

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
17. November 2005 (17.11.2005)

PCT

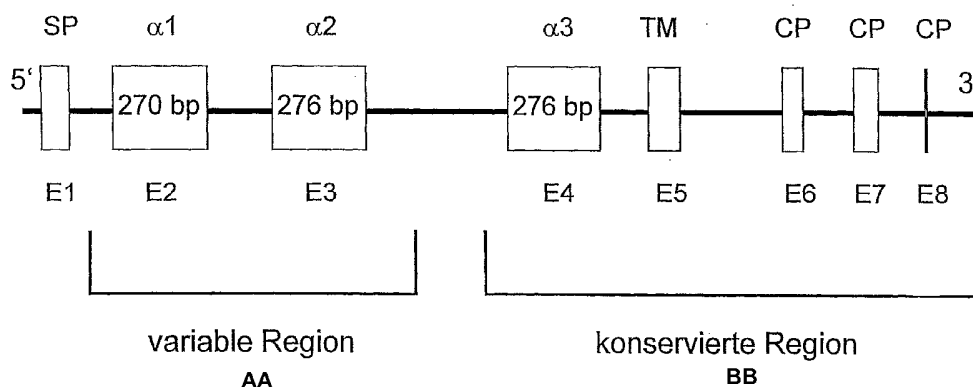
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/108572 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/11, A61K 48/00, 31/70
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2004/000956
- (22) Internationales Anmeldedatum:
6. Mai 2004 (06.05.2004)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **MEDIZINISCHE HOCHSCHULE HANNOVER** [DE/DE]; Carl-Neuberg-Strasse 1, 30625 Hannover (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BLASCZYK, Rainer** [DE/DE]; Am Nordberg 3, 30938 Burgwedel (DE). **FERREIRA DE FIGUEIREDO, Constanca, Sofia** [PT/DE]; Stolzestrasse 27, 30171 Hannover (DE). **SELTSAM, Axel** [DE/DE]; Hermann-Löns-Weg 1, 30916 Iserhagen (DE).
- (74) Anwalt: **TARUTTIS, Stefan**; Vahrenwalder Strasse 7, 30165 Hannover (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: COMPOUNDS AND METHOD FOR IMMUNOSUPPRESSION

(54) Bezeichnung: VERBINDUNGEN UND VERFAHREN ZUR IMMUNOSUPPRESSION



AA... VARIABLE REGION
BB... PRESERVED REGION

(57) Abstract: The invention relates to the influence exerted on the immune system or on the rejection reaction mediated by the immune system, between a transplant and a transplant patient, and autoimmune diseases. The aim of the invention is to reduce the expression of HLA I and/or HLA II, preferably until the complete elimination thereof. According to the invention, the expression of HLA I and/or HLA II in the transplant is to be reduced in the event of a functioning immune system of the patient. The expression of HLA I and/or HLA II is preferably achieved by producing inhibiting RNAs in cells of the transplant, or by directly introducing inhibiting RNAs into said cells. In this way, further expression of HLA I and/or HLA II identified by the immune system as being foreign is reduced until it is completely eliminated.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2005/108572 A1



RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Beeinflussung des Immunsystems bzw. der durch das Immunsystem vermittelten Abstoßungsreaktion zwischen einem Transplantat und einem Empfänger, sowie Autoimmunkrankheiten. Erfindungsgemäß ist vorgesehen, die Expression von HLA I und/oder HLA II zu vermindern, vorzugsweise bis zu deren vollständiger Unterdrückung. Dabei zielt die Erfindung auf die Verminderung der Expression an HLA I und/oder HLA II innerhalb des Transplantats bei funktionierendem Immunsystem des Empfängers. Die Expression von HLA I und/oder HLA II wird vorzugsweise durch die direkte Einbringung oder die Produktion von hemmenden RNAs in Zellen des Transplantats erreicht. Auf diese Weise wird die weitere Expression derjenigen HLA I und/oder HLA II bis hin zur vollständigen Unterdrückung vermindert, die vom Immunsystem als fremd erkannt werden.

Verbindungen und Verfahren zur Immunsuppression

Die vorliegende Erfindung betrifft die Beeinflussung des Immunsystems bzw. der durch das Immunsystem vermittelten Abstoßungsreaktion zwischen einem Transplantat und einem Empfänger, sowie bei Autoimmunkrankheiten.

Wesentliche Reaktionen des Immunsystems werden durch die in der Zellmembran verankerten HLA - Moleküle (humane Leukozyten-Antigene), die durch den humanen MHC kodiert werden, vermittelt. Die HLA-Moleküle spielen innerhalb der adaptiven Immunabwehr eine zentrale Rolle, da sie Antigene in Form kleiner Peptide gegenüber anderen Zellen des Immunsystems präsentieren, was einen Schritt der Wechselwirkung zur Auslösung der Immunabwehr darstellt.

Die HLA-Moleküle der Klasse I (HLA I) sind auf der Oberfläche aller Zellen vorhanden und präsentieren Peptide aus zellinternen synthetisierten Proteinen, die zu Bruchstücken von ca. 9 bis 11 Aminosäuren degradiert wurden. HLA I treten in Wechselwirkung mit CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (T-Killerzellen). Die Peptide, die von HLA I präsentiert werden,

können beispielsweise aus natürlichen Zellproteinen stammen, oder aus viralen Proteinen, die im Anschluss an eine Virusinfektion synthetisiert worden sind. Die CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen erkennen einerseits üblicherweise diejenigen von HLA I präsentierten Peptide als fremd, die nicht aus dem eigenen Genom der Zelle selbst stammen, andererseits auch ein dem Organismus fremdes HLA I, ohne dass zusätzlich ein präsentiertes fremdes Peptid erforderlich wäre.

Die Spezifität von HLA I gegenüber den präsentierten Antigenen beruht auf der Wechselwirkung ihrer Peptid-bindenden Region, die aus Teilen der α 1- und α 2- Domäne gebildet wird. Diese Peptid-bindenden α 1- und α 2- Domänen sind insbesondere im Bereich der Peptid-bindenden Region durch einen ausgeprägten Polymorphismus ihrer Aminosäuresequenz gekennzeichnet. Dieser hochgradige Polymorphismus führt dazu, dass innerhalb einer Population eine große Anzahl von HLA I mit verschiedener Spezifität für Peptide, die als Antigen erkannt werden, erreicht wird, sodass verschiedene HLA I - Allele unterschiedliche Bereiche, beispielsweise eines Krankheitserregers, als Antigen erkennen. Dieser Polymorphismus innerhalb einer Population wird dadurch für jedes Individuum genutzt bzw. verstärkt, dass beispielsweise beim Menschen jedes Individuum ein Allel für HLA I von jedem Elter auf den Oberflächen seiner Zellen exprimiert (Heterozygotie).

Die HLA I-Moleküle weisen eine schwere variable α -Kette auf, die die Peptid-bindenden, hoch polymorphen Regionen α 1 und α 2, sowie eine Domäne α 3 enthält, sowie eine leichte, invariable β -Kette.

Die Fähigkeit der zytotoxischen T-Zellen, fremde HLA I-Moleküle als fremdes Antigen zu erkennen, führt dazu, dass im Falle der Transplantation fremden Gewebes dessen HLA I vom Immunsystem des Empfängers als fremd erkannt wird und die Immunantwort der zytotoxischen T-Zellen auslöst, die den Zelltod des Transplantats verursacht. Werden andererseits Stammzellen des hämopoetischen Systems in einen Empfänger transplantiert, so erkennen die mittransplantierten CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen die HLA I-Moleküle des Empfängers als fremd und greifen diese an.

Das HLA II - Molekül weist eine α - und eine β -Kette auf, die Peptidbindung wird durch die Domänen α 1 und β 1 vermittelt. HLA II ist auf der Oberfläche professionell Antigen präsentierender Zellen vorhanden, beispielsweise Makrophagen, dendritischen Zellen, B-

Lymphozyten, sowie auf aktivierten T-Zellen. HLA II präsentiert extra-zelluläre aufgenommene Antigene mit einer Größe von ca. 15 bis 24 Aminosäuren gegenüber CD4+ T-Zellen oder T-Helferzellen sowie gegenüber CD8+ T-Zellen zu deren Stimulation. Die Wechselwirkung mit CD4+ T-Zellen oder T-Helferzellen führt dann zur Produktion von Antikörpern durch B-Zellen.

Der Polymorphismus von HLA I und HLA II führt dazu, dass nur eine geringe Wahrscheinlichkeit dafür besteht, dass innerhalb einer Population zwei Individuen derart ähnliche bzw. gleiche HLA I und/oder HLA II aufweisen, dass sie im Falle einer Transplantation nicht vom jeweils anderen Immunsystem als fremd erkannt werden. Als Konsequenz dieser mangelnden Übereinstimmung wird mit hoher Wahrscheinlichkeit eine immunologische Reaktion durch HLA I und/oder HLA II alleine ausgelöst.

Die durch HLA vermittelte Abstoßung wird noch dadurch kompliziert, dass im Falle einer Transplantation sowohl die väterlichen als auch die mütterlichen Allele von Transplantat und Empfänger aufeinander abgestimmt sein müssen, um eine immunologische Reaktion zu vermeiden, die gegen das als fremd erkannte HLA I und/oder HLA II gerichtet ist.

Mit Blick auf unerwünschte Immun-Reaktionen bei Transplantationen führt nach bisherigem Kenntnisstand insbesondere eine mangelnde Übereinstimmung der Struktur der β -Ketten, insbesondere hinsichtlich der von den Genorten DRB1 und DQB1 kodierten Regionen, nämlich HLA-DR und -DQ der β -Ketten, zu gegenseitigen Abstoßungsreaktionen.

Im Falle von Autoimmun-Erkrankungen wird vermutet, dass die Präsentation körpereigener Peptide, die normalerweise keine Immunantwort auslösen sollten, dennoch zu einer Immunreaktion führt. Dies kann einerseits durch Präsentation von Antigenen, die aus körpereigenen Proteinen entstanden sind, durch HLA I vonstatten gehen. Die anschließende Wechselwirkung mit CD8+ zytotoxischen T-Zellen löst in unerwünschter Weise deren Immunantwort aus, die dann gegen körpereigene Zellen gerichtet ist.

Als weiterer Wirkmechanismus von Autoimmun-Erkrankungen wird angenommen, dass auch die Präsentation körpereigener Proteine durch HLA II gegenüber CD4+ T-Zellen oder T-Helferzellen die Aktivierung der Antikörper-Produktion durch B-Zellen auslöst, was ebenfalls zu einer unerwünschten Immun-Reaktion führt, die gegen körpereigene Proteine gerichtet ist. Weiterhin unterstützen die T-Helferzellen CD8+ T-Zellen zur weiteren Entwicklung.

