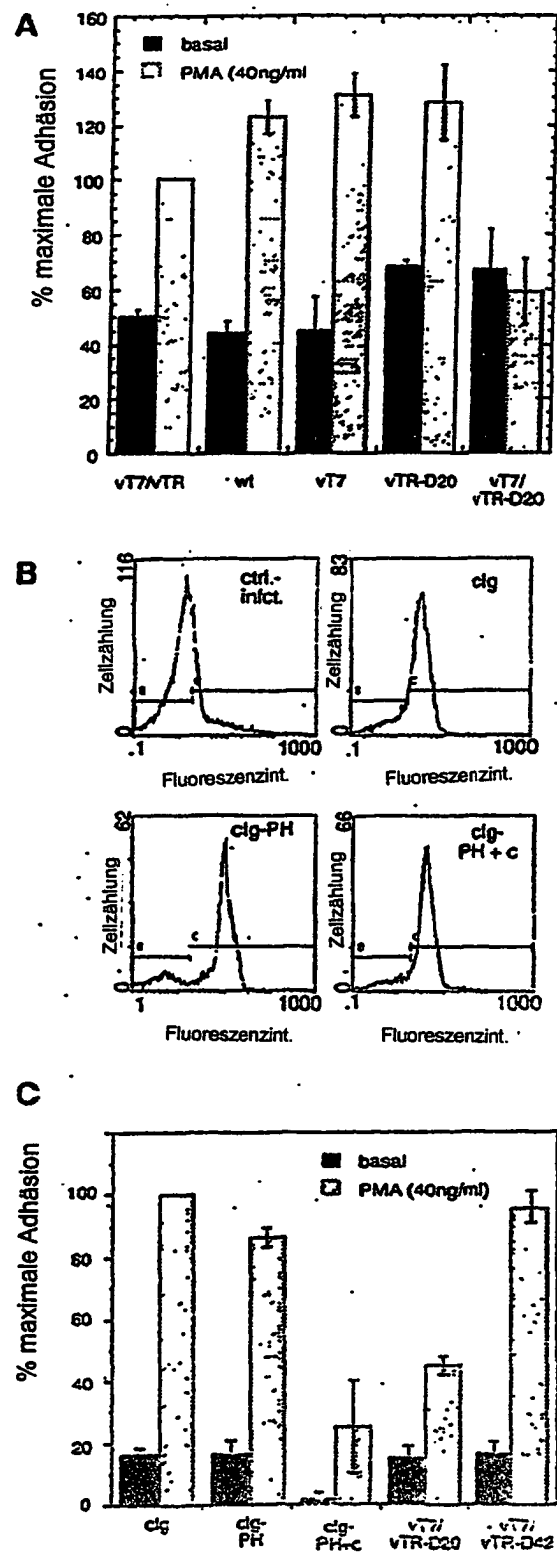


Fig. 4

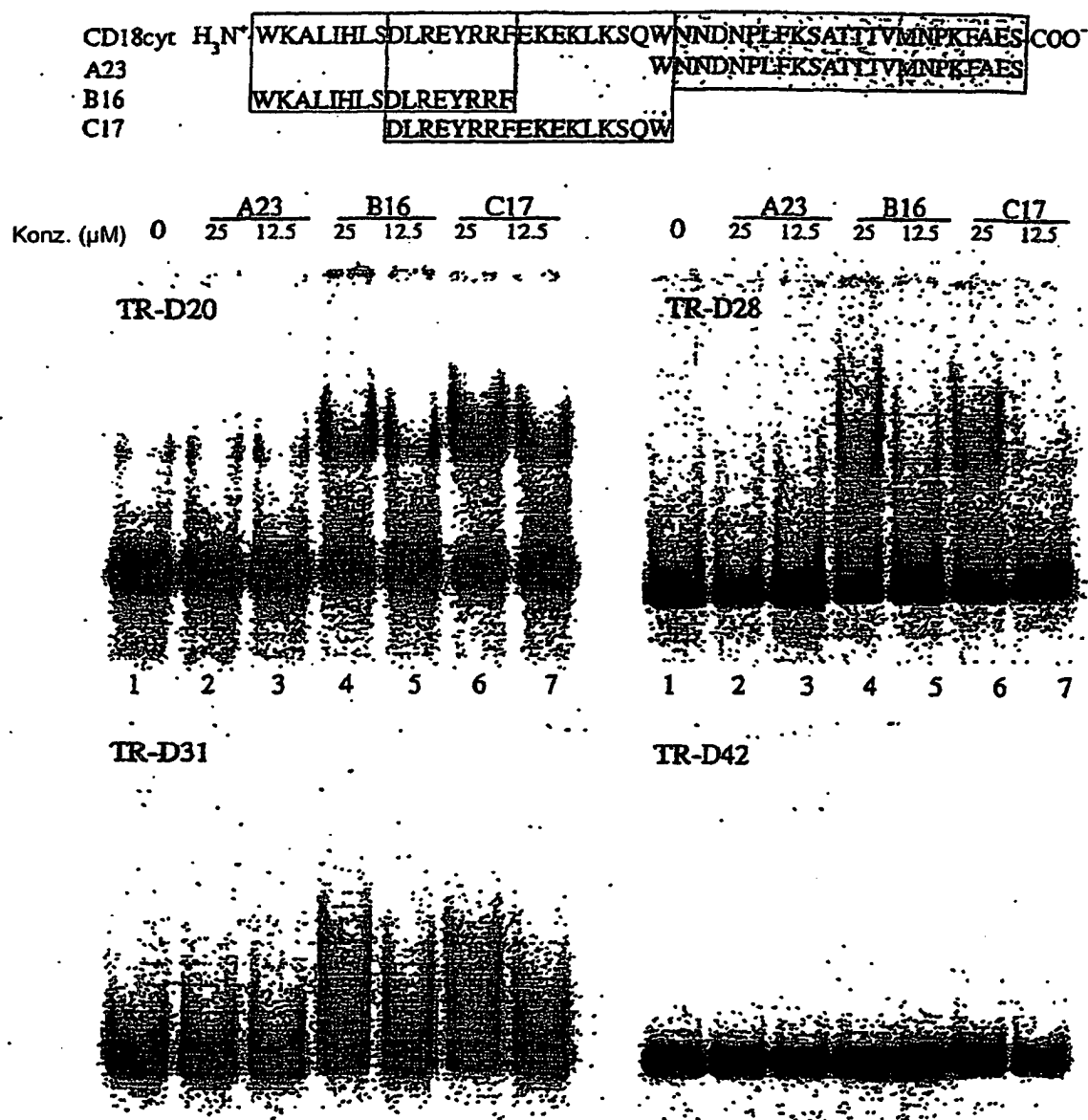
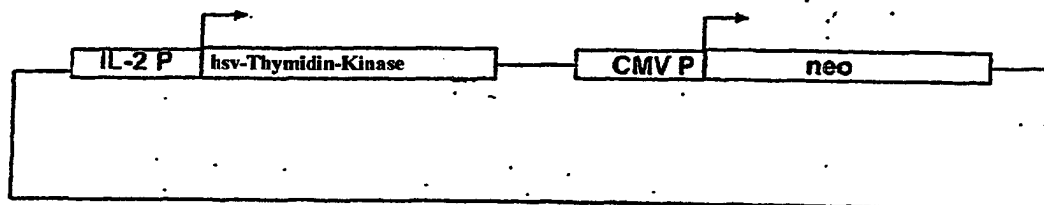


Fig. 5

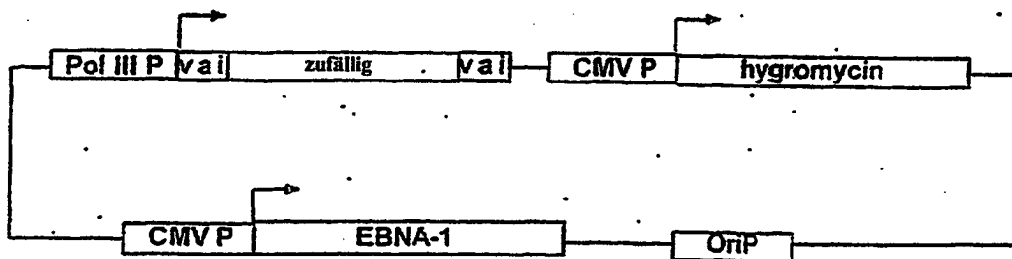
Vektoren für die phänotypische Selektion gegen IL-2-Promotor-Induktion

