



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 37 992 T2** 2008.04.24

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 891 423 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 37 992.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB97/00929**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 915 579.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1997/037014**

(86) PCT-Anmeldetag: **02.04.1997**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **09.10.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **20.01.1999**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **08.08.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.04.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/11** (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9606961 02.04.1996 GB

(73) Patentinhaber:

Optigen Patents Ltd., Dublin, IE

(74) Vertreter:

Murgitroyd & Company, 48149 Münster

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**FARRAR, Gwentyth Jane, Monkstown D20, County
Dublin, IE; HUMPHRIES, Peter, Cabinteely D15,
County DUBLIN, IE; KENNA, Paul Francis, Dublin
7, IE**

(54) Bezeichnung: **GENETISCHE ABSCHAFFUNG UND AUSTAUSCH**

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 eine Strategie zum Supprimieren eines Gens. Insbesondere betrifft die Erfindung die Suppression von mutierten Genen, die entweder monogen oder polygen einen dominanten oder schädlichen Effekt hervorbringe. Die Erfindung betrifft eine Strategie zum Supprimieren eines Gens oder Krankheitsallels unter Verwendung von Verfahren, die nicht spezifisch auf das Krankheitsallel zielen, sondern stattdessen auf eine breite Auswahl von Sequenzen in einem bestimmten Gen zielen können. Eine besondere Ausführungsform der Erfindung ist die Verwendung von Suppressionsstrategien, um auf entweder die Krankheitsallele oder die normalen Allele allein zu zielen oder sowohl auf Krankheitsallele als auch normale Allele zu zielen. Die Erfindung setzt die Verwendung der Wobble-Hypothese ein, um eine fortgesetzte Expression eines normalen Ersatzgens oder eines vorteilhaften Ersatzgens (eines Gens, das im Vergleich zum Wildtyp so modifiziert ist, dass es (einen) zusätzliche(n) vorteilhafte(n) Effekt(e) bietet) zu ermöglichen. Das Ersatzgen wird im Vergleich zum endogenen Wildtypgen Nukleotidwechsel aufweisen, aber für identische Aminosäuren wie das Wildtypgen kodieren. Die Strategie umgeht den Bedarf an einer spezifischen Therapie für jede Mutation innerhalb eines gegebenen Gens. Zusätzlich ermöglicht die Erfindung eine größere Flexibilität bei der Wahl einer Zielsequenz zur Suppression eines Krankheitsallels.

[0002] Die Erfindung betrifft auch ein Medikament oder Medikamente zur Verwendung beim Supprimieren eines schädlichen Allels, das in einem Genom von einer oder mehreren Personen oder von einem oder mehreren Tieren vorliegt.

[0003] Im Allgemeinen ist die vorliegende Erfindung dort nützlich, wo das Gen, das in dem Genom eines Patienten natürlich vorkommt, zu einem Krankheitszustand beiträgt. Im Allgemeinen wird ein Allel des in Frage kommenden Gens mutiert sein, das heißt, es wird in seiner Nukleotidsequenz Änderungen aufweisen, die die Funktion oder den Pegel des Genprodukts beeinträchtigen. Zum Beispiel kann die Änderung in einem im Vergleich zum Wildtypgen geänderten Proteinprodukt oder einer geänderten Regulierung der Transkription und Verarbeitung resultieren. Die Vererbung oder der somatische Erwerb einer derartigen Mutation kann einen Krankheitsphänotyp hervorbringen oder eine Person für einen Krankheitsphänotyp prädisponieren. Das betreffende Gen könnte jedoch auch vom Wildtypphänotyp sein, aber auf eine andere Art und Weise zu einem Krankheitszustand beitragen, so dass die Suppression des Gens den Krankheitszustand lindern oder verbessern könnte oder die Effektivität einer verabreichten therapeutischen Verbindung verbessern könnte.

[0004] Im Allgemeinen können Suppressionseffektoren wie etwa Nukleinsäuren-Antisense oder Sense, Ribozyme, Peptidnukleinsäuren (PNAs), Dreifachhelix bildende Oligonukleotide, Peptide und/oder Antikörper, die gegen Sequenzen in einem Gen, in Transkripten oder in einem Protein gerichtet sind, in der Erfindung eingesetzt werden, um eine Gensuppression zu erreichen.

HINTERGRUND

[0005] Untersuchungen von degenerativen erblichen Augenleiden, einschließlich Retinitis pigmentosa (RP) und verschiedener Makuladystrophien, resultierten in einer wesentlichen Klärung der molekularen Basis dieser schwächenden menschlichen Retinadegenerationen. Unter Anwendung des Ansatzes von Genkopplung wurden x-gekoppelte RP-Gene (xIRP-Gene) auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms lokalisiert (Ott et al. 1990) – anschließend wurde das bei einer Form von xIRP involvierte Gen identifiziert. Verschiedene Gene, die bei autosomal-dominanten Formen von RP (adRP) involviert sind, wurden lokalisiert. Das erste davon wurde auf 3q kartiert, dicht bei dem Gen, das das Stäbchenphotorezeptorprotein Rhodopsin kodiert (McWilliam et al. 1989; Dryja et al. 1990). Auf ähnliche Weise war ein adRP-Gen auf 6p platziert, dicht bei dem Gen, das das Photorezeptorprotein Peripherin kodiert (Farrar et al. 1991a, b; Kajiwar et al. 1991). Andere adRP-Gene wurden an diskreten chromosomalen Orten kartiert, doch die Krankheitsgene bleiben bis jetzt nicht charakterisiert. Wie bei xIRP und adRP wurden verschiedene Gene lokalisiert, die bei der autosomal-rezessiven RP (arRP) involviert sind, und in einigen Fällen wurden molekulare Defekte charakterisiert (Humphries et al. 1992; Farrar et al. 1993; Van Soest et al. 1994). Ähnlich sind eine Anzahl von Genen, die bei Makuladystrophien involviert sind, kartiert worden (Mansergh et al. 1995). Genkopplung, zusammen mit Techniken zur Mutationsprüfung von Kandidatengenen, ermöglichte die Identifizierung von verursachenden dominanten Mutationen in den Genen, die Rhodopsin und Peripherin kodieren. Weltweit sind bei Patienten mit RP oder angeborener stationärer Nachtblindheit etwa 100 Rhodopsin-Mutationen gefunden worden. Ähnlich wurden bei Patienten mit RP oder Makuladystrophien ungefähr 40 Mutationen in dem Peripherin-Gen charakterisiert. Die Kenntnis der molekularen Ätiologie dieser Retinopathien stimulierte die Erschaffung von Tiermodellen und die Erkundung von Verfahren des therapeutischen Eingriffs (Farrar et al. 1995; Humphries et al. 1997).

[0006] Ähnlich wie RP ist Osteogenesis imperfecta (OI) eine autosomal-dominant vererbte menschliche Störung, deren molekulare Pathogenese äußerst genetisch heterogen ist. OI wird oft als „Glasknochenkrankheit“ bezeichnet, obwohl häufig zusätzliche Symptome einschließlich Hörverlust, Wachstumsdefizienz, Prellungen, lockerer Gelenke, blauer Skleren und Dentinogenesis imperfecta beobachtet werden (McKusick, 1972). Mutationen in den Genen, die die zwei Typ-I-Kollagenketten (Kollagen 1A1 und 1A2) kodieren, die das Typ-I-Kollagen-Heterodimer beinhalten, sind bei OI impliziert worden. Bei diesen zwei Genen sind tatsächlich Hunderte von dominant wirkenden Mutationen bei OI-Patienten identifiziert worden, von denen viele Einzelpunktmutationen sind, obwohl eine Anzahl von Insertions- und Deletionsmutationen gefunden wurden (Willing et al. 1993; Zhuang et al. 1996). Ähnlich sind Mutationen in diesen Genen bei Ehlers-Danlos- und Marfansyndrom impliziert worden (Dalgleish et al. 1986; Phillips et al. 1990; D'Alessio et al. 1991; Vasan NS et al. 1991).

[0007] Im Allgemeinen sind Gentherapien, die virale und nicht virale Zuführungssysteme benutzen, verwendet worden, um vererbte Störungen, Krebs und infektiöse Krankheiten zu behandeln. Viele Untersuchungen haben sich jedoch auf rezessiv vererbte Störungen konzentriert, mit dem Gedankengang, dass die Einführung und Expression des Wildtypgens möglicherweise ausreicht, um den Krankheitsphänotyp zu verhindern/zu lindern. Im Gegensatz dazu erfordert die Gentherapie für dominante Störungen die Suppression des dominanten Krankheitsallels. Bemerkenswerterweise werden viele der charakterisierten Mutationen, die vererbte Krankheiten wie etwa RP oder OI verursachen, auf eine autosomal-dominante Weise vererbt. Tatsächlich gibt es über 1000 autosomal-dominant vererbte Störungen beim Menschen. Zusätzlich gibt es viele polygene Störungen aufgrund von gemeinsamer Vererbung einer Anzahl von genetischen Komponenten, die zusammen den Krankheitszustand hervorbringen. Effektive Gentherapien für dominante oder polygene Krankheiten können auf den Primärdefekt zielen und in diesem Fall die Suppression des Krankheitsallels, während die Funktion des normalen Allels in vielen Fällen noch bewahrt wird, erfordern. Dies ist dort besonders relevant, wo die Krankheitssymptomatik auf einer Mutation einer Zunahme der Funktion anstelle auf reduzierten Pegeln von Wildtypprotein beruht. Alternativ dazu können Suppressionstherapien auf Sekundäreffekte, die mit der Krankheitssymptomatik assoziiert sind, zielen: Ein Beispiel ist der programmierte Zelltod (Apoptose), der bei vielen vererbten Störungen beobachtet worden ist.

[0008] Strategien zur Unterscheidung zwischen normalen Allelen und Krankheitsallelen und zum selektiven Abschalten des Krankheitsallels unter Verwendung von Suppressionseffektoren, unter anderem Antisense-DNA/RNA, PNAs, Ribozymen oder Dreifachhelix-DNA, die auf die Krankheitsmutation zielen, können in vielen Fällen schwierig sein – häufig unterscheiden sich Krankheitsallele und normale Allele nur um ein einziges Nukleotid. Eine weitere Schwierigkeit, die die Entwicklung von Gentherapien behindert, ist die heterogene Beschaffenheit einiger dominanter Störungen – viele unterschiedliche Mutationen in demselben Gen bringen einen ähnlichen Krankheitsphänotyp hervor. Die Entwicklung von spezifischen Gentherapien für jede davon kann hinsichtlich der Kosten untragbar sein. Um Schwierigkeiten, die mit dem spezifischen Zielen auf die Krankheitsmutation und mit der bei vererbten Störungen vorkommenden genetischen Heterogenität assoziiert sind, zu umgehen, wird in der Erfindung eine neuartige Strategie für Gensuppression und Gensatz beschrieben, die die Degeneration des genetischen Codes ausnutzt, wodurch eine Flexibilität bei der Wahl der Zielsequenz zur Suppression ermöglicht wird und ein Mittel zur Gensuppression bereitgestellt wird, das von der Krankheitsmutation unabhängig ist.

STAND DER TECHNIK

[0009] Suppressionseffektoren sind zuvor verwendet worden, um eine spezifische Suppression einer Genexpression zu erreichen. Antisense-DNA und -RNA sind verwendet worden, um die Genexpression in vielen Fällen zu inhibieren. Modifizierungen, wie etwa Phosphorothioate, sind an Oligonukleotiden vorgenommen worden, um die Widerstandsfähigkeit gegen Nukleaseabbau, die Bindungsaffinität und die Aufnahme zu erhöhen (Cazenave et al. 1989; Sun et al. 1989; McKay et al. 1996; Wei et al. 1996). In einigen Fällen hat die Verwendung von Antisense- und Ribozym-Suppressionsstrategien zu der Umkehrung eines Tumorphänotyps geführt, indem die Expression eines Genprodukts reduziert oder ein mutiertes Transkript an der Stelle der Mutation gespalten wurde (Carter und Lemoine 1993; Lange et al. 1993; Valera et al. 1994; Dosaka-Akita et al. 1995; Feng et al. 1995; Ouattara et al. 1995; Ohta et al. 1996). Zum Beispiel wurde unter Verwendung eines auf eine Hras-Mutation in Blasenkrebszellen gezielten Ribozyms eine neoplastische Reversion erhalten (Feng et al. 1995). Ribozyme sind auch als ein Mittel vorgeschlagen worden, um sowohl die Genexpression eines mutierten Gens zu inhibieren als auch die Mutante durch gezieltes Transsspleißen zu korrigieren (Sullenger und Cech 1994; Jones et al. 1996). Ribozyme können gestaltet werden, um ein autokatalytisches Spalten von RNA-Zielen hervorzurufen, jedoch kann der inhibitorische Effekt von einigen Ribozymen zum Teil auf einem Antisense-Effekt beruhen, aufgrund der das katalytische Zentrum flankierenden Antisense-Sequenzen, die die Zielstelle spezifizieren (Ellis und Rodgers 1993; Jankowsky und Schwenzer 1996). Ribozym-Wirkung kann durch

die Verwendung von zum Beispiel nicht spezifischen, Nukleinsäure bindenden Proteinen oder Facilitator-Oligonukleotiden verstärkt werden (Herschlag et al. 1994; Jankowsky und Schwenzer 1996). Mehrziel-Ribozyme (verbunden oder shotgun) sind als Mittel zum Verbessern der Effizienz von Ribozymen für Gensuppression vorgeschlagen worden (Ohkawa et al. 1993). Dreifachhelixansätze sind ebenfalls für die sequenzspezifische Gensuppression untersucht worden – es hat sich herausgestellt, dass Triplex bildende Oligonukleotide in einigen Fällen auf eine sequenzspezifische Art und Weise binden (Postel et al. 1991; Duval-Valentin et al. 1992; Hardenbol und Van Dyke 1996; Porumb et al. 1996). Ähnlich wurde gezeigt, dass Peptidnukleinsäuren die Genexpression inhibieren (Hanvey et al. 1992; Knudson und Nielsen 1996; Taylor et al. 1997). Die kleine Furche bindende Polyamide können sich auf eine sequenzspezifische Art und Weise an DNA-Ziele binden und somit nützliche kleine Moleküle zur zukünftigen Suppression auf der DNA-Ebene darstellen (Trauger et al. 1996). Zusätzlich dazu wurde Suppression durch Interferenz auf der Proteinebene unter Verwendung von dominant-negativen mutierten Peptiden und Antikörpern erhalten (Herskowitz 1987; Rimsky et al. 1989; Wright et al. 1989). In einigen Fällen haben Suppressionsstrategien zu einer Reduktion von RNA-Pegeln ohne gleichzeitige Reduktion von Proteinen geführt, wohingegen sich Reduktionen der RNA bei anderen in Reduktionen der Proteine widerspiegeln.

[0010] Jetzt gibt es die Waffen, mit denen eine Gensuppression erhalten werden kann. Dies, zusammen mit einem besseren Verständnis der molekularen Ätiologie der Krankheit, resultiert in einer beständig ansteigenden Anzahl von Zielkrankheiten für Therapien auf der Basis der Suppression. In vielen Fällen war es schwierig, eine vollständige Suppression der Genexpression zu erreichen. Ein kombinierter Ansatz, der eine Anzahl von Suppressionseffektoren verwendet, kann dies möglicherweise unterstützen. Bei einigen Störungen ist es möglicherweise notwendig, die Expression eines Krankheitsallels vollständig zu blockieren, um Krankheitssymptome zu verhindern, wohingegen bei anderen geringe Pegel mutierten Proteins toleriert werden können. Parallel zu einer größeren Kenntnis der molekularen Defekte, die Krankheit verursachen, wurde wahrgenommen, dass viele Störungen genetisch heterogen sind. Beispiele, bei denen mehrere Gene und/oder mehrere Mutationen innerhalb eines Gens einen ähnlichen Krankheitsphänotyp hervorbringen können, umfassen Osteogenesis imperfecta, familiäre Hypercholesterinämie, Retinitis pigmentosa und viele andere. Die Nutzbarkeit der Degeneration des genetischen Codes (Wobble-Hypothese), um die Suppression eines oder beider Allele eines Gens und die Einführung eines Ersatzgens, so dass es der Suppression entgeht, zu ermöglichen, ist in der Erfindung ausgenutzt worden.

[0011] Die Erfindung wendet sich den Mängeln des Stands der Technik zu, indem sie einen neuartigen Ansatz für die Gestaltung von Suppressionseffektoren, die darauf gerichtet sind, auf Allele eines Gens, das eine schädliche Mutation trägt, zu zielen, bereitstellt. Die Suppression jeder Mutation, die einen Krankheitsphänotyp hervorbringt, kann teuer und problematisch sein. Krankheitsmutationen sind oft Einzelnukleotidwechsel. Infolgedessen kann die Unterscheidung zwischen dem Krankheitsallel und dem normalen Allel schwierig sein. Einige Suppressionseffektoren erfordern spezifische Sequenzziele, zum Beispiel spalten Hammerhead-Ribozyme an NUX-Stellen, und somit sind sie möglicherweise nicht fähig, auf viele Mutationen zu zielen. Besonders verleiht das breite Spektrum an Mutationen, das bei vielen Krankheiten zu beobachten ist, der Entwicklung von therapeutischen Strategien für derartige Störungen zusätzliche Komplexität – einige Mutationen kommen nur einmal in einem einzigen Patienten vor. Ein weiteres Problem, das mit der Suppression assoziiert ist, ist das hohe Homologieniveau, das bei den kodierenden Sequenzen zwischen Mitgliedern einiger Genfamilien vorliegt. Dies kann die Auswahl an Zielstellen für die Suppression, die die spezifische Suppression eines einzelnen Mitglieds einer derartigen Genfamilie ermöglichen, einschränken.