Stand der Technik

Zur Vermeidung einer Abstoßung des Empfängers gegen das Transplantat (Richtung Host versus Graft, HvG) oder des Transplantats gegen den Empfänger (Richtung Graft versus Host, GvH) werden die HLA-Phänotypen von Transplantat und Empfänger analysiert und vorzugsweise im Falle der phänotypischen Übereinstimmung einander zugeordnet, sodass dann eine Transplantation erfolgen kann. Dabei ist zu berücksichtigen, dass aufgrund des hohen Polymorphismus der HLA I und HLA II, die überdies in jeweils zwei Allelen vorliegen, nur eine geringe Wahrscheinlichkeit dafür besteht, eine völlige phänotypische Übereinstimmung zwischen Transplantat und Empfänger auswählen zu können. Dies trifft insbesondere dann zu, wenn die begrenzte Anzahl der zur Verfügung stehenden Transplantate berücksichtigt wird.

Zur Vermeidung unerwünschter Abstoßungsreaktionen werden bisher immunsupprimierende Mittel verwendet, die die Aktivität des Immunsystems eines Empfängers eines Transplantats soweit reduziert, dass eine Immunreaktion gegen das als fremd zu erkennende Transplantat unterdrückt wird. Auf diese Weise läßt sich zwar einerseits eine Abstoßung des Transplantats verzögern bzw. verhindern, andererseits wird jedoch die Anfälligkeit gegenüber Infekten oder dem Auftreten von Tumoren erhöht.

Die Abstoßung entsteht einerseits aus der durch HLA I vermittelten immunologischen Aktivität der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen, andererseits konnte auch gezeigt werden, dass anti-HLA-Antikörper gebildet werden, die auf eine Vermittlung durch HLA II zurückgehen. In der Folge führt bei HvG die zelluläre und humorale Immunantwort des Immunsystems des Empfängers zur Abstoßung bzw. zum Funktionsverlust des Transplantats. Für den Fall der Transplantation von Zellen des Immunsystems richtet sich die zelluläre und/oder humorale Immunantwort des Transplantats gegen alle Zellen des Empfängers (GvH), da diese einen HLA I und/oder HLA II aufweisen, die von den transplantierten Immunzellen als fremdes Antigen erkannt werden.

Mit Bezug auf Autoimmunkrankheiten besteht die bisher angewendete Therapie darin, ebenfalls das Immunsystem soweit zu inaktivieren, dass die immunologische Reaktion gegen körpereigene Zellen in ausreichendem Maße unterdrückt wird. In Einzelfällen, beispielsweise bei *Myasthenia gravis*, kann auch ein an der Immunreaktion beteiligtes Organ operativ

entfernt werden, wobei jedoch zusätzlich eine immunsupprimierende Therapie erforderlich bleibt.

Genaue Beschreibung der Erfindung

Gegenüber dem bekannten Stand der Technik stellt sich der vorliegenden Erfindung die Aufgabe, die unerwünschten immunologischen Reaktionen bei Transplantationen, beispielsweise in der Richtung GvH oder HvG, sowie von Autoimmun-Erkrankungen zu vermindern, vorzugsweise vollständig zu unterdrücken, wobei die Nachteile der bekannten Verfahren vermieden werden sollen.

Die vorliegende Erfindung stellt in einer ersten Ausführungsform Mittel bereit, die diese unerwünschten Abstoßungsreaktionen zwischen Transplantat und Empfänger vermindern, bis hin zu deren vollständiger Unterdrückung.

In einer weiteren Ausführungsform mit Bezug auf Autoimmunkrankheiten betrifft die Erfindung die Verminderung bzw. Unterdrückung die Expression von HLA I und/oder HLA II des betroffenen Menschen, wobei vorzugsweise nur diejenigen Allele von HLA I und/oder HLA II vermindert bzw. unterdrückt werden, die an der Vermittlung der immunologischen Reaktion beteiligt sind.

Erfindungsgemäß ist vorgesehen, die Expression von HLA I und/oder HLA II zu vermindern, vorzugsweise bis zu deren vollständiger Unterdrückung. Dabei zielt die Erfindung auf die Verminderung der Expression von HLA I und/oder HLA II, beispielsweise im Transplantat, sodass bei funktionierender Immunreaktion die Abstoßung vermindert oder verhindert wird. Transplantate können dabei solide Organe, Gewebe oder Zellen, beispielsweise Herz, Lunge, Leber, Niere, Haut oder Zellen des Pankreas, einschließlich jedweder Stammzellen, beispielsweise hämopoetische Stammzellen oder Stammzellen des Pankreas sein.

In einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird die Expression der HLA I und/oder HLA II der Zellen des Empfängerorganismus vermindert, vorzugsweise vollständig unterdrückt, wenn das Transplantat Zellen des Immunsystems umfasst. Dies dient beispielsweise bei der hämopoetischen Stammzelltransplantation dazu, die Graft versus Host-

Reaktion zu vermindern, die durch im Knochenmarkstransplantat enthaltene T-Zellen verursacht wird.

Zur Verminderung der Expression von HLA I und/oder HLA II ist vorgesehen, die Transkription der entsprechenden MHC-Gene zu reduzieren und/oder die Translation der mRNA zu vermindern, die für HLA I und/oder HLA II kodiert. Dabei sieht die Erfindung vor, dass Nukleinsäuren verwendet werden, die durch spezifische Wechselwirkung mit dem für HLA kodierenden Gen oder der entsprechenden mRNA die Expression von HLA vermindern, vorzugsweise vollständig unterdrücken. Diese Wechselwirkung der eingesetzten Nukleinsäure kann Bereiche des betreffenden MHC-Gens oder der mRNA betreffen, die für Aminosäuren kodieren (Exons), oder nicht-translatierte Bereiche, beispielsweise regulatorische Genabschnitte oder Introns.

Erfindungsgemäß kann die Verminderung der Transkription der MHC-Gene dadurch erreicht werden, dass die genomische Kopie des betreffenden MHC-Gens inaktiviert wird, beispielsweise durch Insertion in Bereiche und/oder Deletion von Bereichen der regulatorischen und/oder strukturellen Genabschnitte. Dies kann beispielsweise durch Rekombination mit transfizierten oder transduzierten Nukleinsäuren erfolgen, die bereichsweise homolog zum MHC-Gen sind, jedoch eine Deletion, Insertion oder sonstige beliebige Mutation enthalten, bei deren Einführung die genomische Kopie des MHC-Gens durch Veränderung der regulatorischen Bereiche oder Störung des Strukturgens inaktiviert wird bzw. zu einem nicht-funktionellen HLA führt.

Die Expression von HLA I und/oder HLA II wird vorzugsweise durch die direkte Einbringung oder die Produktion von hemmenden RNAs erreicht. Dies sind vorzugsweise siRNA oder antisenseRNA. Auf diese Weise wird die weitere Expression derjenigen HLA I und/oder HLA II bis hin zur vollständigen Unterdrückung vermindert, die vom Immunsystem als fremd erkannt werden.

Die Verminderung der Translation der mRNA, die HLA I und/oder HLA II kodieren, kann alternativ durch Transfektion oder Transduktion enzymatisch aktiver RNA, sogenannter Ribozyme erfolgen, die eine oder mehrere spezifische mRNAs degradieren, die für HLA kodieren. Eine solche enzymatisch aktive RNA wird im Rahmen dieser Erfindung auch als hemmende RNA bezeichnet und kann in Form eines Plasmids oder DNA-Konstrukts in die

Zelle eingeführt werden, zum Beispiel durch Transfektion oder durch Transduktion einer Expressionskassette auf einem Vektor, vorzugsweise einem lentiviralen Vektor, von dem die enzymatisch aktive RNA dann in der Zelle transkribiert wird. Alternativ können synthetische Derivate von RNA in Zellen transfiziert werden, beispielsweise Phosphothioate, die nach Art einer antisenseRNA zur Inaktivierung der mRNA führen, die für das spezifische HLA kodiert.

Die Verminderung der Expression von HLA I und/oder HLA II kann klassenspezifisch sein, d.h. die Expression von HLA I und/oder HLA II komplett vermindern, für den Genort spezifisch sein, d.h. HLA I-A oder HLA I-B oder HLA I-C usw. jeweils in ihrer Expression vermindern, gruppenspezifisch, d.h. bei HLA I für beispielsweise die Gruppe 68, 07 oder 08 spezifisch sein, und/oder allelspezifisch sein, d.h. nur ein spezifisches Allel eines heterozygoten Trägers von HLA I und/oder HLA II in seiner Expression zu vermindern.

Die Auswahl der für die Verminderung der Expression von HLA I und/oder HLA II zu verwendenden spezifischen Nukleinsäuren kann von einem Fachmann dadurch vorgenommen werden, dass jeweils für die Klasse, den Genort, die Gruppe und/oder das Allel spezifische homologe Genabschnitte identifiziert werden, die im wesentlichen keine Homologie zu anderen Genen aufweisen, bzw. im Falle hemmender RNAs im wesentlichen keine Homologie zu anderen, innerhalb der Zielzellen synthetisierten mRNAs aufweisen.

Alternativ zur direkten Beeinflussung der MHC-Gene bzw. der Transkription und/oder Translation, die zur Bildung von HLA führt, kann die Expression der an der Bildung der HLA beteiligten Moleküle, beispielsweise Tapasin, TAP etc. vermindert werden. Dies kann analog zum erfindungsgemäßen Verfahren durch den Einsatz hemmender RNAs, die für diese an der Bildung der HLA beteiligten Moleküle spezifisch sind, erzielt werden. In analoger Weise kann auch die Expression des Gens, das ein an der Bildung von HLA beteiligtes Molekül kodiert, durch Rekombination mit spezifischer homologer DNA vermindert werden, die eine zur Inaktivierung des Gens führende Mutation trägt.

Die erfindungsgemäße Verminderung der Expression von HLA I und/oder HLA II ist neben der medizinischen Anwendung zur Verhinderung der Abstoßung oder zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten auch dazu geeignet, Verbindungen und Verfahren für experimentelle Untersuchungen *in vivo* oder *in vitro* zur Funktion von HLA I und/oder HLA II bzw. von deren spezifischen Wechselwirkungspartnern bereitzustellen.

In bevorzugter Ausführungsform wird nur die Expression derjenigen Allele von HLA I und/oder HLA II vermindert, vorzugsweise vollständig unterdrückt, die an der Vermittlung der immunologischen Reaktion beteiligt sind. Auf diese Weise wird der Erkennungsmechanismus des Immunsystems nicht vollständig eliminiert, da diejenigen Allele von HLA I und/oder HLA II, die nicht an der Vermittlung der unerwünschten immunologischen Reaktion beteiligt sind, noch ihre natürliche Antigen präsentierende Funktion ausüben können.

In weiter bevorzugter Ausführung betrifft die Erfindung die organspezifische bzw. zelltypspezifische Verminderung bzw. Unterdrückung der Expression von HLA I und/oder HLA II.