A



Plasmid pP1

B



Plasmid pP2

Fig. 6

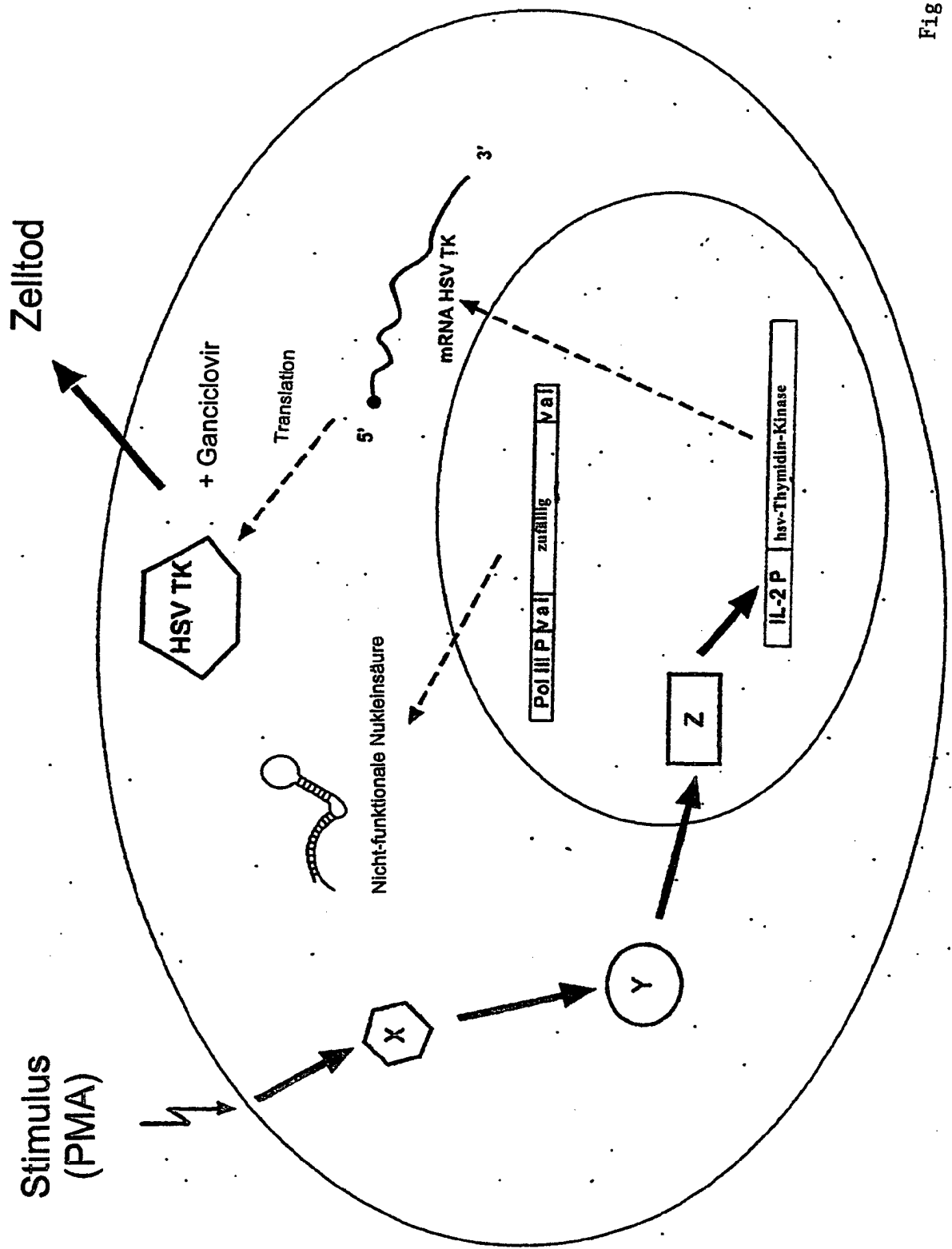