[0012] Die vorliegende Erfindung umgeht Mängel des Stands der Technik, indem sie die Degeneration des genetischen Codes nutzt. Bei der Erfindung werden Suppressionseffektoren spezifisch für Sequenzen in kodierenden Regionen von Genen oder in Genprodukten gestaltet. Typischerweise enthält ein Allel des Gens eine Mutation mit einem schädlichen Effekt. Auf kodierende Sequenzen gezielte Suppression stellt im Gegensatz zu einer Suppression, die auf einzelne Krankheitsmutationen gerichtet ist, eine größere Flexibilität bei der Wahl der Zielsequenz für Suppression bereit. Zusätzlich dazu sieht die Erfindung die Einführung eines Ersatzgens mit so modifizierten Sequenzen, dass das Ersatzgen vor der Suppression geschützt ist, vor. Das Ersatzgen wird an Dritte-Base-Wobble-Positionen modifiziert und stellt somit das Wildtypgenprodukt bereit. Besonders weist die Erfindung den Vorteil auf, dass dieselbe Suppressionsstrategie im Prinzip verwendet werden könnte, um viele Mutationen in einem Gen zu supprimieren. Dies ist besonders relevant, wenn große Anzahlen an Mutationen innerhalb eines einzigen Gens eine Krankheitssymptomatik verursachen. Das Ersatzgen stellt (wenn nötig) die Expression des normalen Proteinprodukts bereit, wenn erforderlich, um die mit reduzierten Pegeln von Wildtypprotein assoziierte Symptomatik zu lindern. Dasselbe Ersatzgen könnte im Prinzip zusammen mit der Suppression vieler unterschiedlicher Krankheitsmutationen innerhalb eines gegebenen Gens verwendet werden. Zielsequenzen können in jedem beliebigem Teil der kodierenden Sequenz gefunden werden.

Die Suppression der kodierenden Sequenz hält den Vorteil, dass derartige Sequenzen sowohl in Vorläufer-RNA als auch in reifer RNA vorliegen, wodurch es Suppressoren ermöglicht wird, auf alle Formen von RNA zu zielen.

[0013] Zusammengefasst involviert die Erfindung die Gensuppression von Krankheitsallelen und normalen Allelen, wobei sie auf kodierende Sequenzen in einem Gen zielt, und Genersatz, so dass das Ersatzgen nicht supprimiert werden kann. Ersatzgene werden an Dritte-Base-Positionen (Wobble-Positionen) modifiziert, so dass sie für die richtigen Aminosäuren kodieren, aber vollständig oder teilweise vor Suppression geschützt sind. Die gleichen Suppressions- und Ersatzschritte können für viele Krankheitsmutationen in einem gegebenen Gen verwendet werden. Suppression und Ersatz können zusammengekommen oder separat vorgenommen werden.

BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0014] Gemäß der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren, wie in Anspruch 1 definiert, bereitgestellt. Das Verfahren setzt eine Strategie zum Supprimieren der Expression eines endogenen Gens mit einer schädlichen Mutation ein, wobei die Strategie das Bereitstellen von Suppressionseffektoren wie etwa Antisense-Nukleinsäuren beinhaltet, die an Sequenzen eines Gens, das supprimiert werden soll, binden können, um die funktionelle Expression davon zu verhindern.

[0015] Im Allgemeinen bedeutet der Begriff Suppressionseffektoren Nukleinsäuren, Peptidnukleinsäuren (PNAs), Peptide, Antikörper oder modifizierte Formen davon, um die Genexpression auf eine sequenzspezifische Art und Weise zu inaktivieren oder zu reduzieren.

[0016] Suppressionseffektoren, wie etwa Antisense-Nukleinsäuren, können DNA oder RNA sein, sie können sich typischerweise gegen eine kodierende Sequenz richten, jedoch können Suppressionseffektoren auf eine kodierende Sequenz zielen und auch auf 5'- und/oder 3'- nicht translatierte Regionen (UTRs) und/oder Introns und/oder Regulierregionen und/oder Sequenzen neben einem Gen oder auf jede Kombination derartiger Regionen eines Gens zielen. Antisense-Nukleinsäuren, die sowohl eine kodierende als auch eine nicht kodierende Sequenz umfassen, können, wenn erforderlich, verwendet werden, um bei der Optimierung der Suppression zu helfen. Die Bindung des Suppressionseffektors/der Suppressionseffektoren verhindert oder vermindert die funktionelle Expression des endogenen Gens.

[0017] Im Allgemeinen bedeutet der Begriff „funktionelle Expression“ die Expression eines Genprodukts, das auf eine äquivalente oder bessere Weise als ein Wildtypprodukt funktionieren kann. In dem Fall eines mutierten Gens oder eines prädisponierenden Gens bedeutet „funktionelle Expression“ die Expression eines Genproduktes, dessen Vorhandensein einen schädlichen Effekt hervorbringt oder für einen schädlichen Effekt prädisponiert. Mit „schädlichem Effekt“ ist das Hervorbringen oder Prädisponieren für eine Krankheitssymptomatik oder das Ändern des Effekts/der Effekte und/oder der Effizienz einer verabreichten Verbindung gemeint.

[0018] Bei einer besonderen Ausführungsform der Erfindung setzt die Strategie ferner Ribozyme ein, die gestaltet werden können, um eine Spaltung von Ziel-RNAs hervorzurufen. Die Strategie setzt ferner Nukleotide ein, die eine Dreifachhelix-DNA bilden. Die Strategie kann Peptidnukleinsäuren für die Suppression einsetzen. Nukleinsäuren für Antisense-, Ribozym-, Dreifachhelix- und Peptidnukleinsäuren können modifiziert werden, um Stabilität, Bindungseffizienz und Aufnahme zu erhöhen (siehe Stand der Technik). Nukleinsäuren können in einen Vektor inkorporiert werden. Vektoren umfassen nackte DNA, DNA-Plasmidvektoren, RNA- oder DNA-Virusvektoren, Lipide, Polymere oder andere Derivate und Verbindungen, die die Genzuführung und -expression unterstützen.

[0019] Beschrieben wird hier die Verwendung von Antisense-Nukleotiden, Ribozymen, PNAs, Dreifachhelix-nukleotiden oder anderen Suppressionseffektoren allein oder in einem Vektor oder in Vektoren, wobei die Nukleinsäuren fähig sind, spezifisch oder teilspezifisch an kodierende Sequenzen eines Gens zu binden, um dessen funktionelle Expression zu verhindern oder zu reduzieren, bei der Zubereitung eines Medikaments zur Behandlung einer autosomal-dominanten oder polygenen Krankheit oder zur Erhöhung der Nützlichkeit und/oder Wirkung einer verabreichten Verbindung.

[0020] Bei einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können Zielsequenzen für die Suppression nicht kodierende Sequenzen des Gens umfassen.

[0021] Gemäß einem zweiten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird eine Verwendung, wie in Anspruch 5

definiert, bereitgestellt. Die Erfindung kann eine Strategie zum spezifischen oder teilspezifischen Supprimieren eines endogenen Gens und (wenn erforderlich) Einführen eines Ersatzgens involvieren, wobei die Strategie die folgenden Schritte beinhaltet:

1. Bereitstellen von Nukleinsäuren oder anderen Suppressionseffektoren, die an ein endogenes Gen, ein Gentranskript, das supprimiert werden soll, binden können, und
2. Bereitstellen von genomischer DNA oder cDNA (vollständig oder teilweise), die ein Ersatzgen kodiert, wobei die Nukleinsäuren nicht an äquivalente Regionen in der genomischen DNA oder cDNA binden können, um die Expression des Ersatzgens zu verhindern. Die Ersatznukleinsäuren werden von den Suppressionsnukleinsäuren nicht erkannt oder weniger effektiv erkannt als das endogene Gen. Die kodierende Sequenz der Ersatznukleinsäuren kann geändert werden, um die Effizienz der Suppression zu verhindern oder zu reduzieren. Ersatznukleinsäuren weisen an einer oder mehreren Dritte-Base(Wobble)-Positionen Modifizierungen auf, so dass Ersatznukleinsäuren noch immer Wildtyp- oder äquivalente Aminosäuren kodieren.

[0022] Bei einer besonderen Ausführungsform der Erfindung wird eine Strategie für die Genexpression, die auf kodierende Sequenzen des zu supprimierenden Gens zielt, bereitgestellt. Die Suppression ist spezifisch oder teilspezifisch für ein Allel, zum Beispiel für das Allel, das eine schädliche Mutation trägt. Suppressoren zielen auf kodierende Regionen eines Gens oder auf eine Kombination von kodierenden und nicht kodierenden Regionen eines Gens. Suppressoren können auf eine Charakteristik eines Allels eines Gens zielen, so dass die Suppression spezifisch oder teilspezifisch für ein Allel eines Gens ist (WO 97/32024). Die Erfindung sieht ferner die Verwendung von Ersatznukleinsäuren mit geänderten kodierenden Sequenzen vor, so dass die Ersatznukleinsäuren von Suppressionsnukleinsäuren, die spezifisch oder teilspezifisch auf ein Allel des zu supprimierenden Gens zielen, nicht erkannt werden (oder weniger effektiv erkannt werden). Ersatznukleinsäuren stellen das Wildtypgenprodukt, ein äquivalentes Genprodukt oder ein verbessertes Genprodukt bereit, sind aber vollständig oder teilweise vor Suppressionseffektoren, die auf kodierende Sequenzen zielen, geschützt.

[0023] Bei einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden Ersatznukleinsäuren bereitgestellt, so dass Ersatznukleinsäuren nicht von natürlich vorkommenden Suppressoren erkannt werden, über die sich herausgestellt hat, dass sie die Genexpression bei einer oder mehreren Personen, Tieren oder Pflanzen inhibieren oder reduzieren. Die Erfindung sieht die Verwendung von Ersatznukleinsäuren vor, die geänderte Sequenzen aufweisen, auf die Suppressoren des Gens zielen, so dass die Suppression durch natürlich vorkommende Suppressoren vollständig oder teilweise verhindert wird.

[0024] Bei einer zusätzlichen Ausführungsform der Erfindung werden Ersatznukleinsäuren mit geänderter Nukleotidsequenz in kodierenden Regionen bereitgestellt, so dass die Ersatznukleinsäuren ein Produkt mit einer oder mehreren geänderten Aminosäuren kodieren. Die Ersatznukleinsäuren stellen ein Genprodukt bereit, das im Vergleich zu dem natürlich vorkommenden endogenen Wildtypgenprodukt äquivalent oder verbessert ist.

[0025] Bei einer zusätzlichen Ausführungsform der Erfindung wird eine Strategie bereitgestellt, um ein Gen zu supprimieren, wenn das Gentranskript oder Genprodukt die Wirkung einer verabreichten Verbindung stört.

[0026] Die Erfindung kann die Verwendung von einem Vektor oder von Vektoren, der/die Suppressionseffektoren in der Form von Nukleinsäuren enthalten, wobei die Nukleinsäuren gegen kodierende Sequenzen oder Kombinationen von kodierenden und nicht kodierenden Sequenzen des Zielgens gerichtet sind, und (einem) Vektoren, der/die genomische DNA oder cDNA enthalten, welche eine Ersatzgensequenz kodiert, an die Nukleinsäuren für die Suppression nicht binden können (oder an die sie weniger effizient binden), bei der Zubereitung eines kombinierten Medikaments für die Behandlung einer autosomal-dominanten oder polygenen Krankheit involvieren.

[0027] Nukleinsäuren für die Suppression oder Ersatzgennukleinsäuren können in demselben Vektor oder in separaten Vektoren bereitgestellt werden. Nukleinsäuren für die Suppression oder Ersatzgennukleinsäuren können als eine Kombination von Nukleinsäuren allein oder in Vektoren bereitgestellt werden.

[0028] Hier wird ein Verfahren zur Behandlung einer Krankheit, die durch ein endogenes mutiertes Gen verursacht wird, beschrieben, wobei das Verfahren die sequenzielle oder gleichzeitige Einführung von

- (a) Nukleinsäuren in die kodierenden Regionen eines Gens, das supprimiert werden soll, und/oder Nukleinsäuren in kodierende Regionen und eine beliebige Kombination von 5'- und/oder 3'- nicht translatierten Regionen, Intron-Regionen, Kontrollregionen oder Regionen neben einem zu supprimierenden Gen,
- (b) Ersatznukleinsäuren mit Sequenzen, die die Expression des Ersatzgens ermöglichen, beinhaltet.

[0029] Die Nukleinsäure für die Gensuppression kann vor, nach oder zur gleichen Zeit wie das Ersatzgen verabreicht werden.

[0030] Die Erfindung stellt auch eine Ausstattung, wie in Anspruch 13 definiert, bereit. Die Ausstattung kann bei der Behandlung einer Krankheit, die durch eine schädliche Mutation in einem Gen verursacht wird, verwendet werden, wobei die Ausstattung Nukleinsäuren für die Suppression, die an das zu supprimierende Gen binden können, und eine Ersatznukleinsäure zum Ersetzen des mutierten Gens mit einer Sequenz, die es ermöglicht, sie zu exprimieren und der Suppression vollständig oder teilweise zu entgehen, beinhaltet.

[0031] Nukleotide können als nackte DNA oder RNA verabreicht werden. Nukleotide können in Vektoren zugeführt werden. Nackte Nukleinsäuren oder Nukleinsäuren in Vektoren können mit Lipiden oder anderen Derivaten, die die Genzuführung unterstützen, zugeführt werden. Nukleotide können modifiziert werden, um sie stabiler zu machen, zum Beispiel widerstandsfähig gegenüber zellulären Nukleasen, während sie noch immer den durch RNaseH vermittelten Abbau von RNA aufrechterhalten, oder mit erhöhten Bindeeffizienzen (siehe Stand der Technik). Antikörper oder Peptide können erzeugt werden, um auf das Proteinprodukt von dem zu supprimierenden Gen zu zielen.

[0032] Die hier beschriebene Strategie findet Anwendung für das Lindern autosomal-dominanter Krankheiten. Das vollständige Inaktivieren eines Krankheitsallels kann unter Verwendung von Antisense-, PNA-, Ribozym- und Dreifachhelixansätzen oder einer beliebigen Kombination von Geninaktivierungsansätzen schwierig zu erreichen sein. Jedoch können bei einigen autosomal-dominanten Störungen geringe Mengen des mutierten Produkts geduldet werden. Bei anderen kann eine signifikante Reduktion des Anteils der Mutante an dem normalen Produkt in einer Linderung der Krankheitssymptome resultieren. Somit kann diese Erfindung auf jede beliebige autosomal-dominant oder polygen vererbte Krankheit beim Menschen angewendet werden, bei der die molekulare Basis der Krankheit festgestellt worden ist oder teilweise verstanden wird. Diese Strategie ermöglicht es, die gleiche Therapie zu verwenden, um eine Reihe unterschiedlicher Krankheitsmutationen innerhalb desselben Gens zu behandeln. Die Entwicklung derartiger Ansätze ist für zukünftige Therapien für autosomal-dominante und polygene Krankheiten wichtig, wobei der Schlüssel für eine allgemeine Strategie darin liegt, dass sie den Bedarf an einer spezifischen Therapie für jede Mutation, die eine Krankheit verursacht oder für diese prädisponiert, umgeht. Dies ist bei einigen Störungen besonders relevant, zum Beispiel bei rhodopsingekoppelter autosomal-dominanter RP, für die bis heute etwa einhundert unterschiedliche Mutationen in dem Rhodopsin-Gen bei adRP-Patienten beobachtet worden sind. Gleichermaßen wurden hunderte von Mutationen in den menschlichen Genen des Typ-I-Kollagens 1A1 und 1A2 bei autosomal-dominanter Osteogenesis imperfecta identifiziert. Die Kosten der Entwicklung von Therapien für jede Mutation sind gegenwärtig untragbar. Erfindungen wie diese, die einen allgemeinen Ansatz zur Therapie verwenden, sind erforderlich. Allgemeine Ansätze können auf einen Primärdefekt zielen, wie es der Fall ist bei dieser Erfindung, oder auf Sekundäreffekte wie etwa Apoptose.