In weiter bevorzugter Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung zusätzlich zur Verminderung der Expression von HLA I und/oder HLA II die Expression von HLA-G oder einer funktionellen Variante von HLA-G, die eine Erkennung durch NK-Zellen (natürliche Killerzellen) verhindert. Eine solche funktionelle Variante im Sinne der Erfindung ist ein an der Zelloberfläche angeordnetes Protein, das diejenigen strukturellen Eigenschaften von HLA I, HLA II oder HLA-G aufweist, die gegen den Angriff von NK-Zellen schützen. Ein Beispiel für eine solche funktionelle Variante von HLA-G ist ein HLA-Molekül, das vom Immunsystem toleriert wird, also z. B. ein HLA des Empfängers im Falle der HvG, im Falle der GvH ein HLA des Transplantats. In weiterer Ausgestaltung der funktionellen Variante von HLA-G ist vorgesehen, ein vom Immunsystem toleriertes HLA als Fusionsprotein mit einem autologen Peptid (vorzugsweise 8 bis 15, bevorzugter 9 Aminosäuren lang) in den immunologisch angegriffenen Zellen herstellen zu lassen, bei dem das autologe Peptid die Peptidbindungsstelle der funktionellen Variante dauerhaft ausfüllt.

Die Expression von HLA-G oder dessen funktioneller Variante ist insbesondere für den Fall vorgesehen, dass die Expression beider Allele von HLA I und/oder HLA II stark vermindert bzw. vollständig unterdrückt wird. Dabei dient die Expression von HLA-G insbesondere dem Schutz solcher Zellen, die kein HLA I exprimieren, gegenüber einem Angriff durch NK-Zellen.

Die Expression von HLA-G in Zellen, deren Expression von HLA I und/oder HLA II vermindert ist, kann ebenso wie die Einbringung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure zur

Verminderung der Immunreaktion, an der mindestens ein HLA beteiligt ist, durch bekannte gentechnische Mittel und Verfahren erreicht werden. Bevorzugt ist die Transfektion von Nucleinsäure, beispielsweise mittels der Lipofektion, Elektroporation oder CaPO₄-Methode, oder die Transduktion dieser Zellen mit einem Vektor innerhalb eines viralen Partikels, der eine Expressionskassette enthält, von der HLA-G oder dessen funktionelle Variante produziert werden kann. Besonders bevorzugt ist dabei, einen Promotor zu Regelung der Expression von HLA-G bzw. dessen funktioneller Variante zu verwenden, der konstitutiv, induzierbar oder reprimierbar ist. Besonders bevorzugt hat dieser Promotor ähnliche oder identische Eigenschaften wie der Promotor, der die Expression hemmender RNAs steuert. Überdies kann die Expressionskassette für HLA-G auf einem gemeinsamen Nucleinsäurekonstrukt mit der Expressionskassette vorliegen, die die hemmenden RNAs kodiert, vorzugsweise auf einem viralen, beispielsweise lentiviralen Vektor.

In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung ein Verfahren bereit, um die Expression von HLA I und/oder HLA II zu vermindern, vorzugsweise bis zu deren vollständiger Unterdrückung. Dies kann einen vollständigen Organismus, z.B. einen Menschen oder ein Tier und dessen MHC-Genprodukte betreffen, alternativ jedoch auch ein extrakorporales Organ, das als Transplantat in einen Empfänger eingesetzt wird. In letzterem Falle stellt die Erfindung ein Verfahren zur Transfektion oder Transduktion eines extrakorporalen Organs dar, dessen Zellen zumindest teilweise hemmende RNA unmittelbar oder in Form einer für hemmende RNA kodierenden Expressionskassette aufnehmen. In der Folge weist zumindest ein Teil der Zellen des extrakorporalen Transplantats die hemmende RNA oder eine Expressionskassette auf, die für hemmende RNA kodiert. Ein solches Transplantat kann anschließend in einen Empfänger eingesetzt werden, sodass die zur Transduktion verwendeten viralen Partikel bzw. zu Transformation verwendeten Nucleinsäurekonstrukte im wesentlichen nicht mehr aus dem Transplantat austreten und auf die Zellen des Empfängers übergehen können.

Weiterhin wird auf diese Weise einer Immunreaktion des Empfängers gegen das Transplantat vorgebeugt, das nun eine verminderte Anzahl bzw. keine HLA-Moleküle aufweist, die vom Immunsystem des Empfängers als fremd erkannt werden.

Insbesondere in Verbindung mit der gleichzeitigen oder zeitlich versetzten Transduktion oder Transfektion zumindest eines Teils der Zellen eines Transplantats mit einer

Expressionskassette, die für HLA-G kodiert, kann ein Transplantat erzeugt werden, das unabhängig von einer Kompatibilität mit dem Immunsystem eines Empfängers in diesen eingesetzt werden kann. Auf diese Weise wird das Problem der immunologischen Abstoßung umgangen, das nach dem Stand der Technik entweder eine möglichst vollständige Übereinstimmung der HLA I und/oder HLA II erforderte und üblicherweise eine ständige Unterdrückung der Aktivität des gesamten Immunsystems des Empfängers. Im Falle zellulärer Transplantate, beispielsweise von Stammzellen, wie denjenigen des Blutsystems, gegebenenfalls mit Ausnahme solcher des Immunsystems, können auf diese Weise Transplantate bereitgestellt werden, die keine inkompatiblen HLA I und/oder HLA II aufweisen und überdies teilbar bzw. *in vitro* kultivierbar sind.

Die erfindungsgemäße Verminderung der Expression von HLA I und/oder HLA II kann durch mehrere an sich bekannte Verfahren erfolgen, von denen die Verwendung von siRNA oder antisenseRNA, die als hemmende RNA in Bezug genommen werden, bevorzugt ist.

Die Einbringung bzw. Produktion von siRNA oder antisenseRNA bzw. von Ribozym in beabsichtigte Zielzellen kann *in vitro* oder *in vivo* durch Transfektion synthetisch hergestellter RNA oder eines RNA-Derivats (beispielsweise als Phosphothioat-Verbindung) erfolgen oder durch Transfektion oder Transduktion eines DNA-Konstrukts, das eine Expressionskassette zur Transkription enthält, von welcher die siRNA, Ribozym oder antisenseRNA synthetisiert wird.

Zur Synthese von siRNA kodiert eine solche Expressionskassette die komplementären Stränge der siRNA, wobei im Anschluß an den Promotor ein erster Abschnitt den sense-Strang (oder antisense-Strang) der siRNA kodiert, ein zweiter Abschnitt den komplementären antisense-Strang (oder sense-Strang) kodiert und zwischen diesen ein Scharnierbereich (Loop) kodiert wird. Erster und zweiter Abschnitt sind über vorzugsweise 19 bis 29 nt vollständig komplementär zueinander und weisen zusätzlich nicht-komplementäre Bereiche auf, nämlich vorzugsweise der erste Abschnitt in 5', der zweite Abschnitt in 3' mit einer Länge von 1 bis 8, bevorzugt 2 bis 3 Nukleotiden. Der Scharnierbereich hat bevorzugt eine Länge von 4 bis 11 Nukleotiden. Im Anschluß an die Transkription nimmt die RNA durch Hybridisieren des komplementären ersten und zweiten Abschnitts eine Haarnadelstruktur (short hairpin) ein, wobei die nicht-komplementären Bereiche von erstem und zweitem Abschnitt einzelsträngig vorliegen und bei der der Scharnierbereich die Biegung bildet. Durch

partielle Hydrolyse des Scharnierbereichs wird die shRNA in der Zelle zur funktionellen siRNA prozessiert (Castanotto et al., *RNA* 8, 1454-60 (2002)).

Zur Einbringung von hemmender RNA *in vivo* sind insbesondere virale Partikel geeignet, die zur transienten, bevorzugt dauerhaften Produktion der hemmenden RNA führen. Derartige virale Vektoren enthalten eine oder mehrere Expressionskassetten, von denen die hemmende RNA transkribiert wird. Durch Wahl geeigneter Promotoren kann die Transkription der hemmenden RNA konstitutiv sein, alternativ auch durch einen externen Induktor induziert oder durch einen externen Repressor reprimiert werden.

In bevorzugter Ausführungsform ist die Expressionskassette in einem lentiviralen Vektor enthalten, der stabil in das Genom von Zielzellen integriert, sodass die Expressionskassette in den Zielzellen dauerhaft zur Verfügung steht und z.B. bei konstitutiver Transkription der siRNA oder antisenseRNA kontinuierlich die Expression von HLA I und/oder HLA II vermindert, bis hin zur vollständigen Unterdrückung der Expression.

Weiter bevorzugt ist die zelltypspezifische bzw. organspezifische Transduktion von Zellen eines Transplantats mit einem viralen Partikel, das eine Expressionskassette aufweist, die für die erfindungsgemäße hemmende RNA kodiert. Auf diese Weise kann die Expression von HLA I und/oder HLA II allelspezifisch in dem Transplantat vermindert werden, vorzugsweise bis hin zur vollständigen Unterdrückung der Expression, ohne andere Zelltypen wesentlich zu beeinflussen. Die zelltypspezifische bzw. organspezifische Infektion mit einem viralen Vektor, der in einem viralen Partikel enthalten ist und eine Expressionskassette der erfindungsgemäßen siRNA oder antisenseRNA enthält, kann dadurch erreicht werden, dass der virale Partikel einen für die Zielzellen spezifischen Rezeptor aufweist. Derartige virale Rezeptoren können während der Erzeugung rekombinanter viraler Partikel in die Virushülle eingebaut werden, um so den rekombinanten viralen Partikel zu pseudotypisieren. Als Beispiel für einen unspezifischen Rezeptor eines viralen Partikels kann das Glycoprotein vom Virus der vesikulären Stomatitis, VSV-G, genannt werden.

Die bevorzugterweise zelltypspezifische Verminderung der Expression von HLA I und/oder HLA II kann dadurch erreicht werden, dass alternativ oder zusätzlich zur zelltypspezifischen Transduktion die für die siRNA oder antisenseRNA kodierenden Sequenzen von einem zelltypspezifischen Promotor transkribiert werden, sodass ein anderer Zelltyp, für den der

verwendete Promotor nicht spezifisch ist, die erfindungsgemäße siRNA oder antisenseRNA nicht transkribieren kann.

Sowohl die siRNA als auch antisenseRNA vermindern erfindungsgemäß die Expression von HLA I und/oder HLA II dadurch, dass sie mit der mRNA der entsprechenden HLA in Wechselwirkung treten und deren Translation verhindern. Dies kann klassen-, genort-, gruppen- oder allelspezifisch erfolgen. Im Falle von siRNA wird ein spezifischer Nukleasekomplex (RISC, RNA-induzierter Silencing Komplex) unter Vermittlung einer DNA-Helikase gebildet. Dabei führt der antisense-Strang der doppelsträngigen siRNA den aktivierten Nukleasekomplex zur Ziel-mRNA, woraufhin diese degradiert wird (Chiu et al., *J. Immunol* 169, 5754-60 (2002), Yu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 6047-52 (2002)).