Fig. 7

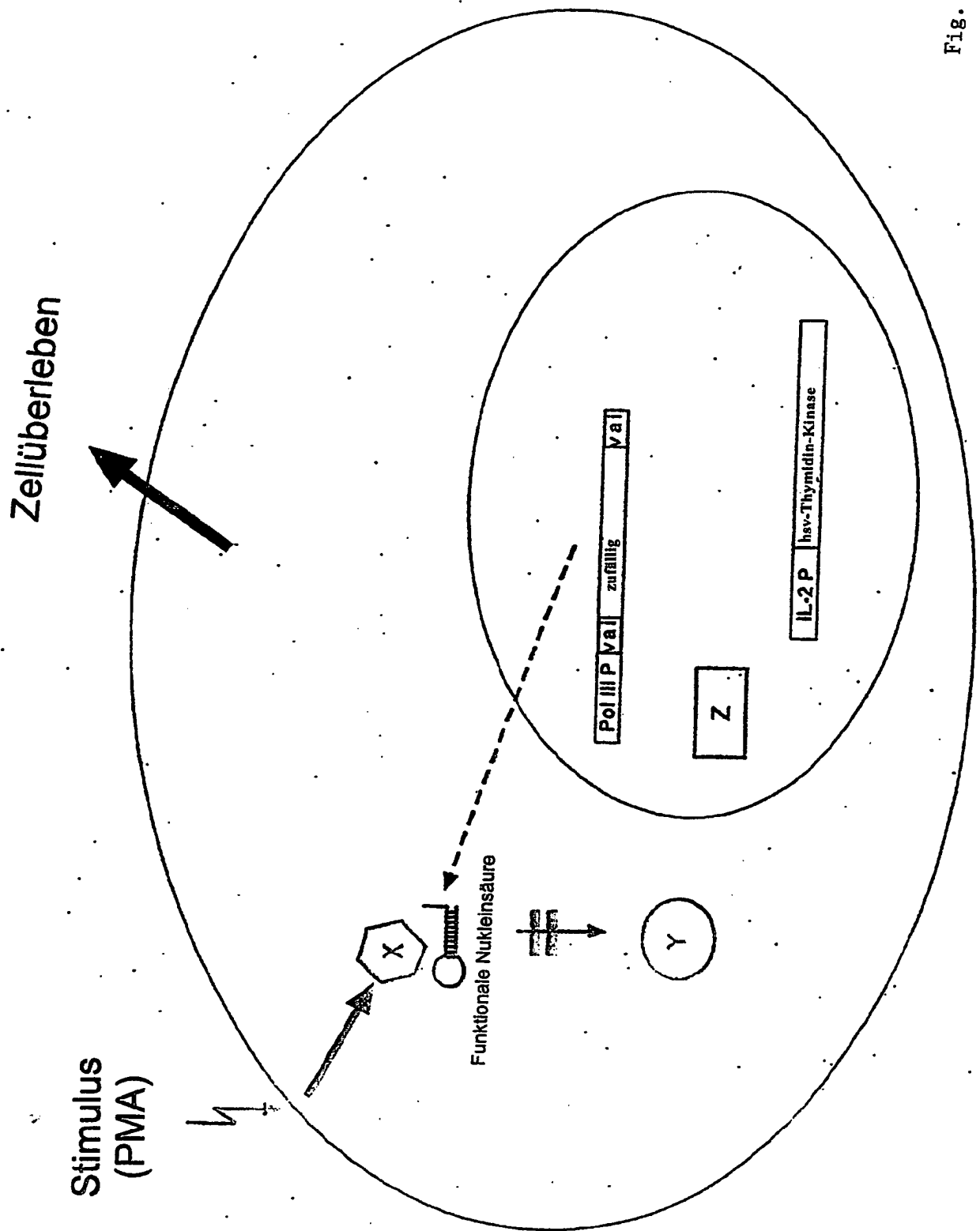
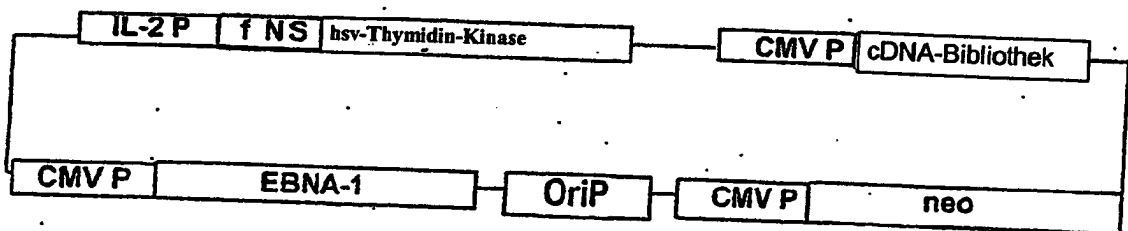