[0033] Diese Erfindung kann bei Gentherapieansätzen für biologisch wichtige polygene Störungen, die große Anteile der Weltpopulation betreffen, angewendet werden, wie etwa bei altersbedingter Makuladegeneration, Glaukom, manischer Depression, Krebs mit einer familiären Komponente und tatsächlich vielen anderen. Polygene Krankheiten erfordern die Vererbung von mehr als einer Mutation (Komponente), um den Krankheitszustand hervorzubringen. Bemerkenswerterweise kann eine Linderung der Krankheitssymptome eine Reduktion des Vorliegens nur einer dieser Komponenten erfordern, das heißt, die Suppression eines Genotyps, der, zusammen mit anderen, zu dem Krankheitsphänotyp führt, kann ausreichen, um Symptome der Krankheit zu verhindern oder zu lindern. In einigen Fällen kann die Suppression von mehr als einer Komponente erforderlich sein, um Krankheitssymptome zu verbessern. Diese Erfindung kann bei möglichen zukünftigen interventiven Therapien für häufige polygene Krankheiten angewendet werden, um einen besondere(n) Genotyp(en) unter Verwendung von Suppression und, wenn nötig, Ersatzschritten, zu supprimieren.

[0034] Die vorliegende Erfindung wird unter Verwendung von vier Genen beispielhaft beschrieben: menschliches Rhodopsin, Mausrhodopsin, menschliches Peripherin und menschliches Kollagen 1A2. Die ersten dieser Gene sind retinaspezifisch. Im Gegensatz dazu wird Kollagen 1A2 in einer Reihe von Geweben einschließlich Haut und Knochen exprimiert. Obgleich diese vier Gene als Beispiele verwendet worden sind, gibt es keinen Grund, weswegen die Erfindung nicht auch bei der Suppression vieler anderer Gene eingesetzt werden könnte, bei denen Mutationen einen schädlichen Effekt verursachen oder dafür prädisponieren. Viele Beispiele von mutierten Genen, die Krankheitsphänotypen hervorbringen, sind aus dem Stand der Technik verfügbar – diese Gene stellen alle Ziele für die Erfindung dar. Die vorliegende Erfindung wird unter Verwendung von Hammerhead-Ribozymen mit Antisense-Armen, um eine RNA-Spaltung hervorzurufen, beispielhaft dargestellt. Es gibt keinen Grund, weswegen andere Suppressionseffektoren, die sich gegen Gene, Gentranskripte oder Gen-

produkte richten, nicht auch verwendet werden könnten, um Gensuppression zu erreichen. Es wurden viele Beispiele des Stands der Technik gemeldet (siehe Stand der Technik), die ausführlich die Verwendung von Suppressionseffektoren beschreiben, unter anderem Antisense-RNA/DNA, Dreifachhelix, PNAs und Peptide, um eine Suppression der Genexpression zu erzielen. Die vorliegende Erfindung wird unter Verwendung von Hammerhead-Ribozymen beispielhaft beschrieben, die Antisense-Arme aufweisen, um eine sequenzspezifische Spaltung der Transkripte von Genen, die bei dominanten Störungen impliziert sind, hervorzurufen, aber keine Spaltung der Transkripte von Ersatzgenen, die Sequenzmodifizierungen in Wobble-Positionen enthalten, so dass das Ersatzgen noch immer für das Wildtypprotein kodiert. Die vorliegende Erfindung wird unter Verwendung von Suppressionseffektoren beispielhaft beschrieben, die auf Stellen in kodierenden Regionen der Gene für menschliches Rhodopsin und Mausrhodopsin, menschliches Peripherin und menschliches Kollagen 1A2 zielen. Zielstellen, die Sequenzen von transkribierten, aber nicht translatierten Regionen von Genen, Introns, Regionen, die bei der Regulierung der Genexpression involviert sind, Regionen neben dem Gen oder jede beliebige Kombination davon umfassen, könnten verwendet werden, um Gensuppression zu erreichen. Mehrere Suppressionseffektoren, zum Beispiel Shotgun-Ribozyme, könnten verwendet werden, um die Effizienz der Suppression, wenn nötig, zu optimieren. Zusätzlich dazu kann, wenn erforderlich, die Expression eines so modifizierten Ersatzgens, dass das Ersatzgenprodukt gegenüber dem Wildtypprodukt so geändert ist, dass es einen vorteilhaften Effekt bereitstellt, verwendet werden, um ein Genprodukt bereitzustellen.

MATERIAL und METHODEN

Kloniervektoren

[0035] cDNA-Matrizen und Ribozyme wurden in im Handel erhältliche Expressionsvektoren (pCDNA3, pZeoSV oder pBluescript), die die Expression in einem Reagenzgefäß von T7-, T3- oder SP6-Promotoren oder die Expression in Säugetierzellen von CMV- oder SV40-Promotoren ermöglichen, kloniert. In die Multiple-Klonierungs-Stelle (MCS) dieser Vektoren wurden Inserts platziert, typischerweise an oder nahe den terminalen Enden der MCS, um den größten Teil der MCS zu deletieren und dadurch etwaige mögliche Probleme bei der Effizienz der Expression im Anschluss an das Klonieren zu verhindern.

Sequenzprotokolle

[0036] Klone, die Matrizen-cDNAs und Ribozyme enthielten, wurden unter Verwendung von Standardprotokollen von einer automatisierten Sequenzieranlage von ABI sequenziert.

Expression von RNAs

[0037] RNA wurde von Klonen in vitro unter Verwendung von einem im Handel erhältlichen Ribomax-Expressionssystem (Promega) und von Standardprotokollen erhalten. RNA-Reinigungen wurden unter Verwendung der RNA-Reinigungsapparatur Bio-101 oder einer Lösung von 0,3 M Natriumacetat und 0,2%igem SDS nach Isolierung aus Polyacrylamidgelen unternommen. Spaltungsreaktionen wurden unter Verwendung von Standardprotokollen mit variierenden $MgCl_2$ -Konzentrationen (0–15 mM) bei 37 °C, typischerweise über 3 Stunden, durchgeführt. Bei den zuvor bestimmten optimalen $MgCl_2$ -Konzentrationen wurden bis zu 5 Stunden lang Zeitpunkte durchgeführt. Radioaktiv markierte RNA-Produkte wurden erhalten, indem in den Expressionsreaktionen α - ^{32}P rUTP (Amersham) inkorporiert wurde (Gaughan et al. 1995). Markierte RNA-Produkte wurden auf Polyacrylamidgelen laufen gelassen, bevor Spaltungsreaktionen zum Zweck der RNA-Reinigung unternommen wurden, und im Anschluss an Spaltungsreaktionen, um zu bestimmen, ob die RNA-Spaltung erreicht worden war. Spaltungsreaktionen wurden mit 5 mM Tris-HCl bei pH 8,0 und variierenden Konzentrationen von $MgCl_2$ bei 37 °C unternommen.

RNA-Sekundärstrukturen

[0038] Prognosen der Sekundärstrukturen von mRNAs von menschlichem Rhodopsin und Mausrhodopsin, menschlichem Peripherin und menschlichem Kollagen 1A2 wurden unter Verwendung des Programms RNALotFold erhalten. Ribozyme und Antisense wurden gestaltet, um auf Bereiche der RNA zu zielen, die als den Suppressionseffektoren gegenüber zugänglich prognostiziert wurden, zum Beispiel offene Schleifenstrukturen. Die Intaktheit der offenen Schleifenstrukturen wurden von den 10 wahrscheinlichsten RNA-Strukturen evaluiert. Zusätzlich dazu wurden prognostizierte RNA-Strukturen für abgeschnittene RNA-Produkte erzeugt, und die Intaktheit der offenen Schleifen zwischen RNAs voller Länge und abgeschnittenen RNAs wurde verglichen.

MATRIZEN und RIBOZYME

Menschliches Rhodopsin

Matrizen-cDNA

[0039] Die cDNA von menschlichem Rhodopsin wurde in die HindIII- und EcoRI-Stellen der MCS von pCDNA3 in einer 5'-3'-Orientierung kloniert, was die anschließende Expression von RNA von dem T7- oder CMV-Promotor in dem Vektor ermöglichte. Die 5'-UTR-Sequenz voller Länge wurde in diesen Klon eingesetzt, wobei eine Primer-getriebene PCR-Mutagenese und ein DNA-Fragment von HindIII (in pCDNA3) bis BstEII (in der kodierenden Sequenz der cDNA von menschlichem Rhodopsin) verwendet wurde (Sequenz 1).

cDNA mit geänderter Sequenz in einer Wobble-Position

[0040] Die Hybrid-cDNA von menschlichem Rhodopsin mit einer Einzelbasenänderung, einem C→G-Wechsel (in Position 477) wurde durch eine Primer-gelenkte PCR-Mutagenese in cDNA von menschlichem Rhodopsin eingeführt, wobei eine HindIII-BstEII-PCR-Kassette verwendet wurde. Dieser Sequenzwechsel geschieht an einer inaktiven Position – er bringt keine Aminosäuresubstitution hervor – doch er eliminiert die Ribozym-Spaltungsstelle (GUX→GUG). Das Hybrid-Rhodopsin wurde in einer 5'-3'-Orientierung in pCDNA3 kloniert, was eine anschließende Expression von RNA von dem T7- oder dem CMV-Promotor in dem Vektor ermöglichte (Sequenz 2).

Rhodopsin-cDNA, die eine Pro23Leu-adRP-Mutation trägt

[0041] Eine adRP-Mutation des menschlichen Rhodopsins, ein C→T-Wechsel (bei Codon 23) wurde durch eine Primer-gelenkte PCR-Mutagenese in cDNA von menschlichem Rhodopsin eingeführt, wobei eine HindIII-BstEII-PCR-Kassette verwendet wurde. Dieser Sequenzwechsel resultiert in der Substitution eines Prolinrests durch einen Leucinrest. Zusätzlich dazu erschafft der Nukleotidwechsel eine Ribozym-Spaltungsstelle (CCC→CTC). Das mutierte Rhodopsin wurde in einer 5'-3'-Orientierung in die HindIII- und EcoRI-Stellen von pCDNA3 kloniert, was eine anschließende Expression von RNA von dem T7- oder dem CMV-Promotor in dem Vektor ermöglichte (Sequenz 3).

Ribozym-Konstrukte

[0042] Ein Hammerhead-Ribozym (Rz10 genannt), das gestaltet war, um auf eine große, konservierte, offene Schleifenstruktur in der RNA von den kodierenden Regionen des Gens zu zielen, wurde im Anschluss an die Synthese und Hybridisierung in die HindIII- und XbaI-Stellen von pCDNA3 kloniert, was wiederum die Expression von RNA von dem T7- oder dem CMV-Promotor in dem Vektor ermöglichte (Sequenz 4). Die Zielstelle war GUC (die GUX-Regel) auf Position 475-477 der Sequenz des menschlichen Rhodopsins. Ein Hammerhead-Ribozym (Rz20 genannt), das gestaltet war, um auf eine offene Schleifenstruktur in der RNA von der kodierenden Region eines mutierten Rhodopsin-Gens mit einer Pro23Leu-Mutation zu zielen, wurde im Anschluss an die Synthese und Hybridisierung in die HindIII- und XbaI-Stellen von pCDNA3 kloniert, was wiederum die Expression von RNA von dem T7- oder dem CMV-Promotor in dem Vektor ermöglichte (Sequenz 5). Die Zielstelle war CTC (die NUX-Regel) bei Codon 23 der Sequenz des menschlichen Rhodopsin (Zugangsnummer: K02281). Antisense-Flanken sind unterstrichen.

Rz10: GGACGGTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACGTAGAG

Rz20: TACTCGAACTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAGGCTGC

Mausrhodopsin

Matrizen-cDNA

[0043] Die Mausrhodopsin-cDNA voller Länge wurde in die EcoRI-Stellen der MCS von pCDNA3 in einer 5'-3'-Orientierung kloniert, was die anschließende Expression von RNA von dem T7- oder CMV-Promotor in dem Vektor ermöglichte (Sequenz 6).

cDNA mit geänderter Sequenz in einer Wobble-Position

[0044] Die Hybrid-cDNA von Mausrhodopsin mit einer Einzelbasenänderung, einem T→C-Wechsel (in Position 1460) wurde in Mausrhodopsin-cDNA durch eine Primer-gelenkte PCR-Mutagenese eingeführt, wobei

eine HindIII-Eco47III-PCR-Kassette verwendet wurde. Dieser Sequenzwechsel geschieht an einer inaktiven Position – er bringt keine Aminosäuresubstitution hervor – doch er eliminiert die Ribozym-Spaltungsstelle (TTT→TCT). Das Hybrid-Rhodopsin wurde in einer 5'-3'-Orientierung in pCDNA3 kloniert, was eine anschließende Expression von RNA von dem T7- oder dem CMV-Promotor in dem Vektor ermöglichte (Sequenz 7).

Ribozym-Konstrukte

[0045] Ein Hammerhead-Ribozym (Rz33 genannt), das gestaltet war, um auf eine große, robuste, offene Schleifenstruktur in der RNA von den kodierenden Regionen des Gens zu zielen, wurde im Anschluss an die Synthese und Hybridisierung in die HindIII- und XbaI-Stellen von pCDNA3 kloniert, was wiederum die Expression von RNA von dem T7- oder dem CMV-Promotor in dem Vektor ermöglichte (Sequenz 8). Die Zielstelle war TTT (die NUX-Regel) auf Position 1459-1461 der Sequenz des Mausrhodopsins. (Zugangsnummer: M55171).

[0046] Antisense-Flanken sind unterstrichen.

Rz33: GGCACATCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAAATTGG

Menschliches Peripherin

Matrizen-cDNA

[0047] Die cDNA von menschlichem Peripherin voller Länge wurde in die EcoRI-Stellen der MCS von pCDNA3 in einer 5'-3'-Orientierung kloniert, was die anschließende Expression von RNA von dem T7- oder CMV-Promotor in dem Vektor ermöglichte (Sequenz 9).

cDNAs mit geänderter Sequenz in einer Wobble-Position

[0048] Eine Hybrid-DNA von menschlichem Peripherin mit einer Einzelbasenänderung, einem A→G-Wechsel (in Position 257) wurde durch eine Primer-gelenkte PCR-Mutagenese in DNA von menschlichem Peripherin eingeführt (Vorwärts-257-Mutationsprimer-5'CATGGCGCTGCTGAAAGTCA3'- der umgekehrte 257-Primer war zu dem Vorwärtsprimer komplementär). Dieser Sequenzwechsel tritt an einer inaktiven Position auf – er bringt keine Aminosäuresubstitution hervor – doch er eliminiert die Ribozym-Spaltungsstelle (CTA→CTG) (Sequenz 10). Eine zweite Hybrid-DNA von menschlichem Peripherin mit einer Einzelbasenänderung, einem A→G-Wechsel (in Position 359) wurde wieder durch eine Primer-gelenkte PCR-Mutagenese in DNA von menschlichem Peripherin eingeführt (Vorwärts-359-Mutationsprimer-5'CATCTTCAGCCTGGGACTGT3'- der umgekehrte 359-Primer war zu dem Vorwärtsprimer komplementär) (Sequenz 11). Dieser Sequenzwechsel tritt auf ähnliche Weise in einer inaktiven Position auf – er bringt keine Aminosäuresubstitution hervor – doch er eliminiert wiederum die Ribozym-Spaltungsstellen (CTA→CTG). Die Ribozym-Spaltungsstellen bei 255-257 und 357-359 treten bei unterschiedlichen offenen Schleifenstrukturen auf, wie von dem Programm RNAPlot-Fold prognostiziert. Hybrid-Peripherin-DNAs umfassten die T7-Promotor-Sequenz, die eine anschließende Expression von RNA ermöglichte.

Ribozym-Konstrukte

[0049] Hammerhead-Ribozyme (Rz30 und Rz31 genannt), die gestaltet waren, um auf robuste, offene Schleifenstrukturen in der RNA von den kodierenden Regionen des Gens zu zielen, wurden im Anschluss an die Synthese und Hybridisierung in die HindIII- und XbaI-Stellen von pCDNA3 kloniert, was wiederum die Expression von RNA von dem T7- oder dem CMV-Promotor in dem Vektor ermöglichte (Sequenzen 12 + 13). Die Zielstellen waren beide CTA (die NUX-Regel) auf Positionen 255-257 bzw. 357-359 der Sequenz des menschlichen Peripherins. (Zugangsnummer: M73531). Antisense-Flanken sind unterstrichen.

Rz30: ACTTTCAGCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAGCGCCA

Rz31: ACAGTCCCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAGGCTGAA

Menschliches Typ-I-Kollagen-COL1A2

Matrizen-cDNA

[0050] Eine cDNA von menschlichem Typ-I-Kollagen 1A2 wurde vom ATCC erhalten (Zugangsnummer: Y00724). Ein natürlich vorkommender Polymorphismus, der einen T→A-Nukleotidwechsel involviert, wurde zuvor bei Kollagen 1A2 an Positionen 907 des Gens festgestellt (Filie et al. 1993). Der Polymorphismus tritt in einer prognostizierten offenen Schleifenstruktur der RNA von menschlichem Kollagen 1A2 auf. Polymorphe

Varianten des menschlichen Kollagens 1A2 wurden durch PCR-gelenkte Mutagenese unter Verwendung einer HindIII-XbaI-PCR-Kassette erzeugt. Resultierende Klone enthielten den folgenden Polymorphismus: Kollagen 1A2 (A) weist ein A-Nukleotid auf Position 907 auf (Sequenz 14). Im Gegensatz dazu weist das menschliche Kollagen 1A2 (B) ein T-Nukleotid auf Position 907 auf (Sequenz 15). Im Kollagen 1A2 (B) gibt es eine Ribozym-Zielstelle, die eine GTC-Stelle (906-908) ist, doch diese Spaltungsstelle geht in Kollagen 1A2 (A) verloren, da die Sequenz auf GAC (906-908) geändert wird, wodurch die Ribozym-Zielstelle zerstört wird.