Die Spezifität oder Selektivität hemmender RNAs, z.B. siRNA oder antisenseRNA, kann aus der Sequenz der HLA-Allele abgeleitet werden, deren Expression vermindert werden soll. Durch Auswahl geeigneter Zielsequenzen kann die Expression von HLA-Allelen hinsichtlich des gesamten Genorts, der gesamten Klasse (I und/oder II), einer bestimmten Gruppe von Allelen oder allelspezifisch vermindert werden. Als ein Beispiel führt die Verminderung der Expression der β -Ketten von HLA I (β 2-Mikroglobulin) durch Wechselwirkung zumindest eines Bereiches der mRNA für die konservierte Region der β -Ketten von HLA I mit einer hemmenden RNA zur Verminderung der Expression aller HLA I - Moleküle, unabhängig von deren Peptid-bindender Region α 1 bzw. α 2. Im Unterschied dazu kann die Expression eines spezifischen Allels von HLA I dadurch vermindert werden, dass eine hemmende RNA spezifisch mit der variablen Region seiner mRNA in Wechselwirkung tritt, beispielsweise mit einer Region für α 1 und/oder α 2, sodass nur die Expression dieses Allels vermindert wird.

Die Verminderung der Expression von HLA II kann klassenspezifisch durch Interaktion mit einer Nukleinsäure, beispielsweise einer hemmenden RNA erzielt werden, die mit einem Bereich der konservierten Region der mRNA von HLA II in Wechselwirkung tritt. Dies können die Bereiche sein, die die α -Kette, deren Bereiche für α 1, α 2, TM und/oder CP kodieren, sowie Bereiche, die die β -Kette, z.B. β 1, β 2, TM und/oder CP kodieren. Für eine genortspezifische Verminderung der HLA II sind beispielsweise Nukleinsäuren geeignet, die für die β -Ketten der HLA-spezifisch sind, z.B. für DRB1, DQB1. Für eine allelspezifische Verminderung der Expression von HLA II sind hemmende RNAs geeignet, die mit der variablen Region der HLA II kodierenden mRNA in Wechselwirkung treten, beispielsweise

mit den für die Peptidbindung verantwortlichen Domänen α 1 und/oder β 1. Grundsätzlich eignen sich zur Wechselwirkung mit hemmenden RNAs alle Bereiche der Gene für HLA I oder HLA II, einschließlich der Introns.

Zur Verdeutlichung wird nachfolgend auf die Figuren Bezug genommen, in denen

Figur 1 eine schematische Darstellung der Genbereiche von HLA I zeigt,
Figur 2 eine schematische Darstellung der Genbereiche von HLA II zeigt und
Figur 3 eine schematische Darstellung einer Expressionskassette für hemmende RNA zeigt.

In den Figuren 1 und 2 sind Genbereiche angegeben, die zur Hemmung durch hemmende RNAs geeignet sind. Dabei wird die Wechselwirkung hemmender RNAs mit konservierten Regionen die Expression des betreffenden HLA klassenspezifisch vermindern, die Wechselwirkung mit variablen Regionen hingegen typ- oder allelspezifisch. Für HLA I beträgt die Gesamtgröße des Gens 3,5 kb, das Peptid weist 341 Aminosäuren auf. Für HLA II beträgt die Gesamtgröße des Gens 14,5 kb, das Peptid weist 238 Aminosäuren auf.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen genauer beschrieben:

Beispiel 1: *In vitro* Hemmung der Expression von β 2m oder HLA-A durch siRNA in der Transkription- / Translationsreaktion

Zur Identifizierung geeigneter siRNA-Sequenzen zur spezifischen Verminderung der Expression von HLA wurden verschiedene siRNAs im eukaryotischen *in vitro* Transkriptions-/Translationssystem (Promega) getestet. Die Sequenzen der siRNAs wurden entweder manuell unter Berücksichtigung der Sequenzabweichungen der HLA-A schweren Kette oder mit Hilfe von computergestützten Algorithmen entworfen. Die Sequenzen der getesteten siRNAs sind in Tabellen 1 und 2 angegeben. Für die Experimente wurden beide Stränge der siRNA synthetisiert und als doppelsträngige siRNA eingesetzt. Als Testsystem für die zu verminderte Expression von HLA wurde die Transkription von einem Vektor bereitgestellt, der die vollständige Sequenz der cDNA von β 2m (Test der siRNA-Sequenzen von Tabelle 1) oder HLA-A (Test der siRNA-Sequenzen von Tabelle 2) zwischen einem T7-Promotor und einem poly A-Signal aufwies.

Die *in vitro* Transkription/Translation wurde mit 1 µg synthetischer siRNA und 500 ng Expressionsvektor durchgeführt. Nicht spezifische siRNAs wurden als Kontrollen eingesetzt. Die Reaktion wurde für 1 h bei 30 °C inkubiert, die Expression von β 2m oder der schweren Kette von HLA-A wurde durch spezifische ELISAs analysiert.

Die im *in vitro* Transkriptions-/Translationstest wirksamsten siRNAs aus Tabelle 1, die für β 2m spezifisch sind, sind die Seq.-ID Nrn. 14 und 15, die gegen die Zielsequenz Seq.-ID Nr. 13 gerichtet sind, bzw. Seq.-ID Nrn. 23 und 24, die gegen die Zielsequenz Seq.-ID Nr. 22 gerichtet sind. Die Anwesenheit dieser siRNAs führte zu einer Verminderung der Expression um 40%. Ohne Zusatz von siRNA wurde das vom Expressionsvektor kodierte Strukturgen bis zu einer Konzentration von 35,8 ng/mL produziert. Die in Tabelle 2 angegebenen siRNA-Sequenzen haben die jeweils angegebenen Spezifität und erwiesen sich alle als wirksam, die Translation von HLA-A zu vermindern.

Beispiel 2: *In vitro* Hemmung der Expression von β 2-Mikroglobulin in Zellen durch Transfektion mit synthetischer siRNA

SiRNAs, die die Expression von HLA in Beispiel 1 wirksam vermindern konnten, wurden in HeLa-, B-LCL und K 562- Zellen hinsichtlich transkribierten β 2-Mikroglobulins getestet. Zur Prüfung der Wirkung verschiedener synthetischer siRNA-Sequenzen, die gegen die schwere Kette von HLA-A gerichtet waren, wurden HLA-A* 68 (HeLa-Zellen und B-LCL) homozygote Zelllinien und eine heterozygote Zelllinie B-LCL (HLA-A* 24,68) verwendet. B-LCL und K 562- Zellen (jeweils 4×10^4) oder 1×10^5 HeLa-Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion ausplattiert. 1 µg chemisch synthetisierter doppelsträngiger siRNA (Tabellen 1 und 2) wurde in einem Gesamtvolumen von 400 µL unter Verwendung des Transfektionsreagenzes RNAiFect (Qiagen, Hilden, Deutschland) transfiziert. Die Effizienz der Transfektion wurde durch Lichtmikroskopie nach 3 Stunden Inkubation mit gemischten FITC-markierten siRNA-Duplexmolekülen bestimmt. Wiederholte Transfektionen wurden alle 48 Stunden durchgeführt. Die Zellen wurden für maximal 6 Tage inkubiert. Die Analyse der Proteinexpression wurde in B-LCL- und HeLa-Zellen durch Nachweis von Antigenen auf der Zelloberfläche bzw. in K 562-Zellen durch intrazelluläre Anfärbung unter Verwendung der Durchflußzytometrie nachgewiesen.

Die Transfektion von B-LCL- und K 562-Zellen mit synthetischen siRNAs, die für β -Mikroglobulin spezifisch waren, führte nach 5 Tagen zu einer Verminderung der Expression von 60%. Die gen- und gruppenspezifischen siRNAs, die für die mRNA der schweren Kette von HLA spezifisch waren, bewirkten im Anschluss an die Kultur der Zellen für 6 Tage eine Verminderung der Expression von HLA von bis zu 70% in B-LCL- und HeLa- Zellen.

Die gruppenspezifische siRNA-Sequenz, die hier getestet wurde, war gegen die Gruppe A28 gerichtet und wurde in einer heterozygoten Zelllinie (HLA A* 24,68) B-LCL getestet und bewirkte eine Verminderung der Expression von HLA A* 68 (Gruppe A28) um 70%, während keine Wirkung auf die Expression von HLA A* 24 (Gruppe A9) beobachtet wurde. Dies zeigt, dass eine allelspezifische Verminderung der Expression durch gruppenspezifisch hemmende RNA möglich ist.

Beispiel 3: *In vitro* Hemmung der Expression von β 2-Mikroglobulin in Zellen durch transkribierte siRNA

Zur Expression von siRNAs wurden deren Sequenzen in eine Expressionskassette kloniert. Diese Expressionskassetten wurden in Form doppelsträngiger, linearisierter DNA in B-LCL- und HeLa-Zellen unter Verwendung von siPORT XP-1 (Ambion) transfiziert.

Die Expressionskassette ist in Figur 3 gezeigt und eignet sich zur Transfektion oder, wenn sie in einen geeigneten viralen Vektor kloniert ist, der zumindest LTR-Sequenzen (Long Terminal Repeat, bevorzugt SIN, self inactivating) und ein Verpackungssignal enthält, zur Transduktion. Gezeigt sind der menschliche U6- (U6 Polymerase III) bzw. der H1-Promotor mit dem Terminator zur U6 Polymerase III. Die shRNA ist eine short hairpin RNA, die *in vivo* zu siRNA prozessiert wird. Beispiele für die in Expressionskassetten einklonierten Sequenzen, die shRNA kodieren, sind in Beispiel 4 angegeben.

Beispiel 4: *In vivo* Hemmung der Expression von HLA in Zellen durch Transduktion

Zur stabilen Verminderung der Expression von HLA in B-LCL- und HeLa-Zellen wurden Plasmide und lentivirale Expressionsvektoren verwendet. Die verwendeten siRNA-Sequenzen sind in Tabelle 3 gezeigt und wurden in Form von DNA-Oligonukleotiden in eine Expressionskassette nach Beispiel 3 kloniert. Die Sequenzen der Oligonukleotide in Tabelle 3

kodieren eine shRNA. Die Expressionskassette war in einen bakteriellen Vektor gemäß den Anweisungen des Herstellers inkloniert worden.