Fig. 8

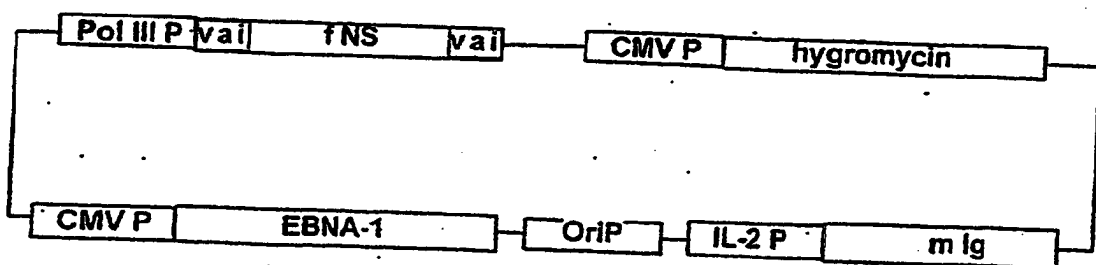
Vektoren für die funktionale Zielmolekülidentifizierung

A



Plasmid pF1

B



Plasmid pF2

Fig. 9

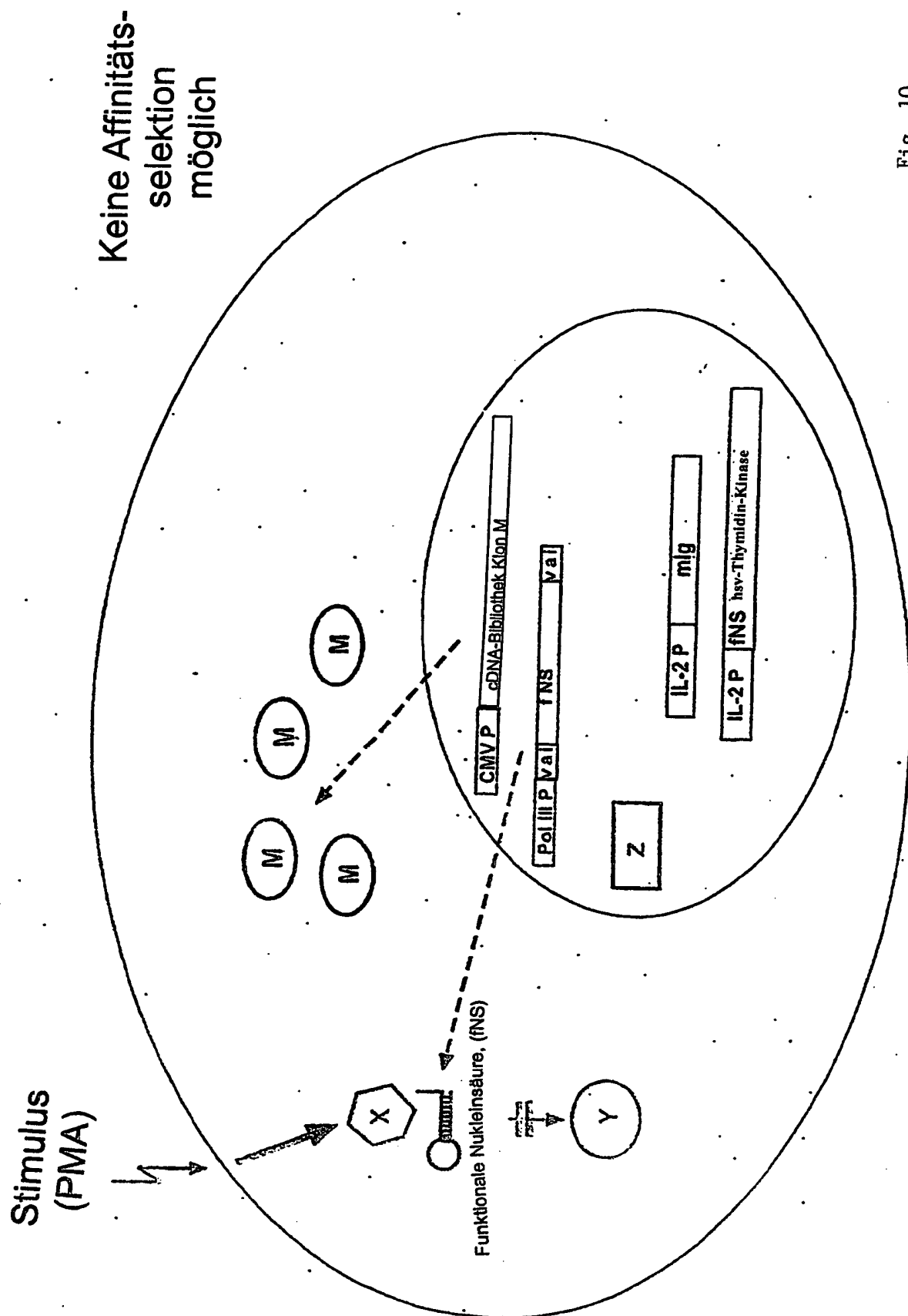


Fig. 10