Ribozym-Konstrukte

[0051] Ein Hammerhead-Ribozym (Rz907 genannt) wurde gestaltet, um auf eine prognostizierte offene Schleifenstruktur in der RNA von der kodierenden Region der polymorphen Variante des Gens für menschliches Kollagen 1A2 zu zielen. Rz907-Oligonukleotid-Primer wurden synthetisiert, hybridisiert und in die HindIII- und XbaI-Stellen von pCDNA3 kloniert, was wiederum die anschließende Expression von RNA von dem T7- oder CMV-Promotor in dem Vektor ermöglichte (Sequenz 16). Die Zielstelle war eine GUX-Stelle auf Position 906-908 der Sequenz des menschlichen Typ-I-Kollagens 1A2 (Zugangsnummer: Y00724). Antisense-Flanken sind unterstrichen.

Rz907: CGGCGGCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACCAGCA

HINWEISTEXTE ZU DEN FIGUREN

Diagramm 1

[0052] pBR322 wurde mit MspI geschnitten, radioaktiv markiert und auf einem Polyacrylamidgel laufen gelassen, um die Trennung der resultierenden DNA-Fragmente zu ermöglichen. Die Größe dieser Fragmente wird in dem Diagramm 1 gegeben. Diese DNA-Leiter wurde dann auf anschließenden Polyacrylamidgelen (4-8 %) verwendet, um eine Schätzung der Größe der RNA-Produkte, die auf den Gelen laufen gelassen wurden, bereitzustellen. Es besteht jedoch zwischen der Mobilität von DNA und RNA ein signifikanter Unterschied, je nach dem Prozentsatz des Polyacrylamids und den Gellaufbedingungen – daher stellt der Marker eine Schätzung der Größe der Transkripte bereit.

[Fig. 1](#)

A: cDNA von menschlichem Rhodopsin wurde von dem T7-Promotor bis zur BstEII-Stelle in der kodierenden Sequenz exprimiert. Resultierende RNA wurde mit Rz10-RNA in 15 mM Magnesiumchlorid gemischt und über variierende Zeiten bei 37 °C inkubiert. Spuren 1-4: RNA von menschlichem Rhodopsin und Rz10-RNA nach Inkubation bei 37 °C mit 15 mM Magnesiumchlorid über 0, 1, 2 bzw. 3 Stunden. Die Größe der exprimierten RNAs und Spaltungsprodukte ist wie erwartet (Tabelle 1). Die vollständige Spaltung von RNA von menschlichem Rhodopsin wurde nach 1 Stunde erhalten, wobei ein geringer Restbetrag an intakter RNA vorlag. Spur 6 ist intakte, nicht adaptierte RNA von menschlichem Rhodopsin (BstEII) allein. Spur 5 ist nicht adaptierte RNA von menschlichem Rhodopsin (FspI) allein und bezieht sich auf [Fig. 1B](#). Von oben nach unten sind RNA von menschlichem Rhodopsin und die zwei Spaltungsprodukte von dieser RNA mit Pfeilen hervorgehoben.

B: Die nicht adaptierte cDNA von menschlichem Rhodopsin wurde von dem T7-Promotor bis zur FspI-Stelle in der kodierenden Sequenz exprimiert. Die adaptierte cDNA von menschlichem Rhodopsin wurde von dem T7-Promotor bis zur BstEII-Stelle in der kodierenden Sequenz exprimiert. Spuren 1-4: Resultierende RNAs wurden mit Rz10 und 15 mM Magnesiumchlorid zusammengemischt und bei 37 °C über variierende Zeiten (0, 1, 2 bzw. 3 Stunden) inkubiert. Die kleineren, nicht adaptierten Rhodopsin-Transkripte wurden durch Rz10 gespalten, während die größeren, adaptierten Transkripte vor der Spaltung durch Rz10 geschützt waren. Die Spaltung der adaptierten geschützten Transkripte hätte in Produkten von 564 Basen und 287 Basen resultiert – das 564-Basen-Produkt liegt offensichtlich nicht vor – das 287bp-Produkt wird auch durch die Spaltung der nicht adaptierten Transkripte des menschlichen Rhodopsins erzeugt und liegt somit vor (FspI). Nach 3 Stunden war der größte Teil der nicht adaptierten Rhodopsin-Transkripte von Rz10 gespalten. Spur 5 enthält die intakte, nicht adaptierte RNA von menschlichem Rhodopsin (BstEII) allein. Von oben nach unten werden adaptierte, ungespaltene Transkripte von menschlichem Rhodopsin, restliche nicht adaptierte, ungespaltene Transkripte von menschlichem Rhodopsin und das größere der Spaltungsprodukte von nicht adaptierten Transkripten von menschlichem Rhodopsin durch Pfeile hervorgehoben. Das kleinere 22-Basen-Spaltungsprodukt von den nicht adaptierten Transkripten von menschlichem Rhodopsin ist über das Gel hinaus gelaufen.

Fig. 2

A: Nicht adaptierte und adaptierte cDNAs von menschlichem Rhodopsin wurden von dem T7-Promotor zu dem Acyl nach der kodierenden Sequenz bzw. der BstEII-Stelle in der kodierenden Sequenz exprimiert. Die Größe der exprimierten RNAs und Spaltungsprodukte war wie prognostiziert (Tabelle 1). Resultierende RNAs wurden mit Rz10-RNA bei variierenden Magnesiumchloridkonzentrationen zusammengemischt und bei 37 °C 3 Stunden lang inkubiert. Spur 1: Intakte, nicht adaptierte RNA von menschlichem Rhodopsin (Acyl) allein. Spuren 2-5: Nicht adaptierte und adaptierte RNAs von menschlichem Rhodopsin und Rz10-RNA nach Inkubation bei 37 °C mit 0, 5, 10 bzw. 15 mM MgCl₂. Eine fast vollständige Spaltung der größeren, nicht adaptierten RNA von menschlichem Rhodopsin wurde erhalten, wobei bei 5 mM MgCl₂ ein geringer Restbetrag an intakter RNA vorlag. Im Gegensatz dazu blieb die adaptierte RNA von menschlichem Rhodopsin intakt. Von oben nach unten sind die nicht adaptierten und adaptierten Rhodopsin-RNAs und zwei Spaltungsprodukte von der nicht adaptierten RNA von menschlichem Rhodopsin durch Pfeile hervorgehoben. Spur 6 ist intakte, adaptierte RNA von menschlichem Rhodopsin (BstEII) allein.

B: Die adaptierte cDNA von menschlichem Rhodopsin wurde von dem T7-Promotor bis zur BstEII-Stelle in der kodierenden Sequenz exprimiert. Spuren 1-4: Resultierende RNA wurde mit Rz10 und 0, 5, 10 bzw. 15 mM Magnesiumchlorid zusammengemischt und 3 Stunden lang bei 37 °C inkubiert. Die adaptierten Rhodopsin-Transkripte wurden nicht von Rz10 gespalten. Die Spaltung von adaptierten Transkripten hätte in Spaltungsprodukten von 564 Basen und 287 Basen resultiert, die offensichtlich nicht vorliegen. Spur 5: Intakte, adaptierte RNA von menschlichem Rhodopsin (BstEII) allein. Spur 4: RNA fehlt aufgrund eines La-defehlers oder Abbau. Die adaptierte, nicht gespaltene RNA von menschlichem Rhodopsin wird durch einen Pfeil hervorgehoben.

C: Nicht adaptierte und adaptierte cDNAs von menschlichem Rhodopsin wurden von dem T7-Promotor zu dem Acyl nach der kodierenden Sequenz bzw. der BstEII-Stelle in der kodierenden Sequenz exprimiert. Die Größe der exprimierten RNAs und Spaltungsprodukte war wie prognostiziert (Tabelle 1). Resultierende RNAs wurden mit Rz10-RNA bei variierenden Magnesiumchloridkonzentrationen zusammengemischt und bei 37 °C 3 Stunden lang inkubiert. Spur 1: DNA-Leiter wie in Diagramm 1. Spuren 2-5: Nicht adaptierte und adaptierte RNAs von menschlichem Rhodopsin und Rz10-RNA nach Inkubation bei 37 °C mit 0, 5, 10 bzw. 15 mM MgCl₂. Eine fast vollständige Spaltung der größeren, nicht adaptierten RNA von menschlichem Rhodopsin wurde erhalten, wobei bei 5 und 10 mM MgCl₂ ein geringer Restbetrag an intakter RNA vorlag. Im Gegensatz dazu blieb die adaptierte RNA von menschlichem Rhodopsin intakt. Spur 6: Adaptierte RNA von menschlichem Rhodopsin (BstEII) allein. Spur 7: Nicht adaptierte RNA von menschlichem Rhodopsin (Acyl) allein. Spur 8: DNA-Leiter wie in Diagramm 1. Von oben nach unten sind die nicht adaptierte und adaptierte Rhodopsin-RNA und zwei Spaltungsprodukte von der nicht adaptierten RNA von menschlichem Rhodopsin durch Pfeile hervorgehoben. Die Trennung der adaptierten RNA von menschlichem Rhodopsin (851 Basen) und dem größeren der Spaltungsprodukte von der nicht adaptierten RNA (896 Basen) ist in diesem Gel unvollständig (das Gel müsste weiter laufen gelassen werden, um die Trennung zu erreichen) – doch die Trennung dieser zwei RNAs ist in [Fig. 2A](#) demonstriert.

Fig. 3

[0053] Die mutierte (Pro23Leu) cDNA von menschlichem Rhodopsin wurde von dem T7-Promotor bis zur BstEII-Stelle in der kodierenden Sequenz exprimiert. Gleichmaßen wurde der Rz20-Klon bis zur XbaI-Stelle exprimiert. Resultierende RNAs wurden mit 10 mM Magnesiumchloridkonzentrationen bei 37 °C über variierende Zeiten zusammengemischt. Die Größe der exprimierten RNAs und Spaltungsprodukte war wie prognostiziert (Tabelle 1). Spur 1: DNA-Leiter wie in Diagramm 1. Spur 2: Pro23Leu-RNA von menschlichem Rhodopsin allein. Spuren 3-7: Pro23Leu-RNA von menschlichem Rhodopsin und Rz20-RNA nach Inkubation bei 37 °C mit 10 mM MgCl₂ über 0 Min., 30 Min., 1 Std., 2 Std. bzw. 5 Std. Es wurde eine fast vollständige Spaltung der mutierten Rhodopsin-Transkripte erhalten, wobei selbst nach 5 Stunden ein Restbetrag an intakter RNA zurückblieb. Spur 8: DNA-Leiter wie in Diagramm 1. Von oben nach unten sind intakte mutierte RNA von Rhodopsin und die zwei Spaltungsprodukte von der mutierten RNA von menschlichem Rhodopsin mit Pfeilen hervorgehoben.

Fig. 4

[0054] Die mutierte (Pro23Leu) cDNA von menschlichem Rhodopsin wurde von dem T7-Promotor bis zur BstEII-Stelle in der kodierenden Sequenz exprimiert. Gleichmaßen wurde der Rz10-Klon bis zur XbaI-Stelle exprimiert. Resultierende RNAs wurden mit 10 mM Magnesiumchloridkonzentrationen bei 37 °C über variierende Zeiten zusammengemischt. Die Größe der exprimierten RNAs und Spaltungsprodukte war wie prognostiziert (Tabelle 1). Spur 1: DNA-Leiter wie in Diagramm 1. Spur 2: Pro23Leu-RNA von menschlichem Rhodopsin

sin allein. Spuren 3-7: Pro23Leu-RNA von menschlichem Rhodopsin und Rz10-RNA nach Inkubation bei 37 °C mit 10 mM MgCl₂ über 0 Min., 30 Min., 1 Std., 2 Std. bzw. 5 Std. Es wurde eine fast vollständige Spaltung der mutierten RNA von menschlichem Rhodopsin erhalten, wobei selbst nach 5 Stunden ein Restbetrag an intakter RNA zurückblieb (Spur 7). Spur 8: DNA-Leiter wie in Diagramm 1. Von oben nach unten sind intakte mutierte RNA von Rhodopsin und die zwei Spaltungsprodukte von der mutierten RNA von menschlichem Rhodopsin mit Pfeilen hervorgehoben.

Fig. 5

[0055] Der cDNA-Klon von Mausrhodopsin wurde in vitro von dem T7-Promotor bis zur Eco47III-Stelle in der kodierenden Sequenz exprimiert. Gleichmaßen wurde der Rz33-Klon bis zur XbaI-Stelle exprimiert. A: Resultierende RNAs wurden mit 10 mM Magnesiumchlorid bei 37 °C über variierende Zeiten zusammengemischt. Die Größe der exprimierten RNAs und Spaltungsprodukte war wie prognostiziert (Tabelle 1). DNA-Leiter wie in Diagramm 1. Spur 1: RNA von Mausrhodopsin allein. Spuren 2-5: RNA von Mausrhodopsin und Rz33-RNA nach Inkubation bei 37 °C mit 10 mM MgCl₂ bei 0, 5, 7,5 bzw. 10 mM MgCl₂ über 3 Stunden. Eine Spaltung von RNA von Mausrhodopsin wurde nach Zugabe von bivalenten Ionen erhalten (Spur 3). Restliche, ungespaltene RNA von Mausrhodopsin und die zwei Spaltungsprodukte von der RNA von Mausrhodopsin sind mit Pfeilen hervorgehoben. B: Der adaptierte cDNA-Klon von Mausrhodopsin wurde mit einem Basenwechsel in Position 1460 in vitro von dem T7-Promotor bis zur Eco47III-Stelle in der kodierenden Sequenz exprimiert. Gleichmaßen wurde der Rz33-Klon bis zur XbaI-Stelle exprimiert. Resultierende RNAs wurden mit verschiedenen Magnesiumchloridkonzentrationen bei 37 °C über 3 Stunden zusammengemischt. Die Größe der exprimierten RNAs und Spaltungsprodukte war wie prognostiziert (Tabelle 1). Spur 1: DNA-Leiter wie in Diagramm 1. Spur 2: Adaptierte RNA von Mausrhodopsin allein. Spuren 3-6: Adaptierte RNA von Mausrhodopsin und Rz33-RNA nach Inkubation bei 37 °C mit 0, 5, 7,5 bzw. 10 mM MgCl über 3 Stunden bei 37 °C. Es wurde keine Spaltung der adaptierten RNA von Mausrhodopsin beobachtet. Die intakte, adaptierte RNA von Mausrhodopsin ist mit einem Pfeil hervorgehoben.