Beispiel 5: Transfektion von B-LCL- und HeLa-Zellen mit Vektoren, die shRNA kodieren

6 x 10⁶ B-LCL- oder HeLa-Zellen wurde in RPMI (Cambrex, Verviers, Belgien) resuspendiert (1 x 10⁶ / mL), mit 10% hitzeinaktiviertem FBS, 1% Penicillin und Streptomycin supplementiert und mit 12 µg Plasmid, das für die shRNA kodiert, unter Verwendung von 36 µL Lipofectamin 2000 (Invitrogen, Carlsbad, USA) transfiziert. Die Lipidkomplexe wurden in einem Volumen von 3 mL Serum reduziertem Medium (Invitrogen) zusammengefügt und vor Zugabe zu den Zellen in 5 mL RPMI verdünnt. Nach Inkubieren der Zellen über Nacht wurden sie gewaschen und in normalem Medium kultiviert. Die Ergebnisse wurden am 4. Tag durch FACS-Analyse bestimmt.

Bei der Transfektion von HeLa- und B-LCL- Zellen mit siRNA- Expressionskassetten war der Promotor U6 effizienter bei der Verminderung der Expression von HLA als der Promotor H1.

Nach der Transfektion von sowohl HeLa- als auch B-LCL- Zellen mit dem Vektor pENTR/U6 wurde 6 Tage nach der Transfektion des Vektors, der eine shRNA mit Spezifität für die schwere Kette von HLA-A kodierte, eine Verminderung der Expression um 40% beobachtet.

Beispiel 6: Lentiviraler Expressionsvektor

Zur Konstruktion eines lentiviralen Vektors, der die shRNA-Sequenzen kodiert, wurde der lentivirale Expressionsvektor pLenti6 / BLOCK-iT DEST (Invitrogen) verwendet. Die Expressionskassetten wurden von den in Beispiel 4 verwendeten Vektoren gemäß den Anweisungen des Herstellers (Gateway Technologie) übernommen.

Beispiel 7: Produktion lentiviraler Partikel

HEK293 FT-Zellen wurden in DMEM (Cambrex, Verviers, Belgien), mit 10% hitzeinaktiviertem FBS, 2 mM Glutamin, 0,1 mM nicht-essentiellen Aminosäuren, 1% Penicillin/Streptomycin und 500 µg/mL G 418 supplementiert, kultiviert.

9 µg der vom Hersteller (Invitrogen) bereitgestellten Mischung ViraPower, die verteilt auf drei Plasmide ein gag/pol-Fusionsprotein (pLP1), eine virale reverse Transkriptase (pLP2) und, auf einem dritten Plasmid, (pLP/ VSV G) das VSV-G- Protein kodiert, sowie 3 µg des gemäß Beispiel 6 hergestellten lentiviralen Vektors, der für die spezifische shRNA kodiert, wurden zur Transfektion von 6×10^6 HEK293-Zellen unter Verwendung von Lipofectamin 2000 gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. Virale Partikel wurden aus dem Überstand nach 48 h geerntet, zentrifugiert und zur Entfernung von Zellresten filtriert.

Beispiel 8: Transduktion von B-LCL- und HeLa-Zellen

4×10^4 B-LCL- oder HeLa-Zellen wurde in 2 mL Überstand viraler Partikel resuspendiert und in einer 6 – Napf-Platte ausplattiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (900 upm) für 2 Stunden bei 32 °C in Gegenwart von 6 µg/mL Polybrene transduziert. Die Zellen wurden dann über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen gewaschen und in frischem Kulturmedium kultiviert. Am dritten Tag wurden die Zellen in selektives Medium mit 3 µg/mL (HeLa) bzw. 6 µg/mL (B-LCL) Blasticidin (Invitrogen) überführt. Die Expression von HLA wurde durch FACS am 6., 15. und 30. Tag analysiert. Zur Kontrolle wurde die Expression von Lamin A/C durch Analyse im Westernblot am 6. und 30. Tag bestimmt.

6 Tage nach Transduktion von HeLa- und B-LCL- Zellen mit einem lentiviralen Partikel, der eine für HLA-A spezifische shRNA kodierte, wurde eine Verminderung der Expression um 60% bzw. 50% beobachtet. Nach 30 Tagen wurde eine Verminderung der Expression von HLA-A um 70% in beiden Zelllinien beobachtet. Die HeLa- und B-LCL-Zellen, die zur Kontrolle mit einem lentiviralen Vektor transduziert waren, der eine für Lamin spezifische siRNA kodierte, zeigte eine Verminderung der Expression von Lamin, jedoch eine unveränderte Expression von HLA.

Tabelle 1: Sequenzen der siRNA, die spezifisch gegen β 2-Mikroglobulin gerichtet sind

Zielsequenz in β 2-Mikroglobulin	siRNA Duplex
Seq ID Nr. 1: 5'AAAAAGTGGAGCATTTCAGACT3'	Seq ID Nr. 2: 5'AAAGUGGAGCAUUCAGACUTT3' Seq ID Nr. 3: 3' TTUUUCACCUCGUAAGUCUGA5'
Seq ID Nr. 4: 5'AAGATGAGTATGCCTGCCGTG3'	Seq ID Nr. 5: 5'GAUGAGUAUGCCUGCCGUGTT3' Seq ID Nr. 6: 3'TTCUACUCAUACGGACGGCAC5'
Seq ID Nr. 7: 5'AATCTCTTGCCTCAAAGCTT3'	Seq ID Nr. 8: 5'UCUCUUGCACUCAAGCUUTT3' Seq ID Nr. 9: 3'TTAGAGAACGUGAGUUUCGAA5'
Seq ID Nr. 10: 5'AAGTAAGGCATGGTTGTGGTT3'	Seq ID Nr. 11: 5'GUAAGGCAUGGUUGUGGUUTT3' Seq ID Nr. 12: 3'TTCAUUCCGUACCAACACCAA5'
Seq ID Nr. 13: 5'TCCATCCGACATTGAAGTT3'	Seq ID Nr. 14: 5'UCCAUCCGACAUUGAAGUUTT3' Seq ID Nr. 15: 3'TTAGGUAGGCUGUAACUUCAA5'
Seq ID Nr. 16: 5'TTCGAAGCTTGAAGGTAA3'	Seq ID Nr. 17: 5'UUCGAAGCUUGAAGGUAATT3' Seq ID Nr. 18: 3'TTAAGCUUCGAACUCCAUU5'
Seq ID Nr. 19: 5'TTCTACGCGTACCGGTCAT3'	Seq ID Nr. 20: 5'UUCUACGCGUACCGUCAUTT3' Seq ID Nr. 21: 3'TTAAGAUGCGCCAUGGCCAGUA3'

Seq ID Nr. 22: 5'CAGGTTTACTCACGTCATCCA3'	Seq ID Nr. 23: 5'GGUUUACUCACGUCAUCCATT3' Seq ID Nr. 24: 3'GTCCAAAUGAGUGCAGUAGGU5'
Seq ID Nr. 25: 5'AAGTGGGATCGAGACATGTAA3'	Seq ID Nr. 26: 5'GUGGGAUCGAGACAUGUAATT3' Seq ID Nr. 27: 3'TTCACCCUAGCUCUGUACAUUS'

Tabelle 2: Sequenzen der siRNAs, die spezifisch gegen die schwere Kette von HLA-A gerichtet sind

Zielsequenz in der schweren Kette von HLA-A	siRNA Duplex	Spezifität
Seq ID Nr. 28: 5'GAGATACACCTGCCAT GTGC 3'	Seq ID Nr. 29: 5'AGAUACACCUGCCAUGUGCTT3' Seq ID Nr. 30: 3'TCUCUAUGUGGACGGUACACG5'	HLA-A
Seq ID Nr. 31: 5'AAGAGCTCAGATAGA AAAGGA 3'	Seq ID Nr. 32: 5'GAGCUCAGAUAGAAAAGGATT3' Seq ID Nr. 33: 3'TTCUCGAGUCUAUCUUUCCU5'	HLA-A
Seq ID Nr. 34: 5'AACACACGGAATGTG AAGGCC 3'	Seq ID Nr. 35: 5'CACACGGAAUGUGAAGGCCTT3' Seq ID Nr. 36: 3'TTGUGUGCCUUACACUCCGG5'	HLA-A Gruppen A10, A28
Seq ID Nr. 37: 5'AAAAGGAGGGAGCTA CTCTCA 3'	Seq ID Nr. 38: 5'AAGGAGGGAGCUACUCUCATT3' Seq ID Nr. 39: 3'TTUUCCUCCUCGAUGAGAGUS'	HLA-A Gruppen A2, A9, A10

Seq ID Nr. 40: 5'GACGAGGAGACAGGG AAAG 3'	Seq ID Nr. 41: 5'GACGAGGAGACAGGGAAAGTT3' Seq ID Nr. 42: 3'TTCUGCUCCUCUGUCCCUUUC5'	HLA-A Gruppe A9
Seq ID Nr. 43: 5'AAGACGAGGAGACAG GGAAAG 3'	Seq ID Nr. 44: 5'AAGACGAGGAGACAGGGAAAGTT3' Seq ID Nr. 45: 3'TTCUGCUCCUCUGUCCCUUUC5'	HLA-A Gruppe A9
Seq ID Nr. 46: 5'TACCAGCAGGACGCTT ACGA 3'	Seq ID Nr. 47: 5'UACCAGCAGGACGCUUACGATT3' Seq ID Nr. 48: 3'TTAUGGUCGUCCUGCGAAUGCU5'	HLA-A Gruppe A10
Seq ID Nr. 49: 5'AATACCAGCAGGACG CTTACGA 3'	Seq ID Nr. 50: 5'AAUACCAGCAGGACGCUUACGATT3' Seq ID Nr. 51: 3'TTAUGGUCGUCCUGCGAAUGCU5'	HLA-A Gruppe A10
Seq ID Nr. 52: 5'AAGTGGGTGGCTGTG GTGGTC3'	Seq ID Nr. 53: 5'GUGGGUGGCUGUGGUGGUUCTT3' Seq ID Nr. 54: 3'TTCACCCACCGACACCACCAG5'	HLA-A Gruppe A28
Seq ID Nr. 55: 5'AAAAGTGGGTGGCTG TGGTGGTC3'	Seq ID Nr. 56: 5'AAAAGUGGGUGGCUGUGGUGGUUCTT3' Seq ID Nr. 57: 3'TTUUCACCCACCGACACCACCAG5'	HLA-A Gruppe A28

Tabelle 3: Sequenzen der shRNAs, die in die Expressionskassette kloniert wurden

Orientierung	shRNA 5'-3'	Spezifität
sense-Strang	Seq ID Nr. 58: CACCGAGAGATACACCTGCCATGTGCGCAAGCACAT GGCAGGTGTATCTCT	HLA-A
antisense-Strang	Seq ID Nr. 59: AAAAAGAGATACACCTGCCATGTGCTTGCACACATG GCAGGTGTATCTCTC	
sense-Strang	Seq ID Nr. 60: CACCGCAGGTTTACTCACGTCATCCACGAATGGATGA CGTGAGTAAACCTG	β2m
antisense-Strang	Seq ID Nr. 61: AAAACAGGTTTACTCACGTCATCCATTCGTGGATGAC GTGAGTAAACCTGC	
sense-Strang	Seq ID Nr. 62: CACCGTCCATCCGACATTGAAGTTAACGAACTTCAAT GTCGGATGGA	β2m
antisense-Strang	Seq ID Nr. 63: AAAATCCATCCGACATTGAAGTTCGTTAACTTCAATG TCGGATGGAC	

Die hier angegebenen Sequenzen Seq ID Nrn. 1 bis 63 sind in 5'-3'Richtung im Anhang als Sequenzen 1 bis 63 enthalten.