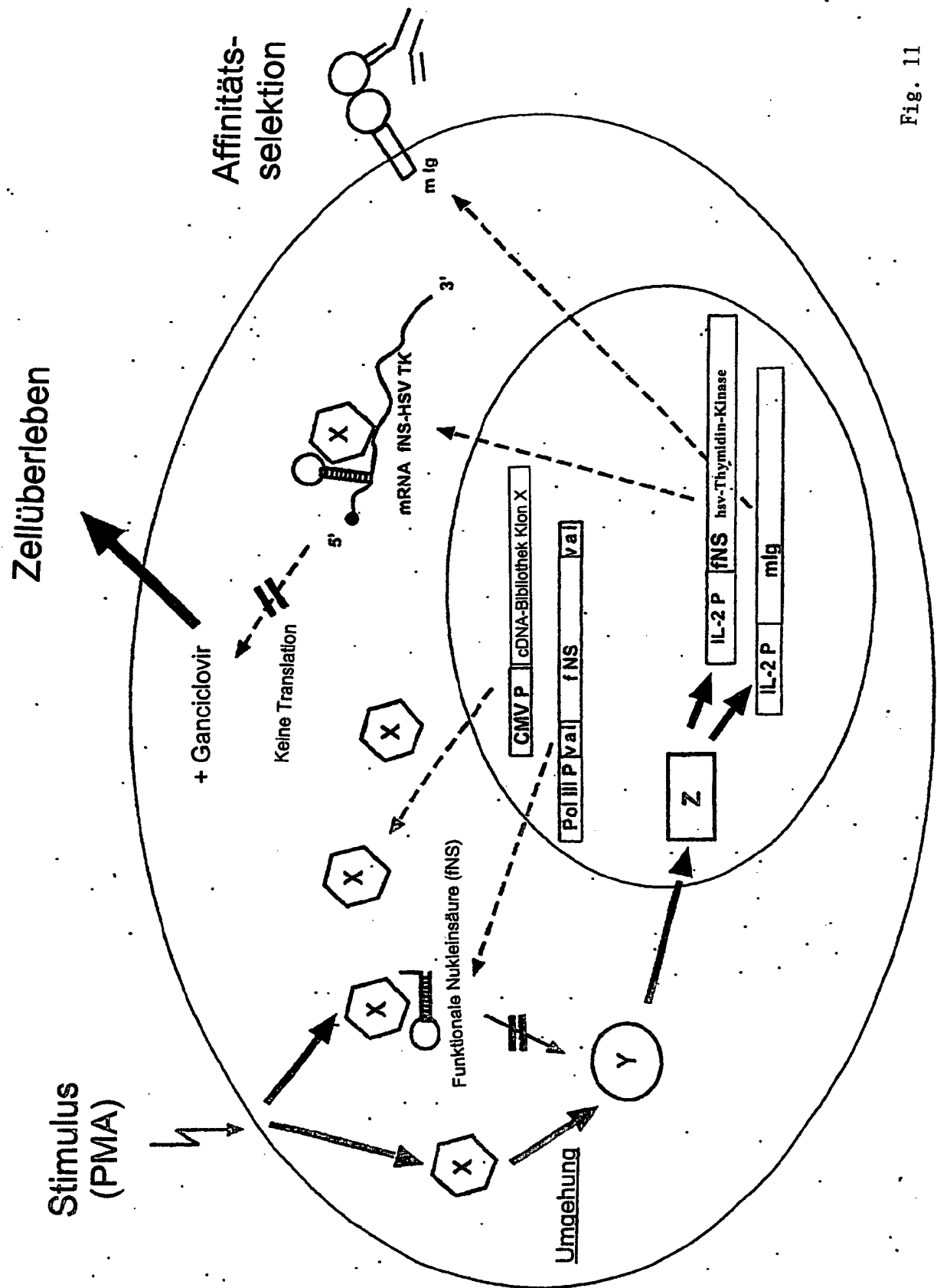


Fig. 11

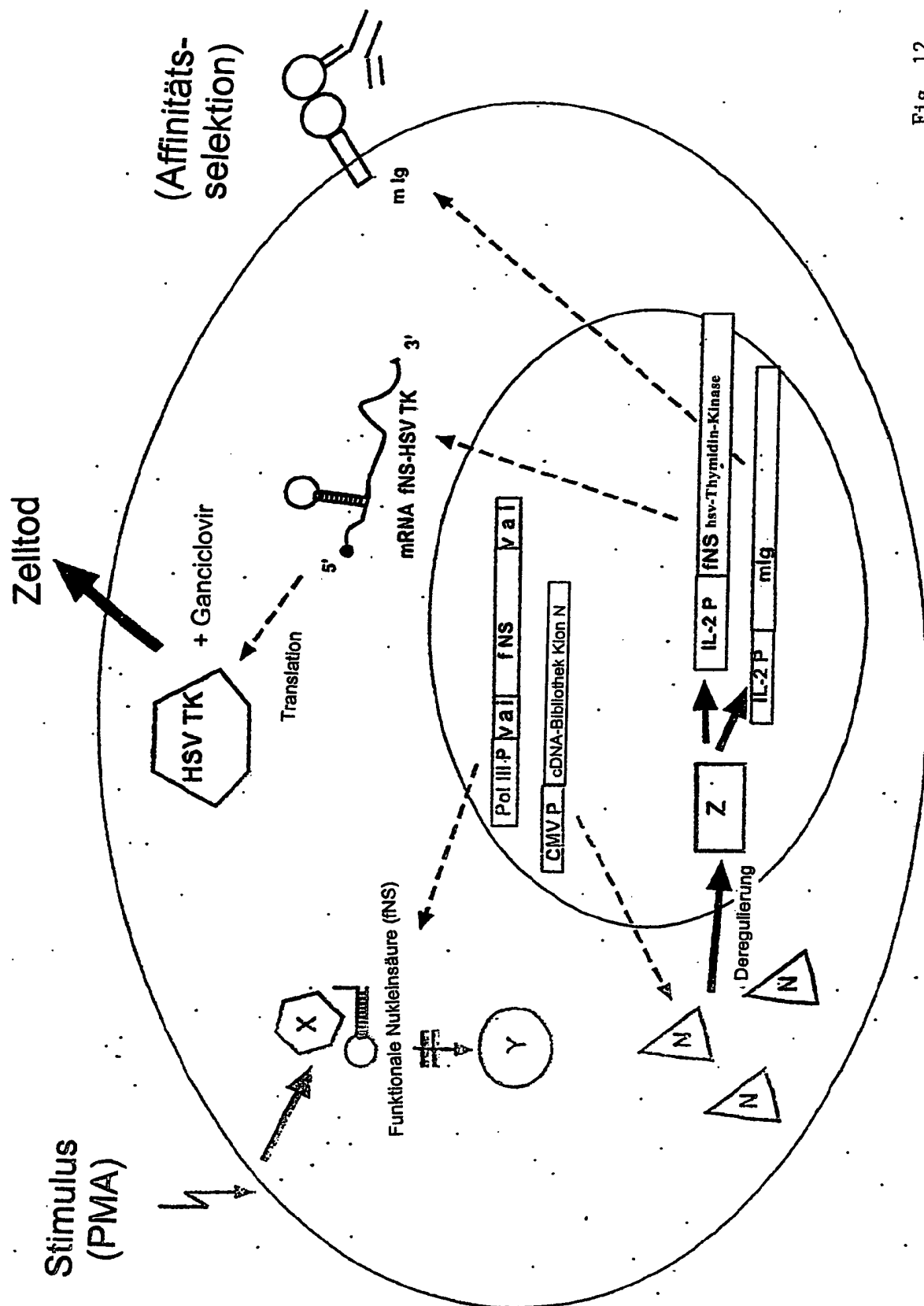


Fig. 12