Fig. 6

[0056] Der cDNA-Klon von menschlichem Peripherin wurde in vitro von dem T7-Promotor bis zur BgIII-Stelle in der kodierenden Sequenz exprimiert. Gleichmaßen wurde Rz30 (das auf eine Spaltungsstelle bei 255-257 zielt) bis zur XbaI-Stelle exprimiert. A: Resultierende RNAs wurden mit 10 mM Magnesiumchlorid bei 37 °C über variierende Zeiten zusammengemischt. Spur 1: DNA-Leiter wie in Diagramm 1. Spur 2: Intakte RNA von menschlichem Peripherin allein. Spuren 3-7: RNA von menschlichem Peripherin und Rz30-RNA nach Inkubation bei 37 °C mit 10 mM MgCl über 3 Std., 2 Std., 1 Std., 30 Min. bzw. 0 Min. Spur 8: DNA-Leiter wie in Diagramm 1. Von oben nach unten sind intakte RNA von menschlichem Peripherin und die zwei Spaltungsprodukte von der RNA von menschlichem Peripherin mit Pfeilen hervorgehoben. B: Resultierende RNAs wurden mit Rz30-RNA bei variierenden Magnesiumchloridkonzentrationen gemischt und bei 37 °C 3 Std. lang inkubiert. Spur 1: DNA-Leiter wie in Diagramm 1. Spuren 2-5: RNA von menschlichem Peripherin und Rz30 nach Inkubation bei 37 °C mit 10, 7,5, 5 bzw. 0 mM Magnesiumchlorid über 3 Std. Spur 6: Intakte RNA von menschlichem Peripherin allein. Die Größe der exprimierten RNAs und Spaltungsprodukte ist wie erwartet (Tabelle 1). Eine signifikante Spaltung von RNA von menschlichem Peripherin wurde erhalten, wobei bei jeder MgCl₂-Konzentration ein Restbetrag an intakter RNA vorlag. Von oben nach unten sind RNA von menschlichem Peripherin und die zwei Spaltungsprodukte von dieser RNA mit Pfeilen hervorgehoben. C: Die adaptierte DNA von menschlichem Peripherin mit einem Einzelbasenwechsel in Position 257 wurde von dem T7-Promotor bis zur AvrII-Stelle in der kodierenden Sequenz exprimiert. Die resultierende RNA wurde mit Rz30 bei verschiedenen Magnesiumchloridkonzentrationen gemischt und bei 37 °C 3 Std. lang inkubiert. Spur 1: DNA-Leiter wie in Diagramm 1. Spur 2: Intakte adaptierte RNA von menschlichem Peripherin allein. Spuren 3-6: Adaptierte RNA von menschlichem Peripherin und Rz30 nach Inkubation bei 37 °C mit 0, 5, 7,5 bzw. 10 mM Magnesiumchlorid über 3 Std. Spur 7: DNA-Leiter wie in Diagramm 1. D: Die nicht adaptierte cDNA von menschlichem Peripherin und das adaptierte DNA-Fragment von menschlichem Peripherin mit einem Einzelbasenwechsel auf Position 257 wurden von dem T7-Promotor bis zur BgIII- bzw. AvrII-Stelle in der kodierenden Sequenz exprimiert. Resultierende RNAs wurden mit Rz30 bei verschiedenen Magnesiumchloridkonzentrationen gemischt und bei 37 °C 3 Std. lang inkubiert. Spur 1: DNA-Leiter wie in Diagramm 1. Spur 2: Intakte, nicht adaptierte RNA von menschlichem Peripherin allein. Spur 3: Intakte adaptierte RNA von menschlichem Peripherin allein. Spuren 4-7: Nicht adaptierte und adaptierte RNAs von menschlichem Peripherin und Rz30 nach Inkubation bei 37 °C mit 0, 5, 7,5 bzw. 10 mM Magnesiumchlorid über 3 Std. bei 37 °C. Selbst nach 3 Stunden wurde keine Spaltung der adaptierten RNA von menschlichem Peripherin beobachtet, wohingegen eine signifikante Reduktion der nicht adaptierten RNA über denselben Zeitrahmen beobachtet wurde. Spur 8: DNA-Leiter wie in Diagramm 1. Von oben nach unten sind restliche nicht adaptierte RNA von menschlichem Peripherin, adaptierte RNA von

menschlichem Peripherin und die zwei Spaltungsprodukte mit Pfeilen hervorgehoben.

Fig. 7

[0057] Ein cDNA-Klon von menschlichem Peripherin wurde in vitro von dem T7-Promotor bis zur BglII-Stelle in der kodierenden Sequenz exprimiert. Gleichmaßen wurde das Rz31 (das auf eine Spaltungsstelle bei 357-359 zielt) bis zur XbaI-Stelle exprimiert. A: Resultierende RNAs wurden mit 10 mM Magnesiumchlorid bei 37 °C über variierende Zeiten zusammengemischt. Spur 1: DNA-Leiter wie in Diagramm 1. Spuren 2-6: RNA von menschlichem Peripherin und Rz31-RNA nach Inkubation bei 37 °C mit 10 mM MgCl₂ über 3 Std., 2 Std., 1 Std., 30 Min. bzw. 0 Min. Eine gesteigerte Spaltung von RNA von Mausrhodopsin wurde im Zeitablauf erhalten – jedoch verblieb selbst nach 3 Stunden noch signifikante restliche intakte RNA (Spur 2). Spur 7: Intakte RNA von menschlichem Peripherin allein. Spur 8: DNA-Leiter wie in Diagramm 1. Von oben nach unten sind intakte RNA von menschlichem Peripherin und die zwei Spaltungsprodukte von der RNA von menschlichem Peripherin mit Pfeilen hervorgehoben. B: Resultierende RNAs wurden mit Rz31-RNA bei variierenden Magnesiumchloridkonzentrationen gemischt und bei 37 °C 3 Std. lang inkubiert. Spur 1: DNA-Leiter wie in Diagramm 1. Spuren 2-5: RNA von menschlichem Peripherin und Rz31 nach Inkubation bei 37 °C mit 10, 7,5, 5 bzw. 0 mM Magnesiumchlorid über 3 Std. Die Größe der exprimierten RNAs und Spaltungsprodukte ist wie erwartet (Tabelle 1). Eine signifikante Spaltung von RNA von menschlichem Peripherin wurde erhalten, wobei bei jeder MgCl₂-Konzentration ein Restbetrag an intakter RNA vorlag (Spuren 2-4). Spur 6: Intakte RNA von menschlichem Peripherin allein. Spur 7: DNA-Leiter wie in Diagramm 1. Von oben nach unten sind RNA von menschlichem Peripherin und die zwei Spaltungsprodukte von dieser RNA mit Pfeilen hervorgehoben. C: Die adaptierte DNA von menschlichem Peripherin mit einem Einzelbasenwechsel in Position 359 wurde von dem T7-Promotor bis zur BglII-Stelle in der kodierenden Sequenz exprimiert. Resultierende RNA wurde mit Rz31 bei verschiedenen Magnesiumchloridkonzentrationen gemischt und bei 37 °C 3 Std. lang inkubiert. Spur 1: DNA-Leiter wie in Diagramm 1. Spur 2: Intakte adaptierte RNA von menschlichem Peripherin allein. Spuren 3-6: Adaptierte RNA von menschlichem Peripherin und Rz31 nach Inkubation bei 37 °C mit 0, 5, 7,5 bzw. 10 mM Magnesiumchlorid über 3 Std. Selbst nach 3 Stunden wurde keine Spaltung der adaptierten RNA von menschlichem Peripherin beobachtet. Spur 7: DNA-Leiter wie in Diagramm 1.

Fig. 8

A: Die cDNA-Klone von menschlichem Kollagen 1A2, die die A- und T-Allele des Polymorphismus in Position 907 enthielten, wurden von dem T7-Promotor bis zur MvnI- bzw. XbaI-Stelle in dem Insert bzw. dem Vektor exprimiert. Resultierende RNAs wurden mit Rz907 und verschiedenen MgCl₂-Konzentrationen zusammengemischt und bei 37 °C 3 Stunden lang inkubiert. Spur 1: Intakte RNA von dem menschlichen Kollagen 1A2 (A), die A-Allele des 907-Polymorphismus enthält. Spur 2: Intakte RNA von dem menschlichen Kollagen 1A2 (B), die T-Allele des 907-Polymorphismus enthält. Spuren 3-5: Menschliches Kollagen 1A2 (A) und (B), die die A- und T-Allel-RNAs repräsentieren, und Rz907, inkubiert mit 0, 5 und 10 mM MgCl₂ bei 37 °C über 3 Stunden. RNA-Transkripte von dem T-Allel, die die 906-908-Zielstelle enthalten, werden von Rz907 bei Zugabe bivalenter Ionen gespalten – es wird eine fast vollständige Spaltung erhalten, wobei ein Restbetrag an Transkript von dem T-Allel verbleibt (Spur 5). Im Gegensatz dazu wurden Transkripte, die von dem A-Allel exprimiert wurden (die kleiner sind, um zwischen dem A-(MvnI) und T-Allel (XbaI) zu unterscheiden) von Rz907 nicht gespalten – es wurden keine Spaltungsprodukte beobachtet. Von oben nach unten sind die RNAs von dem T-Allel, dem A-Allel und die zwei Spaltungsprodukte von dem T-Allel mit Pfeilen hervorgehoben. Spur 6: DNA-Leiter wie in Diagramm 1.

B: Die cDNA-Klone (A) + (B) von menschlichem Kollagen 1A2, die die A- und T-Allele des Polymorphismus bei 907 enthielten, wurden von dem T7-Promotor bis zur MvnI- bzw. XbaI-Stelle in dem Insert bzw. dem Vektor exprimiert. Resultierende RNAs wurden mit Rz907 und 10 mM Magnesiumchlorid zusammengemischt und bei 37 °C über variierende Zeiten inkubiert. Spur 1: DNA-Leiter wie in Diagramm 1. Spur 2: Intakte RNA von dem menschlichen Kollagen 1A2 (A) mit dem A-Allel des 907-Polymorphismus. Spur 3: Intakte RNA von dem menschlichen Kollagen 1A2 (B) mit dem T-Allel des 907-Polymorphismus. Spuren 4-9: A- und T-Allel-RNA von menschlichem Kollagen 1A2 und Rz907 inkubiert mit 10 mM MgCl₂ bei 37 °C über 0, 30 Min., 1 Stunde, 2 Stunden, 3 Stunden bzw. 5 Stunden. RNA-Transkripte von dem T-Allel, die die 906-908-Zielstelle enthalten, werden von Rz907 gespalten – nach 5 Stunden wird eine fast vollständige Spaltung erhalten. Im Gegensatz dazu wurden Transkripte, die von dem A-Allel exprimiert wurden (die kleiner sind, um zwischen dem A-(MvnI) und T-Allel (XbaI) zu unterscheiden) von Rz907 nicht gespalten – es wurden keine Spaltungsprodukte beobachtet. Von oben nach unten sind die RNAs von dem T-Allel, dem A-Allel und die zwei Spaltungsprodukte von dem T-Allel mit Pfeilen hervorgehoben.

Sequenzen

Sequenz 1

Die cDNA von menschlichem Rhodopsin in pCDNA3.

Sequenz 2

Die cDNA von menschlichem Rhodopsin in pCDNA3 mit einem Basenwechsel an einer inaktiven Stelle (477).

Sequenz 3

Mutierte (Pro23Leu) cDNA von menschlichem Rhodopsin in pCDNA3.

Sequenz 4

Rz10, in pCDNA3 kloniert. Es sei bemerkt, dass in einem Antisense-Arm von Rz10 eine Basenfehlpassung existiert.

Sequenz 5

Rz20, in pCDNA3 kloniert.

Sequenz 6

Die cDNA von Mausrhodopsin in pCDNA3.

Sequenz 7

Die cDNA von Mausrhodopsin in pCDNA3 mit einem Basenwechsel an einer inaktiven Stelle (1460).

Sequenz 8

Rz33, in pCDNA3 kloniert.

Sequenz 9

Die cDNA von menschlichem Peripherin in pCDNA3.

Sequenz 10

Das DNA-Fragment von menschlichem Peripherin mit einem Basenwechsel an einer inaktiven Stelle (257).

Sequenz 11

Das DNA-Fragment von menschlichem Peripherin mit einem Basenwechsel an einer inaktiven Stelle (359).

Sequenz 12

Rz30, in pCDNA3 kloniert.

Sequenz 13

Rz31, in pCDNA3 kloniert.

Sequenz 14

Sequenz von Kollagen 1A2 (A), die den A-Polymorphismus auf Position 907 enthält. (Es sei bemerkt, dass eine zusätzliche polymorphe Stelle auf Position 902 existiert).

Sequenz 15

Sequenz von Kollagen 1A2 (B), die den T-Polymorphismus auf Position 907 enthält. (Es sei bemerkt, dass eine zusätzliche polymorphe Stelle auf Position 902 existiert).

Sequenz 16

Rz907, in pCDNA3 kloniert.

Anmerkung:

[0058] Die Sequenzqualität war in der Region mit inaktivem 359-Wechsel des menschlichen Peripherins nicht gut – der Sequenzierprimer befand sich zu weit weg von der Zielstelle, um eine Sequenz guter Qualität zu erreichen (Sequenz 11).

ERGEBNISSE

[0059] cDNA-Klone von menschlichem Rhodopsin und Mausrhodopsin, menschlichem Peripherin und menschlichem Kollagen 1A2 wurden in vitro exprimiert. Ribozyme, die auf spezifische Stellen in den cDNAs von menschlichem Rhodopsin und Mausrhodopsin, menschlichem Peripherin und menschlichem Kollagen 1A2 zielen, wurden auch in vitro exprimiert. cDNA-Klone wurden mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, was in der Produktion von unterschiedlich großen Transkripten nach Expression resultierte. Dies unterstützte die Unterscheidung zwischen RNAs, die von nicht adaptierten und adaptierten cDNAs exprimiert wurden. Restriktionsenzyme, die verwendet wurden, um jeden Klon zu schneiden, die Größe der resultierenden Transkripte und die prognostizierte Größe von Produkten nach der Spaltung durch Ribozyme sind unten in Tabelle 1 gegeben. Genaue Größen der Expressionsprodukte können um ein paar Basen von den geschätzten variieren, da es eine gewisse Mehrdeutigkeit geben kann, was unter anderem die spezifische Base angeht, an der die Transkription anfängt.

Beispiel 1

A: Menschliches Rhodopsin

[0060] Die nicht adaptierte cDNA von menschlichem Rhodopsin und die cDNA von menschlichem Rhodopsin mit einer Einzelnukleotidsubstitution in der kodierenden Sequenz wurden mit BstEII geschnitten und in vitro exprimiert. Der Einzelbasenwechsel tritt an der Dritte-Base-Position oder Wobble-Position des Codons (in Position 477) auf und ändert daher die von diesem Triplet kodierte Aminosäure nicht. Der Rz10-Klon wurde mit XbaI geschnitten und in vitro exprimiert. Die resultierenden RNAs von Ribozym und menschlichem Rhodopsin wurden mit variierenden Konzentrationen von $MgCl_2$ gemischt, um die Spaltung der Matrizen-RNA durch Rz10 zu optimieren. Ein Profil der Spaltung der RNA von menschlichem Rhodopsin durch Rz10 im Zeitablauf ist in [Fig. 1A](#) gegeben. Das $MgCl_2$ -Kurvenprofil, das verwendet wurde, um zu testen, ob adaptierte Transkripte von menschlichem Rhodopsin durch Rz10 gespalten werden können, ist in [Fig. 2B](#) gegeben. Nicht adaptierte und adaptierte cDNAs von menschlichem Rhodopsin wurden mit FspI bzw. BstEII geschnitten, exprimiert und mit Rz10-RNA zusammengemischt, um im Zeitablauf auf Spaltung zu testen ([Fig. 1B](#)). Gleichermaßen wurden nicht adaptierte und adaptierte cDNAs von menschlichem Rhodopsin mit Acyl bzw. BstEII geschnitten, beide wurden in vitro exprimiert und resultierende Transkripte wurden mit Rz10-RNA bei variierenden $MgCl_2$ -Konzentrationen gemischt, um auf Spaltung zu testen ([Fig. 2A](#), [Fig. 2C](#)). In allen Fällen waren die exprimierten RNAs von prognostizierter Größe. Ähnlich wurden die nicht adaptierten Transkripte in allen Fällen in Produkte der prognostizierten Größe gespalten. Die Spaltung der nicht adaptierten RNA von menschlichem Rhodopsin war fast vollständig – es verblieb wenig restliche ungespaltene RNA. In allen Fällen verblieb adaptierte RNA von menschlichem Rhodopsin mit einem Einzelbasenwechsel an einer inaktiven Stelle intakt, das heißt, sie wurde von Rz10 nicht gespalten. Offensichtlich werden Transkripte von der nicht adaptierten cDNA von menschlichem Rhodopsin durch Rz10 gespalten, während Transkripte von dem adaptierten Ersatzgen, das auf eine Weise modifiziert worden war, die die Degeneration des genetischen Codes ausnutzt, vor Spaltung geschützt sind. Es ist wert anzumerken, dass das Acyl-Enzym nach dem Stop-Codon schneidet und die resultierende RNA daher die vollständige kodierende Sequenz des Gens umfasst.

B: Menschliches Rhodopsin

[0061] Rz20 wurde mit XbaI geschnitten und in vitro exprimiert. Ähnlich wurde die Rhodopsin-cDNA, die eine

Pro23Leu-Mutation enthielt, mit BstEII geschnitten und in vitro exprimiert. Resultierende RNAs wurden gemischt und bei 37 °C mit 10 mM MgCl₂ über variierende Zeiten inkubiert. Rz20 war gestaltet, um eine mutationsspezifische Spaltung von Transkripten, die eine Pro23Leu-Rhodopsin-Mutation enthalten, hervorzurufen. Alle exprimierten Produkte und Spaltungsprodukte waren von der korrekten Größe. [Fig. 3](#) demonstriert eine mutationsspezifische Spaltung der mutierten RNA im Zeitablauf, die bei 37 °C mit 10 mM MgCl₂ inkubiert war. Die Spaltung der mutierten Rhodopsin-Transkripte durch Rz10, das auf eine Ribozym-Spaltungsstelle 3' von der Stelle der Pro23Leu-Mutation der kodierenden Sequenz des Rhodopsins zielt, wurde untersucht. Die mutierte Rhodopsin-cDNA und Rz10-Klone wurden mit BstEII bzw. XbaI geschnitten und in vitro exprimiert. Resultierende RNAs wurden gemischt und mit 10 mM MgCl₂ über variierende Zeiten inkubiert ([Fig. 4](#)). Alle exprimierten Produkte und Spaltungsprodukte waren von der korrekten Größe. Rz10 spaltete mutierte Rhodopsin-Transkripte. Durch die Verwendung eines Ersatzgens mit einem Sequenzwechsel um die Rz10-Spaltungsstelle, der in einer Wobble-Position liegt, demonstrierten wir in Beispiel 1A, dass Transkripte von dem Ersatzgen aufgrund des Fehlens der Rz10-Zielstelle intakt bleiben ([Fig. 1B](#), [Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#)). Somit könnte Rz10 verwendet werden, um mutierte Transkripte auf eine Weise zu spalten, die von der Krankheitsmutation selbst unabhängig ist (das heißt, unter Verwendung dieser Stelle), während Transkripte von dem Ersatzgen, die das korrekte Protein kodieren, intakt bleiben würden und daher das Wildtypprotein zur Verfügung stellen könnten.