Die Seq. ID Nrn 58 und 59, 60 und 61, bzw. 62 und 63 bilden jeweils ein doppelsträngiges DNA-Fragment, das zur Transkription einer shRNA hinter einen Promotor kloniert werden kann, um nach zellinterner Prozessierung funktionelle siRNA in Form eines RNA-Duplex zu bilden.

Besonders bevorzugt sind siRNAs mit einer Länge von 21 Nukleotiden mit 3'-Überhängen. Denn derartige siRNA-Sequenzen können die Ziel-mRNA wirksam binden und zu deren Abbau führen, ohne dass es zu einer Aktivierung des Interferon-Systems kommt (Elbashir et al., *Nature* 411, 494-98 (2001), McManus et al., *J. Immunol.* 169, 5754-60 (2002)).

Ansprüche

1. Nukleinsäure zur Verminderung einer Immunreaktion, an der zumindest ein HLA-Molekül beteiligt ist, wobei die Nukleinsäure die Expression zumindest eines HLA vermindert.
2. Nukleinsäure nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure DNA ist, die das HLA-Gen durch Rekombination inaktiviert.
3. Nukleinsäure nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die DNA zumindest eine Mutation in regulatorische und/oder strukturelle Bereiche des HLA-Gens einführt.
4. Nukleinsäure nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure eine hemmende RNA ist, die die Expression des HLA-Gens durch Wechselwirkung mit dessen mRNA vermindert.
5. Nukleinsäure nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure eine Phosphothioat-Verbindung, eine siRNA oder eine antisenseRNA oder eine enzymatisch aktive RNA, die mRNA degradiert, ist.
6. Nukleinsäure nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure eine siRNA ist, die von den Seq ID Nrn. 14 und 15, Seq ID Nrn. 23 und 24, Seq ID Nrn. 29 und 30, Seq ID Nrn. 32 und 33, Seq ID Nrn. 35 und 36, Seq ID Nrn. 38 und 39, Seq ID Nrn. 41 und 42, Seq ID Nrn. 44 und 45, Seq ID Nrn. 47 und 48, Seq ID Nrn. 50 und 51, Seq ID Nrn. 53 und 54, Seq ID Nrn. 56 und 57, Seq ID Nrn. 58 und 59, Seq ID Nrn. 60 und 61 und/oder Seq ID Nrn. 62 und 63 kodiert wird.
7. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die RNA von einer Expressionskassette kodiert wird, von der sie transkribiert werden kann.
8. Nukleinsäure nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Expressionskassette in einem viralen, vorzugsweise in einem lentiviralen Vektor enthalten ist.

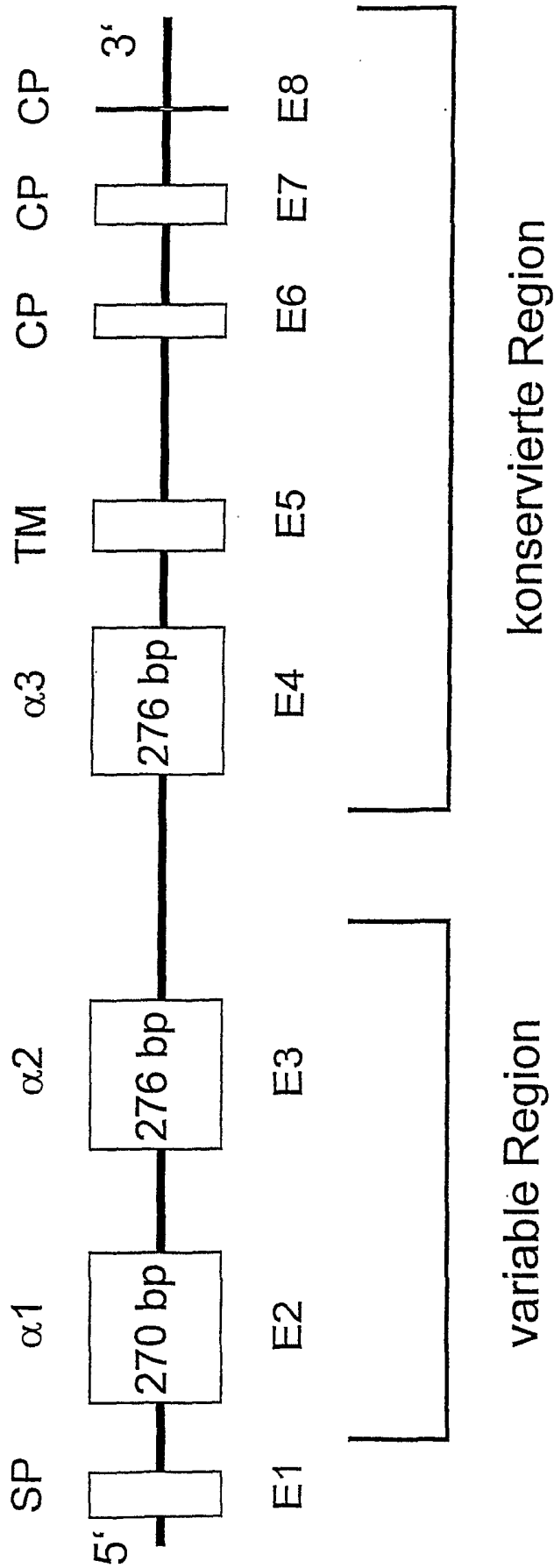
9. Nukleinsäure nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass diese weiterhin eine Expressionskassette umfasst, von der HLA-G oder eine funktionelle Variante dessen exprimiert werden kann.
10. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 4 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure einen gewebsspezifischen konstitutiven, induzierbaren oder reprimierbaren Promotor zur Steuerung der Transkription der hemmenden RNA aufweist.
11. Nukleinsäure nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure einen gewebsspezifisch konstitutiven, induzierbaren oder reprimierbaren Promotor zur Steuerung der Transkription des Gens aufweist, dass für HLA-G oder eine funktionelle Variante dessen kodiert.
12. Nukleinsäure nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Behandlung von Autoimmun-Erkrankungen.
13. Nukleinsäure nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass diese spezifisch mit der α -Kette einer Nukleinsäure in Wechselwirkung tritt, die für HLA I kodiert.
14. Nukleinsäure nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass diese spezifisch mit der Nukleinsäure in Wechselwirkung tritt, die für die β -Kette von HLA I kodiert.
15. Nukleinsäure nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure spezifisch mit der Nukleinsäure in Wechselwirkung tritt, die für mindestens eine der Regionen α 1 oder α 2 von HLA I kodiert.
16. Nukleinsäure nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass diese spezifisch mit mindestens einer der Nukleinsäuren in Wechselwirkung tritt, die für die α -Kette oder β -Kette von HLA II kodiert.

17. Nukleinsäure nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass diese spezifisch mit der Nukleinsäure in Wechselwirkung tritt, die für mindestens eine der Regionen α 1 oder β 1 von HLA II kodiert.
18. Viraler Partikel, dadurch gekennzeichnet, dass er eine Nukleinsäure nach einem der vorangehenden Ansprüche umfasst.
19. Viraler Partikel nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass der virale Partikel einen Rezeptor zur zelltypspezifischen oder organspezifischen Wechselwirkung mit Zellen des Transplantats oder des Empfängers aufweist.
20. Nukleinsäure einem der Ansprüche 1 bis 17 oder viraler Partikel nach Anspruch 18 oder 19 zur Behandlung der Immunreaktion zwischen einem Transplantat und einem Empfänger.
21. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Unterdrückung der immunvermittelten Abstoßungsreaktion oder einer Autoimmun-Erkrankung, die eine Nukleinsäure einem der Ansprüche 1 bis 17 oder einen viralen Partikel nach Anspruch 18 oder 19 aufweist.
22. Transplantat, das eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 17 aufweist.
23. Verfahren zur Beeinflussung der Immunreaktion, die unter Beteiligung von HLA I und/oder HLA II abläuft, *in vitro*, gekennzeichnet durch die Verwendung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 17 oder eines viralen Partikels nach einem der Ansprüche 17 oder 18.
24. Verfahren zur Verminderung der Immunreaktion bei einer Transplantation, gekennzeichnet durch die Verwendung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 17 oder eines viralen Partikels nach einem der Ansprüche 17 oder 18.
25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass ein Transplantat extrakorporal vor der Einsetzung in den Empfänger mit einer Nukleinsäure nach

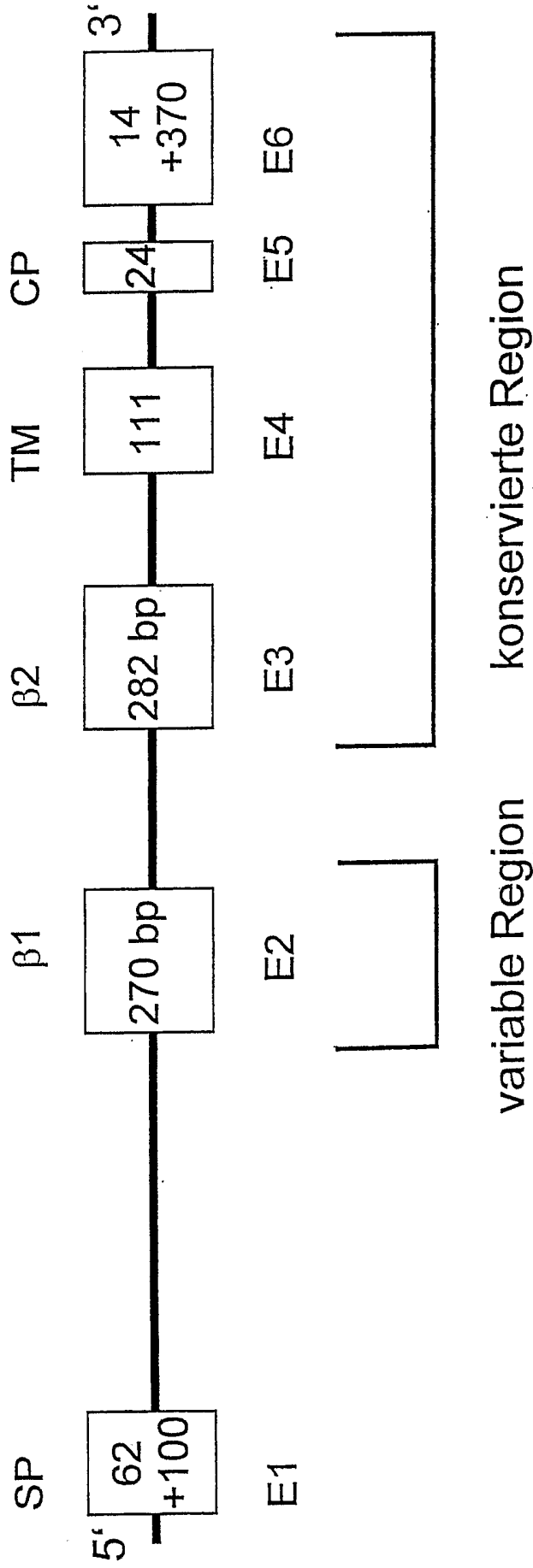
einem der Ansprüche 1 bis 17 oder einem viralen Partikel nach einem Ansprüche 18 oder 19 behandelt wird.