Beispiel 2

Mausrhodopsin

[0062] Rz33 wurde mit XbaI geschnitten und in vitro exprimiert. Auf ähnliche Weise wurde die cDNA von Mausrhodopsin mit Eco47III geschnitten und in vitro exprimiert. Resultierende RNAs wurden gemischt und mit variierenden Konzentrationen von MgCl₂ inkubiert. Alle exprimierten Produkte und Spaltungsprodukte waren von der korrekten Größe. [Fig. 5A](#) demonstriert eine spezifische Spaltung der RNA von Mausrhodopsin über verschiedene MgCl₂-Konzentrationen, inkubiert bei 37 °C über 3 Stunden. Durch die Verwendung eines Ersatzgens mit einem Sequenzwechsel um die Rz33-Spaltungsstelle (TTT→TCT), der in einer Wobble-Position liegt, demonstrierten wir, dass Transkripte von dem Ersatzgen aufgrund des Fehlens der Rz33-Zielstelle intakt bleiben ([Fig. 5B](#)). Somit könnte Rz33 verwendet werden, um mutierte Transkripte auf eine Weise zu spalten, die von der Krankheitsmutation selbst unabhängig ist (das heißt, unter Verwendung dieser Stelle), während Transkripte von dem Ersatzgen, die das korrekte Protein kodieren, intakt bleiben würden und daher das Wildtypprotein zur Verfügung stellen könnten.

Beispiel 3

Menschliches Peripherin

[0063] Die nicht adaptierte cDNA von menschlichem Peripherin und die zwei DNA-Fragmente von menschlichem Peripherin, die durch PCR-Mutagenese mit einer Einzelnukleotidsubstitution in der kodierenden Sequenz erzeugt wurden, wurden mit BglII bzw. AvrII geschnitten und in vitro exprimiert. Die Einzelbasenwechsel in den adaptierten DNAs treten an Dritte-Base-Positionen oder Wobble-Positionen des Codons (in Position 257 und 359) auf und ändern daher die von diesen Triplets kodierte Aminosäure nicht. Die Rz30- und Rz31-Klone wurden mit XbaI geschnitten und in vitro exprimiert. Die resultierenden Ribozyme und RNAs von menschlichem Rhodopsin wurden mit variierenden Konzentrationen von MgCl₂ gemischt, um die Spaltung der Matrizen-RNA durch Rz30 und Rz31 zu optimieren. Profile der Spaltung der RNA von menschlichem Peripherin durch Rz30 über verschiedene MgCl₂-Konzentrationen und im Zeitablauf sind in [Fig. 6](#) gegeben. Ähnlich sind Profile der Spaltung der RNA von menschlichem Peripherin durch Rz31 über verschiedene MgCl₂-Konzentrationen und im Zeitablauf in [Fig. 7](#) gegeben. In allen Fällen waren die exprimierten RNAs von prognostizierter Größe. Ähnlich wurden nicht adaptierte Transkripte in allen Fällen in Produkte der prognostizierten Größe gespalten. Adaptierte RNAs von menschlichem Rhodopsin wurden mit Rz30- und Rz31-RNA über verschiedene MgCl₂-Konzentrationen zusammengemischt, um zu testen, ob adaptierte Transkripte von menschlichem Peripherin durch Rz30 und Rz31 gespalten werden konnten ([Fig. 6 + 7](#)). Die exprimierten RNAs waren von prognostizierter Größe. In allen Fällen verblieben adaptierte RNAs von menschlichem Peripherin mit Einzelbasenwechseln an inaktiven Stelle intakt, das heißt, sie wurden von Rz30 oder Rz31 nicht gespalten. Offensichtlich werden Transkripte von der nicht adaptierten cDNA von menschlichem Peripherin durch Rz30 und Rz31 gespalten, während Transkripte von den adaptierten Ersatz-DNAs, die auf eine Weise modifiziert worden sind, welche die Degeneration des genetischen Codes ausnutzt, vor Spaltung geschützt sind.

Beispiel 4

Menschliches Kollagen 1A2

[0064] Rz907-Klone, die auf eine polymorphe Stelle in der Sequenz von menschlichem Kollagen 1A2 zielen, wurden mit XbaI geschnitten und in vitro exprimiert. Die cDNA-Klone (A und B) des menschlichen Kollagens 1A2, die zwei Allelformen eines Polymorphismus in der kodierenden Sequenz des Gens auf Positionen 907 enthalten, wurden mit MvnI bzw. XbaI geschnitten, in vitro exprimiert und die RNAs wurde mit Rz907-RNA zusammengemischt, um auf Spaltung der Transkripte durch dieses Ribozym zu testen. Alle exprimierten Transkripte waren von der prognostizierten Größe. RNAs wurden mit variierenden Konzentrationen von $MgCl_2$ gemischt, um die Spaltung der RNAs durch Rz907 zu optimieren (**Fig. 8**).

[0065] Bemerkenswerterweise wird der größte Teil der RNA-Transkripte von menschlichem Kollagen 1A2 (B), das an Position 907 ein T-Nukleotid aufweist, von Rz907 gespalten (**Fig. 8**). Diese Allelform des Gens weist eine Ribozym-Spaltungsstelle auf 906-908 auf. Bemerkenswerterweise ist die Situation bei Transkripten von menschlichem Kollagen 1A2 (A) umgekehrt, wo bei dieser Allelform des Gens aufgrund der Beschaffenheit des an Position 907 vorliegenden Polymorphismus die Ribozym-Spaltungsstelle verloren ging. Im Gegensatz zu Transkripten von menschlichem Kollagen (B) waren Transkripte von menschlichem Kollagen (A) aufgrund der Änderung der Sequenz um die Ribozym-Spaltungsstelle vor Spaltung durch Rz907 geschützt (**Fig. 8**). Die Spaltung des Kollagens 1A2 (B) durch Rz907 war effizient, was mit 2D-Prognosen von offenen RNA-Schleifenstrukturen für den Polymorphismus übereinstimmt – bei dem Allel, das die Rz907-Ribozym-Spaltungsstelle enthält, wird die Zielstelle recht konsequent in einer offenen Schleifenstruktur gefunden. Dieser in einer offenen Schleifenstruktur des Transkriptes gefundene Polymorphismus demonstriert deutlich die Machbarkeit und Nützlichkeit der Verwendung der Degeneration des genetischen Codes bei der Suppression eines endogenen Gens (sei es beim Supprimieren beider Allele oder eines einzelnen Allels an einer polymorphen Stelle) und der Wiederherstellung der Genexpression unter Verwendung eines Gens, das dasselbe Protein kodiert, aber an Dritte-Base-Wobble-Positionen Sequenzmodifizierungen aufweist, die das Ersetzen vor Suppression schützen.

TABELLE 1

	Restriktionsenzym	RNA-Größe	Spaltungsprodukte
Beispiel 1			
Menschliches Rhodopsin	BstEII	851 Basen	287 + 564 Basen
	Acyl	1183 Basen	287 + 896 Basen
	Fspl	309 Basen	287 + 22
Adaptiertes menschliches Rhodopsin	BstEII	851 Basen	
Menschliches Rhodopsin Pro-Leu	BstEII	851 Basen	170 + 681 (Rz20)
Menschliches Rhodopsin Pro-Leu	BstEII	851 Basen	287 + 564 (Rz10)
Rz10	XbaI	52 Basen	
Rz20	XbaI	52 Basen	

(Tabelle 1; Sequenzen 1-5; [Fig. 1-Fig. 4](#))

Beispiel 2			
Mausrhodopsin	Eco47III	774 Basen	400 + 374
Adaptiertes Mausrhodopsin	Eco47III	774 Basen	
Rz33	XbaI	52 Basen	

(Tabelle 1; Sequenzen 6-9; [Fig. 5](#))

Beispiel 3

Menschliches Peripherin	BglII	545 Basen	315 + 230 (Rz30)
Menschliches Peripherin	BglII	545 Basen	417 + 128 (Rz31)
Adaptiertes menschliches Peripherin	AvrII	414 Basen	
Adaptiertes menschliches Peripherin	BglII	545 Basen	
Rz30	XbaI	52 Basen	
Rz31	XbaI	52 Basen	

(Tabelle 1; Sequenzen 10-14; [Fig. 6](#) + 7)

Beispiel 4

Menschliches Kollagen 1A2 (B) -Rz907	XbaI	888 Basen	690 + 198 Basen
Menschliches Kollagen 1A2 (A)	MvnI	837 Basen	
Rz907	XbaI	52 Basen	

(Tabelle 1; Sequenzen 14-16; **Fig. 8**)

TABELLE 2

A: Rhodopsin-Mutationen, daraufhin getestet, ob die prognostizierte offene RNA-Schleifenstruktur, die die Rz10-Zielstelle (475-477) enthält, in mutierten Transkripten intakt bleibt.

Rhodopsin-Mutation	Offene RNA-Schleife, auf die Rz10 zielt
Pro 23 Leu	Intakt
Gly 51 Val	Intakt
Thr 94 Ile	Intakt
Gly 188 Arg	Intakt
Met 207 Arg	Intakt
Ile del 255	Intakt

B: Nutzung der Degeneration des genetischen Codes. Ribozym-Spaltungsstellen sind unterstrichen.

Menschliches Rhodopsin	475-477
Nicht adaptierte Sequenz	TAC <u>GTC</u> ACC GTC CAG Val
Adaptierte Sequenz	475-477 TAC GTG ACC GTC CAG Val
Mausrhodopsin	1459-1461
Nicht adaptierte Sequenz	AAT <u>TTT</u> IAT GTG CCC Phe
Adaptierte Sequenz	1459-1461 AAT TTC TAT GTG CCC Phe
Menschliches Peripherin	255-257
Nicht adaptierte Sequenz	GCG <u>CTA</u> CTG AAA GTC Leu
Adaptierte Sequenz	255-257 GCG CTG CTG AAA GTC Leu
Nicht adaptierte Sequenz	357-359 AGC <u>CTA</u> GGA CTG TTC Leu
Adaptierte Sequenz	357-359 AGC CTG GGA CTG TTC Leu
Menschliches Typ-I-Kollagen 1A2	906-908
Sequenz (B)	GCT <u>GGT</u> CCC GCC GGT Gly
Sequenz (A)	906-908 GCT GGA CCC GCC GGT Gly

DISKUSSION

[0066] In den oben umrissenen Beispielen wurde RNA von cDNAs exprimiert, die vier unterschiedliche Proteine kodierten:

menschliches Rhodopsin und Mausrhodopsin, menschliches Peripherin und menschliches Typ-I-Kollagen 1A2. Rhodopsin und Peripherin wurden verwendet, um die Erfindung für Retinopathien wie etwa adRP beispielhaft darzustellen – Suppressionseffektoren wurden auf die kodierenden Sequenzen dieser Gene gezielt. In dem Fall des Gens für menschliches Kollagen 1A2 wurde ein natürlich vorkommender Polymorphismus verwendet, um die Erfindung und die mögliche Verwendung der Erfindung für Störungen wie etwa OI zu demonstrieren – es könnten jedoch nicht polymorphe Regionen des Gens für Kollagen 1A2 verwendet werden, um eine Suppression zu erreichen. Die Suppressionseffektoren der Wahl in der Erfindung waren Hammerhead-Ribozyme mit Antisense-Flanken, um eine Sequenzspezifität zu definieren. Hammerhead-Ribozyme erfordern NUX-Spaltungsstellen in offenen Schleifenstrukturen von RNA. Besonders könnten bei der Erfindung andere Suppressionseffektoren benutzt werden und zu einer flexibleren Wahl von Zielsequenzen für die Suppression führen. Exprimierte Transkripte von allen vier Genen wurden unter Verwendung von Suppressionseffektoren, die gegen Zielspaltungsstellen gerichtet waren, in vitro signifikant angegriffen. In allen vier Beispielen waren die auf die Spaltungsstellen gerichteten Ribozyme bei der Spaltung von Ziel-RNAs auf die prognostizierte Weise erfolgreich. Zu den die Spaltungsstellen umgebenden Sequenzen komplementäres Antisense wurde erfolgreich verwendet, um die Bindung und Spaltung von Ziel-RNAs auf eine sequenzspezifische Weise hervorzuheben. Zusätzlich dazu waren Transkripte von Ersatzgenen, die unter Verwendung der Degeneration des genetischen Codes so modifiziert worden waren, dass sie ein Wildtypprotein kodierten, völlig vor der Spaltung durch Ribozyme geschützt.

[0067] Die Nützlichkeit eines individuellen Ribozyms, das gestaltet ist, um auf eine NUX-Stelle in einer offenen Schleifenstruktur von Transkripten von einem Gen zu zielen, hängt zum Teil von der robusten Beschaffenheit der offenen RNA-Schleifensstruktur ab, wenn auch verschiedene schädliche Mutationen in dem Transkript vorliegen. Um dies einzuschätzen, analysierten wir RNAPlotFold-Daten von sechs unterschiedlichen, adRP verursachenden Mutationen in dem Rhodopsin-Gen. Für jede davon wurde prognostiziert, dass die große offene RNA-Schleifenstruktur, auf die Rz10 zielt, bei den mutierten Transkripten bewahrt bleibt (Tabelle 2A). Dies wird in Beispiel 1B ([Fig. 3](#)) deutlich demonstriert, wobei eine Pro23Leu-Rhodopsin-Mutation verwendet wird. Rz10 spaltet offensichtlich das mutierte Transkript effektiv in vitro. Die Pro23Leu-Mutation erschafft eine Ribozym-Spaltungsstelle und kann in vitro von Rz20 – einem Ribozym, das spezifisch auf diese Stelle zielt – gespalten werden; dies ist jedoch nicht der Fall für viele Mutationen. Im Gegensatz dazu haben wir gezeigt, dass die Rz10-Ribozym-Spaltungsstelle für unterschiedliche mutierte Rhodopsine verfügbar ist und potenziell genutzt werden könnte, um mehrere Mutationen unter Verwendung eines Ansatzes mit Suppression und Ersatz zu supprimieren.

[0068] In einigen Fällen kann das Vermindern von RNA-Pegeln zu einem parallelen Vermindern von Proteinpegeln führen – dies ist möglicherweise jedoch nicht immer der Fall. In einigen Situationen können Mechanismen eine signifikante Abnahme der Proteinpegel trotz einer wesentlichen Abnahme der Pegel von RNA verhindern. In vielen Fällen wurde jedoch gezeigt, dass die Suppression auf der RNA-Ebene effektiv ist (siehe Stand der Technik). In einigen Fällen wird angenommen, dass Ribozyme eine Suppression nicht nur durch Spaltung der RNA hervorrufen, sondern auch durch einen Antisense-Effekt, aufgrund der Antisense-Arme des Ribozyms, die das katalytische Zentrum umgeben.

[0069] Alle in den Beispielen bereitgestellten Ribozyme waren gestaltet, um an spezifischen Zielstellen zu spalten. Zielstellen für vier der benutzten Ribozyme waren in offenen Schleifenstrukturen in den kodierenden Regionen von Transkripten von drei Retinagenen (menschlichem Rhodopsin und Mäuserhodopsin sowie menschlichem Peripherin) gewählt. In allen Fällen wurde eine sequenzspezifische Spaltung an den Zielspaltungsstellen erhalten ([Fig. 1-7](#)). Zielstellen wurden in offenen Schleifenstrukturen gewählt, um die Spaltung zu optimieren. Zusätzlich wurden die Zielstellen so gewählt, dass sie durch Einzelnukleotidwechsel an Dritte-Base-Wobble-Positionen beseitigt werden konnten und daher für dieselbe Aminosäure kodieren würden (Tabelle 2B). Dies wiederum erlaubte die Erzeugung von Ersatzgenen mit Einzelnukleotidänderungen, die für das Wildtypprotein kodieren. In allen Fällen waren getestete Transkripte von Ersatzgenen vor Spaltung durch Ribozyme geschützt. An den Ersatzgenen könnten weitere Modifizierungen in Wobble-Positionen vorgenommen werden, zum Beispiel um die Bindungsaffinität der das katalytische Ribozym-Zentrum flankierenden Antisense-Arme einzuschränken. Die für Rhodopsin und Peripherin bereitgestellten Beispiele involvieren die Suppression der Expression sowohl von Krankheitsallelen als auch Wildtypallelen eines Retinagens und die Wiederherstellung des Wildtypproteins unter Verwendung eines Ersatzgens. Es mag jedoch Situationen geben, in denen auf einzelne Allele spezifisch oder teilspezifisch gezielt werden kann (WO 97/32024).

[0070] Bei einem Beispiel, menschlichem Kollagen 1A2, wurde Rz907 verwendet, um auf eine natürlich vorkommende polymorphe Stelle an Aminosäure 187 (GGA(Glycin) → GGT(Glycin)) zu zielen, die sich in einer offenen Schleifenstruktur von den prognostizierten 2D-Konformationen des Transkriptes befindet ([Fig. 8](#), Tabelle 2B). Das Ribozym Rz907 spaltete Transkripte, die die GGT-Sequenz enthielten, aber Transkripte mit GGA waren vor der Spaltung geschützt.

[0071] Transkripte von beiden Allelen von Personen, die für den GGT-Polymorphismus homozygot sind, könnten von Rz907 gespalten werden, wohingegen in dem Fall von Heterozygoten die Spaltung auf einzelne Allele gerichtet werden könnte (insbesondere auf Allele, die schädliche Mutationen enthielten, WO 97/32024). In beiden Situationen könnten Ersatzgene die Sequenz GGA aufweisen und wären daher vor Spaltung durch Rz907 geschützt. Das Vorhandensein vieler derartiger natürlich vorkommender inaktiver Polymorphismen hebt hervor, dass Ersatzgene auf eine ähnliche Art und Weise in Wobble-Positionen modifiziert werden könnten und in den meisten Fällen funktionelles Wildtypprotein produzieren sollten. Es könnten mehrere Modifizierungen in Wobble-Positionen an Ersatzgenen vorgenommen werden, die den Schutz vor Suppressionseffektoren verstärken würden. Zum Beispiel wären in Situationen, in denen Antisense-Nukleinsäuren zur Suppression verwendet würden, Transkripte von Ersatzgenen mit mehreren Modifizierungen an Dritte-Base-Positionen teilweise oder vollständig vor Antisense-Bindung geschützt.

[0072] Alle in den vier Beispielen bereitgestellten Transkripte von cDNA-Klonen wurden in vitro auf eine sequenzspezifische Weise an Ribozym-Spaltungsstellen gespalten. Zusätzlich dazu kommt eine Base der Ribozym-Spaltungsstelle in einer Wobble-Position vor und kann außerdem geändert werden, um die Spaltungsstelle zu eliminieren. Ribozym-Spaltungsstellen in den gegebenen Beispielen wurden durch das Wechseln von

Nukleotidsequenzen, so dass die Konsensussequenz für Ribozym-Spaltungsstellen unterbrochen wurde, zerstört. Möglicherweise könnte jedoch in einigen Fällen die Spaltungsstelle zerstört werden, indem die Nukleotidsequenz auf eine Weise geändert wird, die die 2D-Struktur der RNA ändert und die offene Schleifenstruktur, auf die das Ribozym zielt, zerstört. cDNAs oder DNA-Fragmente mit geänderten Sequenzen in den Regionen, auf die die Ribozyme zielen, wurden erzeugt. RNAs, die von diesen cDNAs oder DNA-Fragmenten exprimiert wurden, waren aufgrund des Fehlens der Ribozym-Spaltungsstelle für jedes der getesteten Ribozyme gänzlich vor Spaltung geschützt. Von besonderem Interesse ist die Tatsache, dass eine Einzelnukleotidänderung eine Ribozym-Zielstelle vernichten kann, wodurch RNA-Spaltung verhindert wird. Obwohl bei der Demonstration der Erfindung Ribozyme verwendet worden sind, könnten andere Suppressionseffektoren verwendet werden, um eine Geninaktivierung zu erreichen. Wieder könnten Ersatzgene mit geänderten Sequenzen (an Dritte-Base-Wobble-Positionen) erzeugt werden, so dass sie teilweise oder vollständig vor Geninaktivierung geschützt sind und das Wildtyp-Genprodukt (oder vorteilhafte Genprodukt) bereitstellen.

[0073] Wie zuvor im Text hervorgehoben, kann bei der Verwendung der Erfindung dasselbe Verfahren der Suppression (Zielen auf kodierende Sequenzen eines Gens) und wenn nötig des Gensatzes (Verwendung eines Ersatzgens mit einer in Dritte-Base-Positionen modifizierten Sequenz, um die Genexpression wiederherzustellen) als therapeutischer Ansatz für viele unterschiedliche Mutationen innerhalb eines gegebenen Gens verwendet werden. Angesichts der fortlaufenden Klärung der molekularen Pathogenese von dominanten und polygenen Krankheiten nimmt die Anzahl an Zielen für diese Erfindung schnell zu.

LITERATURNACHWEIS

- Carter G und Lemoine NR. (1993) *Cancer Res* 67: 869-876.
 Cazenave et al. (1989) *Nuc Acid Res* 17: 4255-4273.
 D'Alessio M et al. (1991) *Am J Hum Genet* 49: 400-406.
 Dosaka-Akita H et al. (1995) *Cancer Res* 55: 1559-1564.
 Dryja TP et al. (1990) *Nature* 343: 364-366.
 Duval-Valentin et al. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 504-508.
 Ellis und Rodgers (1993) *Nuc Acid Res* 21: 5171-5178.
 Farrar GJ et al. (1991) *Nature* 354: 478-480.
 Farrar GJ et al. (1991) *Genomics* 14: 805-807.
 Farrar GJ et al. (1995) *Invest Ophthalmol Vis Sci (ARVO)* 36: (4).
 Feng M, Cabrera G, Deshane J, Scanlon K und Curiel DT. (1995) *Can Res* 55: 2024-2028.
 Filie et al. (1993) *Hum Mut* 2: 380-388.
 Gaughan DJ, Steel DM, Whitehead SA. (1995) *FERS Letters* 374: 241-245.
 Hanvey JC et al. (1992) *Science* 258: 1481-1485.
 Hardenbol P und Van Dyke MW. (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2811-2816.
 Herschlag D, Khosla M, Tsuchihashi Z und Karpel RL. (1994) *EMBO* 13: (12) 2913-2924.
 Herskowitz et al. (1987) *Nature* 329: 219-222.
 Humphries P, Kenna PF und Farrar GJ. (1992) *Science* 256: 804-808.
 Humphries M et al. (1997) *Nat Genet* 15: 216-219.
 Jankowsky E und Schwenzer B. (1996) *Nuc Acid Res* 24: (3) 423-429.
 Jones JT, Lee S-W und Sullenger BA. (1996) *Nature Medicine* 2: 643-648.
 Jordan SA et al. (1993) *Nature Genetics* 4: 54-58.
 Quattrone A, Fibbi G, Anichini E, Pucci M et al. (1995) *Can Res* 55: 90-95.
 Kajiwara et al. (1991) *Nature* 354: 480-483.
 Knudsen H und Nielsen PE. (1996) *Nuc Acid Res* 24: (3) 494-500.
 Lange W et al. (1993) *Leukemia* 7: 1786-1794.
 Mansergh F et al. (1995) *J Med Genet* 32: 855-858.
 Mashhour B et al. (1994) *Gene Therapy* 1: 122-126.
 McKay RA, Cummins LL, Graham MJ, Lesnik EA et al. (1996) *Nuc Acid Res* 24: (3) 411-417.
 McWilliam P et al. (1989) *Genomics* 5: 612-619.
 Ohkawa J, Yuyama N, Takebe Y, Nishikawa S und Taira K. (1993) *Proc Natl Acad Sci* 90: 11302-11306.
 Ohta Y, Kijima H, Ohkawa T, Kashani-Sabet M und Scanlon KJ. (1996) *Nuc Acid Res* 24: (5) 938-942.
 Ott J et al. (1989) *Proc Natl Acad Sci* 87: 701-704.
 Oyama T et al. (1995) *Pathol Int* 45: 45-50.
 Phillips CL et al. (1990) *J Clin Invest* 86: 1723-1728.
 Postel et al. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8227-8231.
 Porumb H, Gousset, Letellier R, Salle V, et al. (1996) *Can Res* 56: 515-522.
 Rimsky et al. (1989) *Nature* 341: 453-456.

Sullenger BA und Cech TR. (1994) Nature 371: 619-622.
 Sun JS et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86: 9198-9202.
 Taylor RW et al. (1997) Nat Genetics 15: 212-215.
 Trauger JW, Baird EE und Dervan PB. (1996) Nature 382: 559-561.
 Valera A et al. (1994) J Biol Chem 269: 28543-28546.
 Van Soest S et al. (1994) Genomics 22: 499-504.
 Vasan NS et al. (1991) Amer J Hum Genet 48: 305-317.
 Wei Z, Tung C-H, Zhu T, Dickerhof WA et al. (1996) Nuc Acid Res 24: (4) 655-661.
 Westerhausen AI, Constantinou CD und Prockop DJ. (1990) Nuc Acid Res 18: 4968.
 Willing MC et al. (1993) Am J Hum Genet 45: 223-227.
 Zhuang J et al. (1996) Hum Mut 7: 89-99.

Patentansprüche

1. Ein In-vitro-Verfahren zum Supprimieren oder Teilsupprimieren eines endogenen Gens, das mit einer Krankheitsmutation assoziiert ist, und Einführen eines Ersatzgens, wobei das Verfahren die folgenden Schritte beinhaltet:

a) Bereitstellen von (einem) Suppressionseffektor(en), der/die die Expression eines endogenen Gens oder (ein) Gentranskript(e), das/die supprimiert werden soll(en), inaktivieren oder reduzieren können, wobei der/die Suppressionseffektor(en) an einer Stelle wirken, die von der Krankheitsmutation unabhängig ist, wobei die Stelle in der kodierenden Sequenz liegt und wobei der/die Suppressionseffektor(en) sowohl an Krankheitsallelen als auch an normalen Allelen wirken können; und b) Bereitstellen von (einer) Ersatznukleinsäure(n), die ein Ersatzgen bereitstellen, wobei die Ersatznukleinsäure(n) an einer oder mehreren Wobble-Stellen geändert worden sind, um die Effizienz einer Suppression mittels der Suppressionseffektoren zu verhindern oder zu reduzieren, so dass das Ersatzgen exprimiert werden kann.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei der Suppressionseffektor ein Ribozym ist und die Ersatznukleinsäure an einer oder mehreren Wobble-Stellen geändert wird, so dass die Ersatznukleinsäure keine Ribozym-Spaltungsstelle enthält.

3. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Ersatznukleinsäure(n) menschliches Rhodopsin, Mausrhodopsin oder menschliches Peripherin-Protein kodieren.

4. Die Verwendung von:

a. (einem) Suppressionseffektor(en), wobei der/die Suppressionseffektor(en) die Expression eines endogenen Zielgens, das mit einer Krankheitsmutation assoziiert ist, oder (ein) Gentranskript(e), das/die supprimiert werden soll(en), supprimieren können, wobei der/die Suppressionseffektor(en) an einer Stelle, die von der Krankheitsmutation unabhängig ist, wirken und sowohl an Krankheitsallelen als auch an normalen Allelen wirken können, wobei die Stelle in der kodierenden Sequenz liegt, und
 b. Ersatznukleinsäuren, die ein Ersatzgen bereitstellen, wobei die Ersatznukleinsäuren an einer oder mehreren Wobble-Stellen geändert worden sind, um die Effizienz einer Suppression mittels der Suppressionseffektoren zu verhindern oder zu reduzieren, so dass das Ersatzgen exprimiert werden kann,
 bei der Zubereitung eines Medikaments zur Behandlung einer autosomal-dominanten Krankheit, die durch das endogene Gen verursacht wird, wobei die Krankheit durch unterschiedliche Mutationen in demselben Gen verursacht wird.

5. Verwendung gemäß Anspruch 4, wobei die Krankheit eine Retinopathie ist.

6. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 4 oder 5, wobei die Ersatznukleinsäure(n) menschliches Rhodopsin, Mausrhodopsin oder menschliches Peripherin-Protein kodieren.

7. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 4 bis 6, wobei der Suppressionseffektor ein Ribozym ist und das endogene Gen an einer oder mehreren Wobble-Stellen geändert wird, so dass das Ersatzgen keine Ribozym-Spaltungsstelle enthält.

8. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 4 bis 7, wobei Suppressionseffektoren und/oder Ersatznukleinsäuren in einem oder mehreren Vektor(en) bereitgestellt werden.

9. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 4 bis 7, wobei die Suppressionseffektoren und/oder Ersatznukleinsäuren nicht in einem Vektor bereitgestellt werden.

10. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 4 bis 8, wobei die Suppressionseffektoren und/oder Ersatznukleinsäuren mit Lipiden oder anderen Derivaten kombiniert werden, die die Genzuführung unterstützen.

11. Eine Ausstattung zur Verwendung bei der Behandlung einer autosomal-dominanten oder polygenen Krankheit, die durch (eine) Mutation(en) in einem endogenen Zielgen verursacht wird, wobei die Ausstattung Folgendes beinhaltet:

(i) mindestens einen Suppressionseffektor, der die Expression des endogenen Gens supprimieren kann, wobei der Suppressionseffektor an einer Stelle wirkt, die von der Krankheitsmutation unabhängig ist, wobei die Stelle in der kodierenden Sequenz liegt und wobei der Suppressionseffektor sowohl an Krankheitsallelen als auch an normalen Allelen wirken kann; und

(ii) Ersatznukleinsäuren, wobei die Ersatznukleinsäuren ein Ersatzgen bereitstellen, wobei die Ersatznukleinsäuren an einer oder mehreren Wobble-Stellen geändert worden sind, um die Effizienz einer Suppression mittels der Suppressionseffektoren zu verhindern oder zu reduzieren, so dass das Ersatzgen exprimiert werden kann.

12. Ausstattung gemäß Anspruch 11, wobei die Krankheit eine Retinopathie ist.

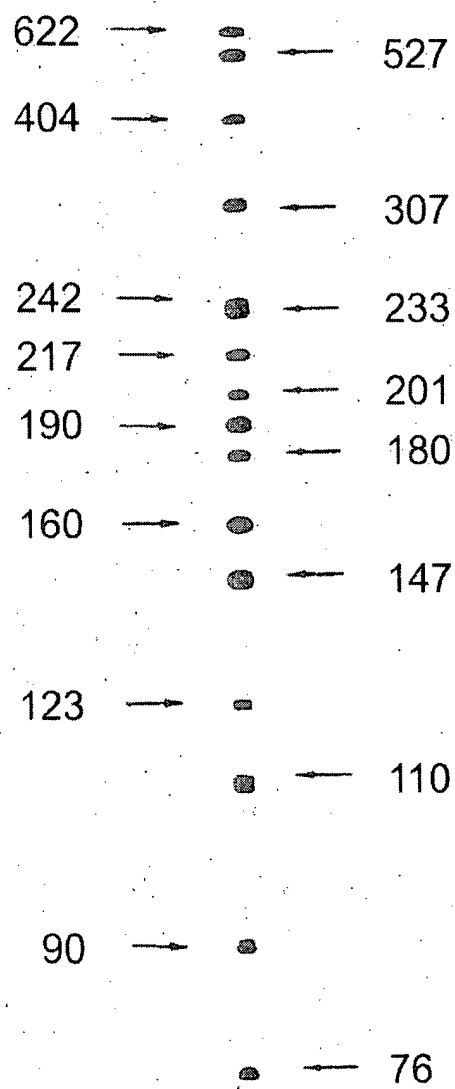
13. Ausstattung gemäß einem der Ansprüche 11 bis 12, wobei die Ersatznukleinsäure(n) menschliches Rhodopsin, Mausehodopsin oder menschliches Peripherin-Protein kodieren.

14. Ausstattung gemäß einem der Ansprüche 11 bis 13, wobei der Suppressionseffektor ein Ribozym ist und das endogene Gen an einer oder mehreren Wobble-Stellen geändert wird, so dass das Ersatzgen keine Ribozym-Spaltungsstelle enthält.