26. Organ, dass durch ein Verfahren nach Anspruch 25 erhältlich ist.

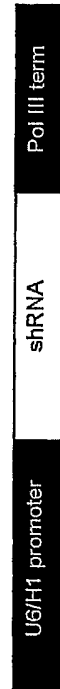
Figur 1



Figur 2



Figur 3



MHH-Błasczyk.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> Medizinische Hochschule Hannover
Blasczyk, Rainer
Seltsam, Axel
Ferreira de Figueiredo, Constanca Sofia

<120> Verbindungen und Verfahren zur Immunsuppression

<130> N1007PCT

<160> 63

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 21
<212> DNA
<213> mammalian

<400> 1
aaaaagtgga gcattcagac t 21

<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> siRNA

<400> 2
aaaguggagc auucagacut t 21

<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

MHH-Błasczyk.ST25

<220>

<223> siRNA

<400> 3
agucugaaug cuccacuuut t 21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> mammalian

<400> 4
aagatgagta tgcctgccgt g 21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 5
gaugaguaug ccugccgugt t 21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 6
cacggcaggc auacucuact t 21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> mammalian

MHH-Błasczyk.ST25

<400> 7
aatctcttgc actcaaagct t 21

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA

<400> 8
ucucuugcac ucaaagcuut t 21

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA

<400> 9
aagcuuugag ugcaagagat t 21

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> mammalian

<400> 10
aagtaaggca tggttgtggt t 21

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA

MHH-Błasczyk.ST25

<400> 11
guaaggcaug guugugguut t 21

<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA

<400> 12
aaccacaacc augccuuact t 21

<210> 13
<211> 19
<212> DNA
<213> mammalian

<400> 13
tccatccgac attgaagtt 19

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA

<400> 14
uccauccgac auugaaguut t 21

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA

MHH-Błasczyk.ST25

<400> 15
aaccucaaug ucggauggat t 21

<210> 16
<211> 18
<212> DNA
<213> mammalian

<400> 16
ttcgaagcct gaaggtaa 18

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA

<400> 17
uucgaagcuu gaagguaatt 20

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA

<400> 18
uuaccuucaa gcuucgaatt 20

<210> 19
<211> 19
<212> DNA
<213> mammalian

<400> 19
ttctacgct accggtcat 19

<210> 20

MHH-Błasczyk.ST25

<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA
<400> 20
uucuacgcu accgucautt 20

<210> 21
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA
<400> 21
augaccgua ccgcuagaa tt 22

<210> 22
<211> 21
<212> DNA
<213> mammalian

<400> 22
caggttact cacgtcatcc a 21

<210> 23
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA
<400> 23
gguuuacuca cgucauccat t 21

<210> 24

MHH-Błasczyk.ST25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 24

uggaugacgu gaguaaacct g

21

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> mammalian

<400> 25

aagtgggatc gagacatgta a

21

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 26

gugggaucga gacauguaat t

21

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 27

uuacaugucu cgaucccact t

21

<210> 28

<211> 20

MHH-Błasczyk.ST25

<212> DNA

<213> mammalian

<400> 28

gagatacacc tgccatgtgc

20

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 29

agauacaccu gccauguct t

21

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 30

gcacauggca gguguaucuc t

21

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> mammalian

<400> 31

aagagctcag atagaaaagg a

21

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

MHH-Błasczyk.ST25

<220>

<223> siRNA

<400> 32

gagcucagau agaaaaggat t

21

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 33

uccuuuucua ucugagcuct t

21

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> mammalian

<400> 34

aacacacgga atgtgaaggc c

21

<210> 35

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 35

cacacggaau gugaaggcct t

21

<210> 36

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

MHH-Błasczyk.ST25

<220>

<223> siRNA

<400> 36

ggccuucaca uccgugugt t

21

<210> 37

<211> 21

<212> DNA

<213> mammalian

<400> 37

aaaaggaggg agctactctc a

21

<210> 38

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 38

aaggaggagg cuacucucat t

21

<210> 39

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 39

ugagaguagc uccuccuut t

21

<210> 40

<211> 19

<212> DNA

<213> mammalian

MHH-Błasczyk.ST25

<400> 40
gacgaggaga cagggaaag 19

<210> 41

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 41
gacgaggaga cagggaaagt t 21

<210> 42

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 42
cuuucccugu cuccucguct t 21

<210> 43

<211> 21

<212> DNA

<213> mammalian

<400> 43
aagacgagga gacagggaaa g 21

<210> 44

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 44

aagacgagga gacagggaaa gtt	MHH-Błasczyk.ST25	23
<210> 45		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> siRNA		
<400> 45 cuuucccugu cuccucguct t		21
<210> 46		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> mammalian		
<400> 46 taccagcagg acgcttacga		20
<210> 47		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> siRNA		
<400> 47 uaccagcagg acgcuuacga tt		22
<210> 48		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> siRNA		
<400> 48 ucguaagcgu ccugcuggua tt		22

MHH-Błasczyk.ST25

<210> 49

<211> 22

<212> DNA

<213> mammalian

<400> 49

aataccagca ggacgcttac ga

22

<210> 50

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 50

aauaccagca ggacgcuuac gatt

24

<210> 51

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 51

ucguaagcgu ccugcuggua tt

22

<210> 52

<211> 21

<212> DNA

<213> mammalian

<400> 52

aagtgggtgg ctgtgggtgt c

21

<210> 53

<211> 21

MHH-Błasczyk.ST25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 53

guggguggcu guggugguct t

21

<210> 54

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 54

gaccaccaca gccaccact t

21

<210> 55

<211> 23

<212> DNA

<213> mammalian

<400> 55

aaaagtgggt ggctgtggtg gtc

23

<210> 56

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 56

aaaagugggu ggcuguggug guctt

25

<210> 57

<211> 23

MHH-Błasczyk.ST25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 57

gaccaccaca gccaccacu utt

23

<210> 58

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 58

caccgagaga tacacctgcc atgtgcgcaa gcacatggca ggtgtatctc t

51

<210> 59

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 59

aaaaagagat acacctgcca tgtgcttgcg cacatggcag gtgtatctct c

51

<210> 60

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 60

caccgcaggt ttactcacgt catccacgaa tggatgacgt gagtaaacct g

51

<210> 61

MHH-Błasczyk.ST25

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 61

aaaacagggt tactcacgtc atccattcgt ggatgacgtg agtaaacctg c

51

<210> 62

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 62

caccgtccat ccgacattga agttaacgaa cttcaatgtc ggatgga

47

<210> 63

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 63

aaaatccatc cgacattgaa gttcgttaac ttcaatgtcg gatggac

47

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE2004/000956

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/11 A61K48/00 A61K31/70

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N

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

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

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BLOM DANIEL ET AL: "A glycosylated type I membrane protein becomes cytosolic when peptide: N-glycanase is compromised." EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL, vol. 23, no. 3, 11 February 2004 (2004-02-11), pages 650-658, XP002303932 ISSN: 0261-4189 abstract page 657, paragraph 1; figures 1,2 ----- -/--	1-26

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

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

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

Date of the actual completion of the international search

5 November 2004

Date of mailing of the international search report

01.03.05

Name and mailing address of the ISA

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

Authorized officer

Mossier, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE2004/000956

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WENGENMAYER TOBIAS ET AL: "Inhibition of HLA-G production in JEG-3 choriocarcinoma cells by RNA interference." AMERICAN JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY (NEW YORK, N.Y. : 1989) MAR 2004, vol. 51, no. 3, March 2004 (2004-03), pages 189-191, XP009039366 ISSN: 1046-7408 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-26
Y	<p>WO 03/104456 A (LONDON HEALTH SCIENCES CT RES ; HILL JONATHAN (CA); ICHIM THOMAS (CA);) 18 December 2003 (2003-12-18) the whole document insbesonders page 14, line 8 - line 16</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-26
Y	<p>WO 03/062394 A (BEACH DAVID H ; CAUDY AMY (US); HAMMOND SCOTT (US); BERNSTEIN EMILY (U) 31 July 2003 (2003-07-31) abstract page 25, line 31 - page 42, line 33; claims 30-35</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-26
A	<p>WO 95/06718 A (VIAGENE INC) 9 March 1995 (1995-03-09) abstract page 6, line 1 - page 7, line 25 page 13, line 24 - page 14, line 25; claim 5; example 3</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-26
A	<p>EP 0 601 585 A (ENZO THERAPEUTICS INC) 15 June 1994 (1994-06-15) abstract examples 1-7</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-26
E	<p>WO 2004/085654 A (ANDREWS PETER ; AXORDIA LTD (GB); WALSH JIM (GB); GOKHALE PAUL (GB); M) 7 October 2004 (2004-10-07) abstract page 24, line 10 - line 15 page 33, line 1 - line 5</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-19
T	<p>FIGUEIREDO CONSTANCA ET AL: "HLA silencing by RNAi-mediated transcript targeting" GENES AND IMMUNITY, vol. 5, no. Suppl. 1, May 2004 (2004-05), page S6, XP009039365 & 18TH EUROPEAN HISTOCOMPATIBILITY CONFERENCE; SOFIA, BULGARIA; MAY 08-11, 2004 ISSN: 1466-4879 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-26
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE2004/000956

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TIJSTERMAN M ET AL: "THE GENETICS OF RNA SILENCING" ANNUAL REVIEW OF GENETICS, ANNUAL REVIEWS INC., PALO ALTO, CA, US, vol. 36, 2002, pages 489-519, XP009013370 ISSN: 0066-4197	
A	----- WO 03/070744 A (MCSWIGGEN JAMES ; THOMPSON JAMES (US); BEIGELMAN LEONID (US); RIBOZYME) 28 August 2003 (2003-08-28) -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE2004/000956

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

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

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

Although claims 24 and 25 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the stated effects of the compound or composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

See supplemental sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-26 (all in part)

Remark on Protest

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

Box III

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

1. Claims 1-26 (all in part)

siRNA which is coded for by SEQ ID NOs. 14 and 15 and vectors, viral particles, transplants and methods derived therefrom.

2. Claims 1-26 (all in part)

siRNA which is coded for by SEQ ID NOs. 23 and 24 and vectors, viral particles, transplants and methods derived therefrom.

3. Claims 1-26 (all in part)

siRNA which is coded for by SEQ ID NOs. 29 and 30 and vectors, viral particles, transplants and methods derived therefrom.

4. Claims 1-26 (all in part)

siRNA which is coded for by SEQ ID NOs. 32 and 33 and vectors, viral particles, transplants and methods derived therefrom.

5. Claims 1-26 (all in part)

siRNA which is coded for by SEQ ID NOs. 35 and 36 and vectors, viral particles, transplants and methods derived therefrom.

6. Claims 1-26 (all in part)

siRNA which is coded for by SEQ ID NOs. 38 and 39 and vectors, viral particles, transplants and methods derived therefrom.

7. Claims 1-26 (all in part)

siRNA which is coded for by SEQ ID NOs. 41 and 42 and vectors, viral particles, transplants and methods derived therefrom.

8. Claims 1-26 (all in part)

siRNA which is coded for by SEQ ID NOs. 44 and 45 and vectors, viral particles, transplants and methods derived therefrom.

9. Claims 1-26 (all in part)

siRNA which is coded for by SEQ ID NOs. 47 and 48 and vectors, viral particles, transplants and methods derived therefrom.

10. Claims 1-26 (all in part)

siRNA which is coded for by SEQ ID NOs. 50 and 51 and vectors, viral particles, transplants and methods derived therefrom.

11. Claims 1-26 (all in part)

siRNA which is coded for by SEQ ID NOs. 53 and 54 and vectors, viral particles, transplants and methods derived therefrom.

12. Claims 1-26 (all in part)

siRNA which is coded for by SEQ ID NOs. 56 and 57 and vectors, viral particles, transplants and methods derived therefrom.

13. Claims 1-26 (all in part)

siRNA which is coded for by SEQ ID NOs. 58 and 59 and vectors, viral particles, transplants and methods derived therefrom.

14. Claims 1-26 (all in part)

siRNA which is coded for by SEQ ID NOs. 60 and 61 and vectors, viral particles, transplants and methods derived therefrom.

15. Claims 1-26 (all in part)

siRNA which is coded for by SEQ ID NOs. 62 and 63 and vectors, viral particles, transplants and methods derived therefrom.

16. Claims 1-26 (all in part)

Nucleic acids such as antisense RNA, ribozymes, etc. which are not covered by inventions 1 to 15 and vectors, viral particles, transplants and methods derived therefrom.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE2004/000956

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03070744	A	CA 2476112 A1	28-08-2003
		CA 2476394 A1	28-08-2003
		CA 2477014 A1	28-08-2003
		EP 1432724 A1	30-06-2004
		EP 1463842 A1	06-10-2004
		EP 1472265 A2	03-11-2004
		EP 1465910 A2	13-10-2004
		EP 1423404 A2	02-06-2004
		EP 1442143 A2	04-08-2004
		EP 1448590 A2	25-08-2004
		EP 1432725 A1	30-06-2004

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2004/000956

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12N15/11 A61K48/00 A61K31/70		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, Sequence Search		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	BLOM DANIEL ET AL: "A glycosylated type I membrane protein becomes cytosolic when peptide: N-glycanase is compromised." EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL, Bd. 23, Nr. 3, 11. Februar 2004 (2004-02-11), Seiten 650-658, XP002303932 ISSN: 0261-4189 Zusammenfassung Seite 657, Absatz 1; Abbildungen 1,2 ----- -/--	1-26
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 5. November 2004		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 01.03.05
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Mossier, B

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE2004/000956

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>WENGENMAYER TOBIAS ET AL: "Inhibition of HLA-G production in JEG-3 choriocarcinoma cells by RNA interference." AMERICAN JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY (NEW YORK, N.Y. : 1989) MAR 2004, Bd. 51, Nr. 3, März 2004 (2004-03), Seiten 189-191, XP009039366 ISSN: 1046-7408 das ganze Dokument</p>	1-26
Y	<p>WO 03/104456 A (LONDON HEALTH SCIENCES CT RES ; HILL JONATHAN (CA); ICHIM THOMAS (CA);) 18. Dezember 2003 (2003-12-18) das ganze Dokument insbesondere Seite 14, Zeile 8 - Zeile 16</p>	1-26
Y	<p>WO 03/062394 A (BEACH DAVID H ; CAUDY AMY (US); HAMMOND SCOTT (US); BERNSTEIN EMILY (U) 31. Juli 2003 (2003-07-31) Zusammenfassung Seite 25, Zeile 31 - Seite 42, Zeile 33; Ansprüche 30-35</p>	1-26
A	<p>WO 95/06718 A (VIAGENE INC) 9. März 1995 (1995-03-09) Zusammenfassung Seite 6, Zeile 1 - Seite 7, Zeile 25 Seite 13, Zeile 24 - Seite 14, Zeile 25; Anspruch 5; Beispiel 3</p>	1-26
A	<p>EP 0 601 585 A (ENZO THERAPEUTICS INC) 15. Juni 1994 (1994-06-15) Zusammenfassung Beispiele 1-7</p>	1-26
E	<p>WO 2004/085654 A (ANDREWS PETER ; AXORDIA LTD (GB); WALSH JIM (GB); GOKHALE PAUL (GB); M) 7. Oktober 2004 (2004-10-07) Zusammenfassung Seite 24, Zeile 10 - Zeile 15 Seite 33, Zeile 1 - Zeile 5</p>	1-19
T	<p>FIGUEIREDO CONSTANCA ET AL: "HLA silencing by RNAi-mediated transcript targeting" GENES AND IMMUNITY, Bd. 5, Nr. Suppl. 1, Mai 2004 (2004-05), Seite S6, XP009039365 & 18TH EUROPEAN HISTOCOMPATIBILITY CONFERENCE; SOFIA, BULGARIA; MAY 08-11, 2004 ISSN: 1466-4879 das ganze Dokument</p>	1-26

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE2004/000956

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	TIJSTERMAN M ET AL: "THE GENETICS OF RNA SILENCING" ANNUAL REVIEW OF GENETICS, ANNUAL REVIEWS INC., PALO ALTO, CA, US, Bd. 36, 2002, Seiten 489-519, XP009013370 ISSN: 0066-4197 -----	
A	WO 03/070744 A (MCSWIGGEN JAMES ; THOMPSON JAMES (US); BEIGELMAN LEONID (US); RIBOZYME) 28. August 2003 (2003-08-28) -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE2004/000956

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

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

1. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl die Ansprüche 24 und 25 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

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

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

siehe Zusatzblatt

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
1-25 (alle teilweise)

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

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

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

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

1. Ansprüche: 1-26 (alle teilweise)

siRNA, die von den Seq ID Nrn. 14 und 15 kodiert wird und davon ableitbare Vektoren, virale Partikel, Transplantate und Verfahren.

2. Ansprüche: 1-26 (alle teilweise)

siRNA, die von den Seq ID Nrn. 23 und 24 kodiert wird und davon ableitbare Vektoren, virale Partikel, Transplantate und Verfahren.

3. Ansprüche: 1-26 (alle teilweise)

siRNA, die von den Seq ID Nrn. 29 und 30 kodiert wird und davon ableitbare Vektoren, virale Partikel, Transplantate und Verfahren.

4. Ansprüche: 1-26 (alle teilweise)

siRNA, die von den Seq ID Nrn. 32 und 33 kodiert wird und davon ableitbare Vektoren, virale Partikel, Transplantate und Verfahren.

5. Ansprüche: 1-26 (alle teilweise)

siRNA, die von den Seq ID Nrn. 35 und 36 kodiert wird und davon ableitbare Vektoren, virale Partikel, Transplantate und Verfahren.

6. Ansprüche: 1-26 (alle teilweise)

siRNA, die von den Seq ID Nrn. 38 und 39 kodiert wird und davon ableitbare Vektoren, virale Partikel, Transplantate und Verfahren.

7. Ansprüche: 1-26 (alle teilweise)

siRNA, die von den Seq ID Nrn. 41 und 42 kodiert wird und davon ableitbare Vektoren, virale Partikel, Transplantate und Verfahren.

8. Ansprüche: 1-26 (alle teilweise)

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

siRNA, die von den Seq ID Nrn. 44 und 45 kodiert wird und davon ableitbare Vektoren, virale Partikel, Transplantate und Verfahren.

9. Ansprüche: 1-26 (alle teilweise)

siRNA, die von den Seq ID Nrn. 47 und 48 kodiert wird und davon ableitbare Vektoren, virale Partikel, Transplantate und Verfahren.

10. Ansprüche: 1-26 (alle teilweise)

siRNA, die von den Seq ID Nrn. 50 und 51 kodiert wird und davon ableitbare Vektoren, virale Partikel, Transplantate und Verfahren.

11. Ansprüche: 1-26 (alle teilweise)

siRNA, die von den Seq ID Nrn. 53 und 54 kodiert wird und davon ableitbare Vektoren, virale Partikel, Transplantate und Verfahren.

12. Ansprüche: 1-26 (alle teilweise)

siRNA, die von den Seq ID Nrn. 56 und 57 kodiert wird und davon ableitbare Vektoren, virale Partikel, Transplantate und Verfahren.

13. Ansprüche: 1-26 (alle teilweise)

siRNA, die von den Seq ID Nrn. 58 und 59 kodiert wird und davon ableitbare Vektoren, virale Partikel, Transplantate und Verfahren.

14. Ansprüche: 1-26 (alle teilweise)

siRNA, die von den Seq ID Nrn. 60 und 61 kodiert wird und davon ableitbare Vektoren, virale Partikel, Transplantate und Verfahren.

15. Ansprüche: 1-26 (alle teilweise)

siRNA, die von den Seq ID Nrn. 62 und 63 kodiert wird und davon ableitbare Vektoren, virale Partikel, Transplantate und Verfahren.

16. Ansprüche: 1-26 (alle teilweise)

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Nukleinsäuren, wie z.B. antisense RNA, Ribozyme etc, die nicht von den Erfindungen 1 - 15 umfasst werden und davon ableitbare, Vektoren, virale Partikel, Transplantate und Verfahren.

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2004/000956

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 03070744 A		CA 2476112 A1	28-08-2003
		CA 2476394 A1	28-08-2003
		CA 2477014 A1	28-08-2003
		EP 1432724 A1	30-06-2004
		EP 1463842 A1	06-10-2004
		EP 1472265 A2	03-11-2004
		EP 1465910 A2	13-10-2004
		EP 1423404 A2	02-06-2004
		EP 1442143 A2	04-08-2004
		EP 1448590 A2	25-08-2004
		EP 1432725 A1	30-06-2004