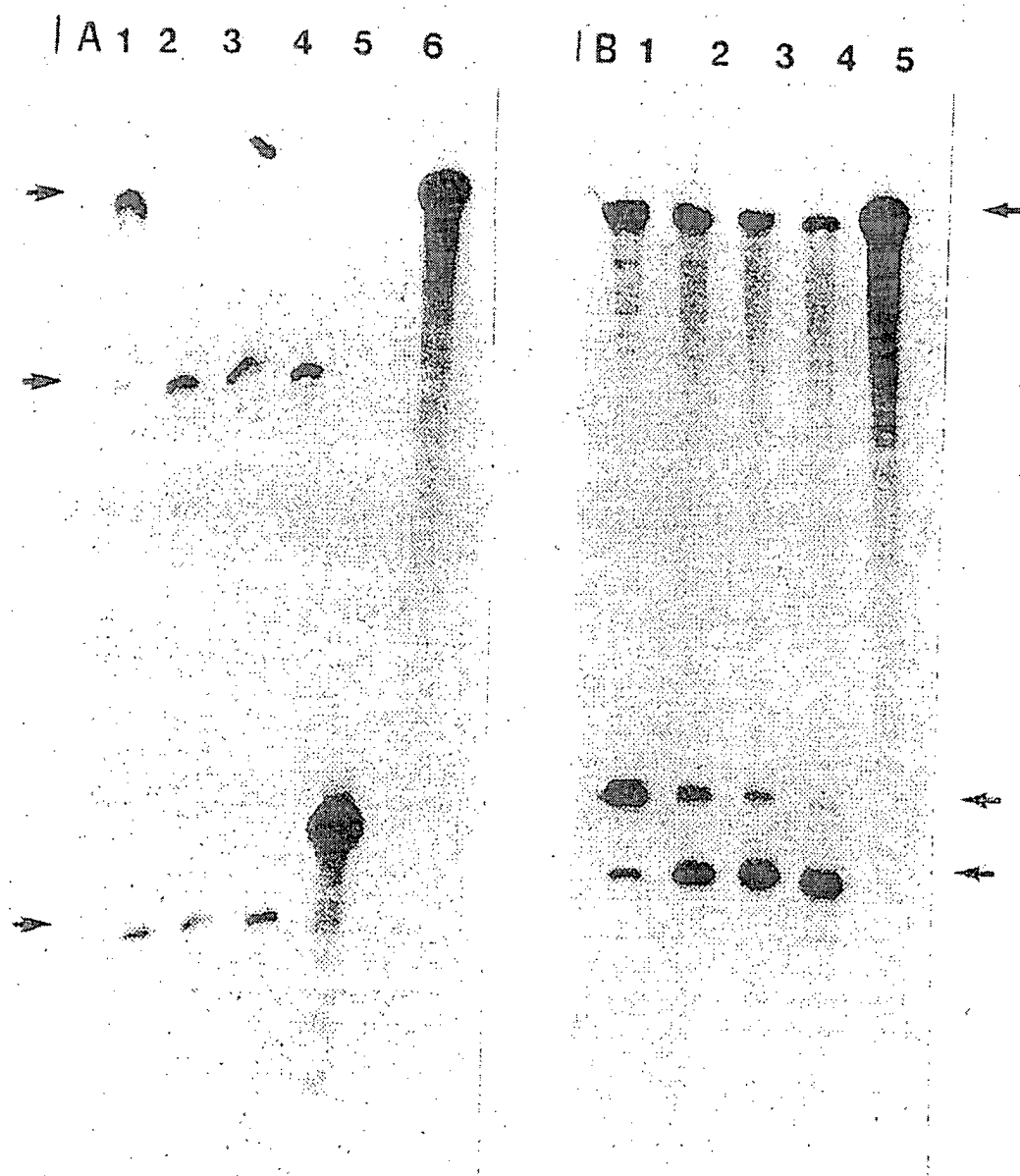
Es folgen 30 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Diagramm 1

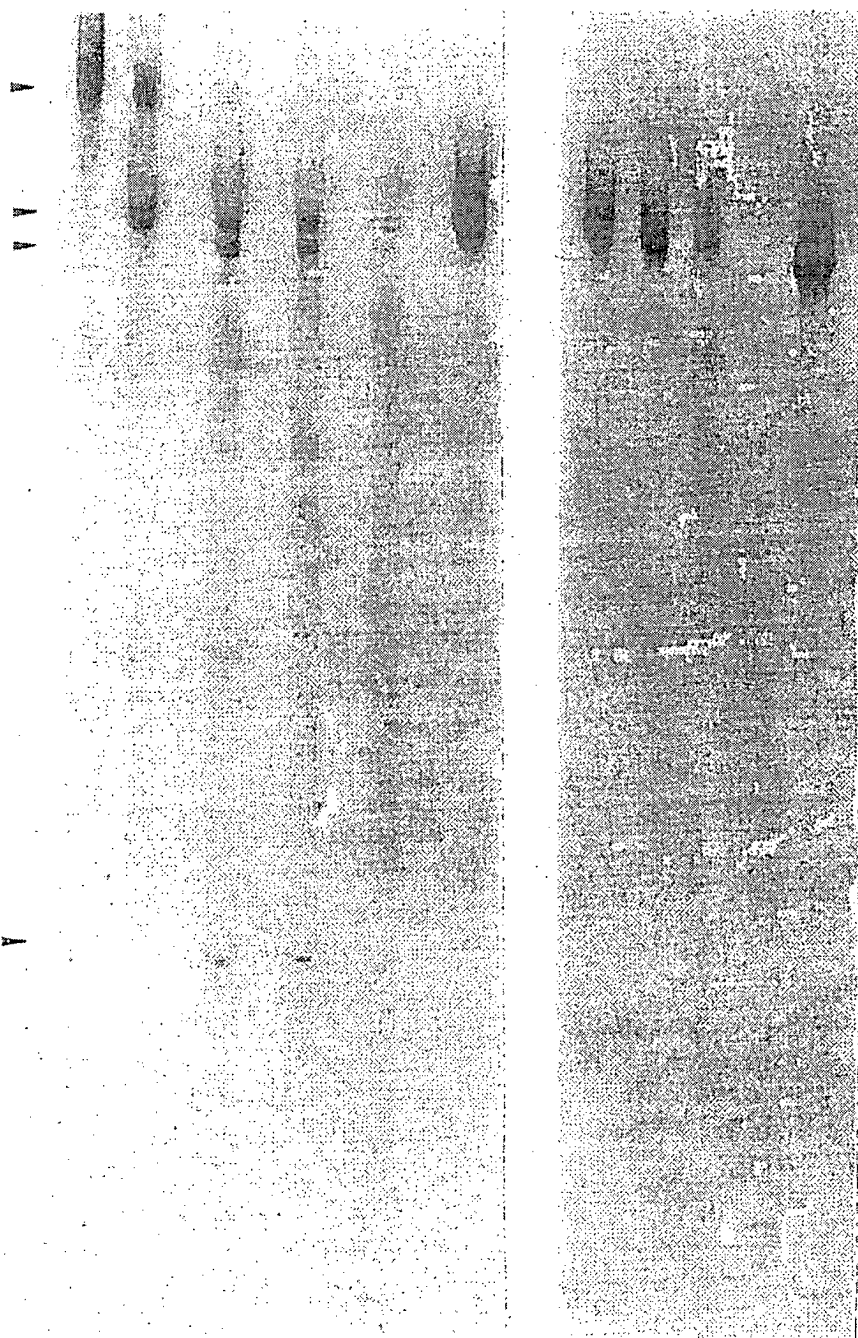


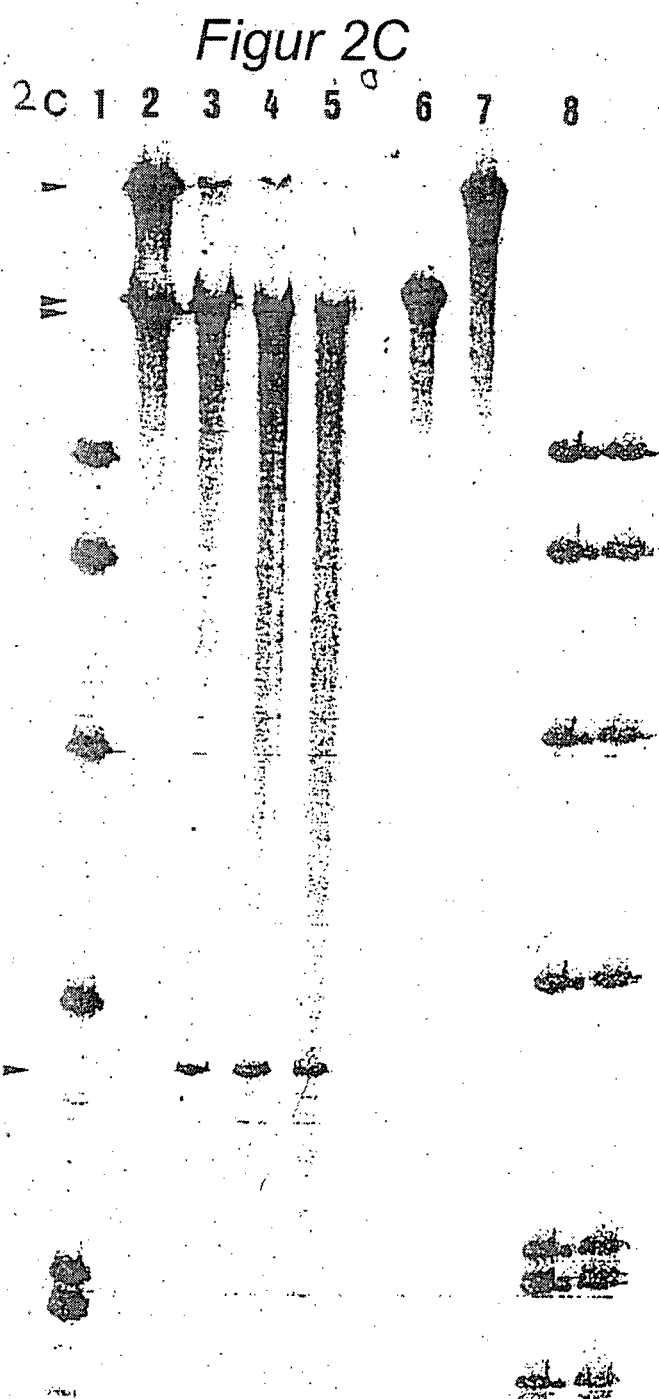
Figur 1 A + B



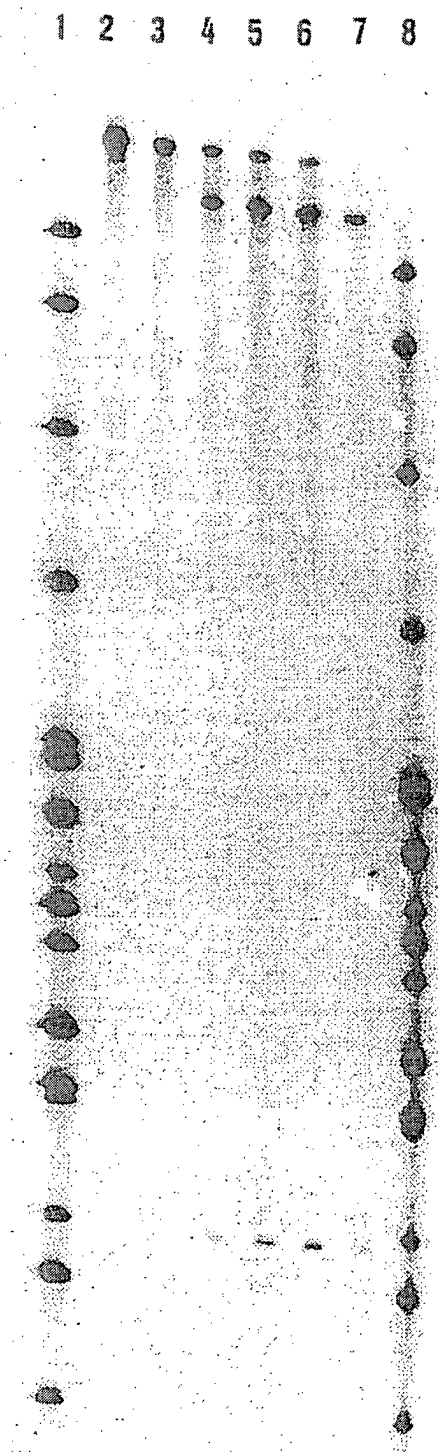
Figur 2 A + B

2 A 1 2 3 4 5 6 2B1 2 3 4 5





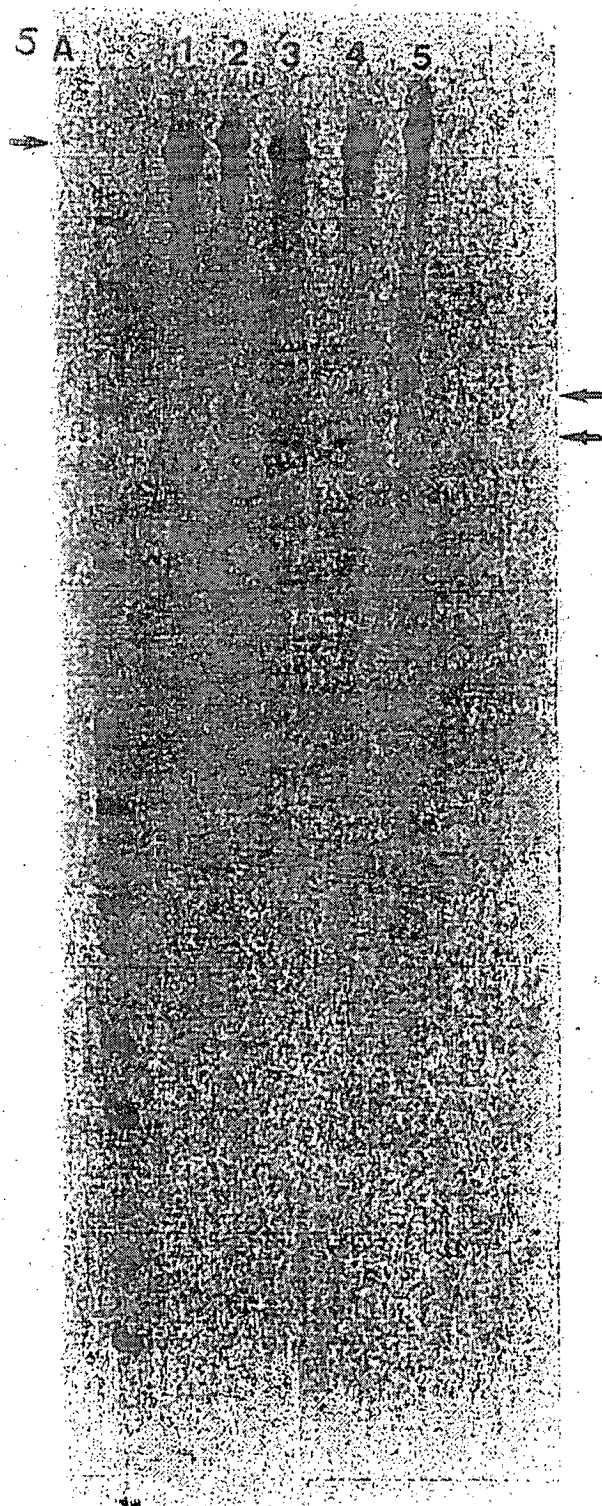
Figur 3



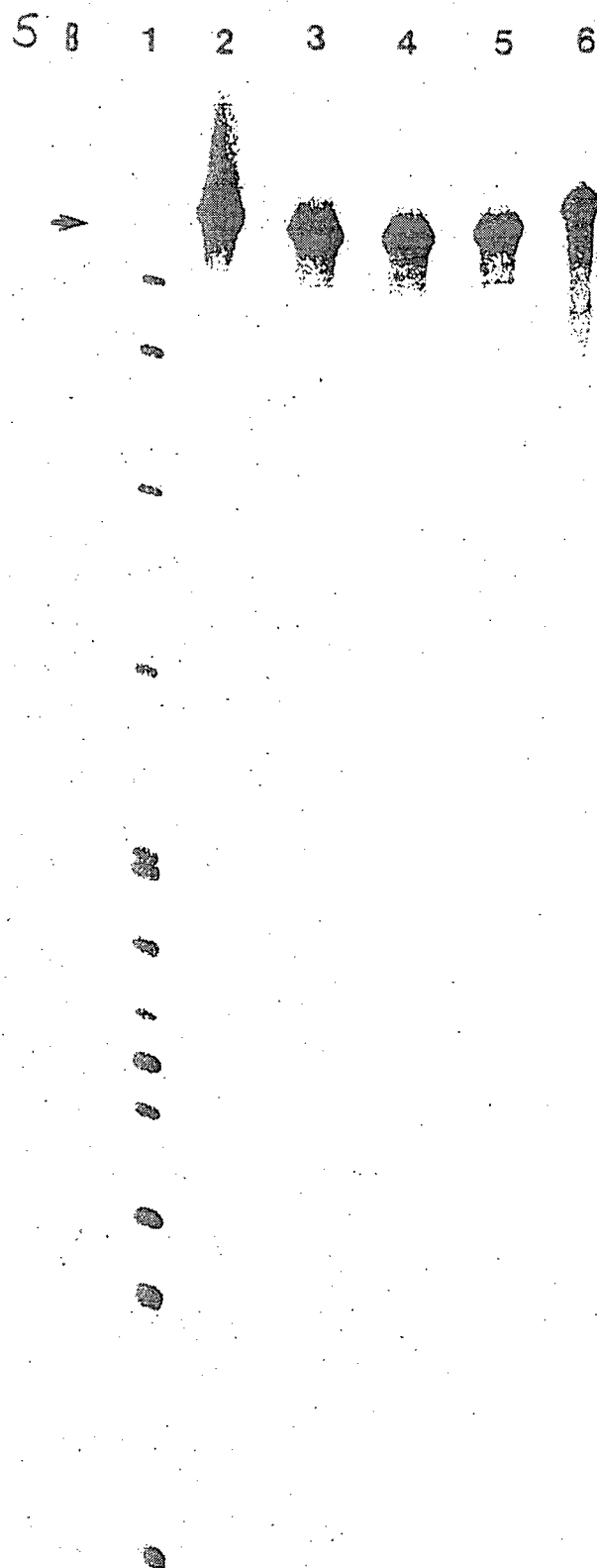
Figur 4
1 2 3 4 5 6 7 8



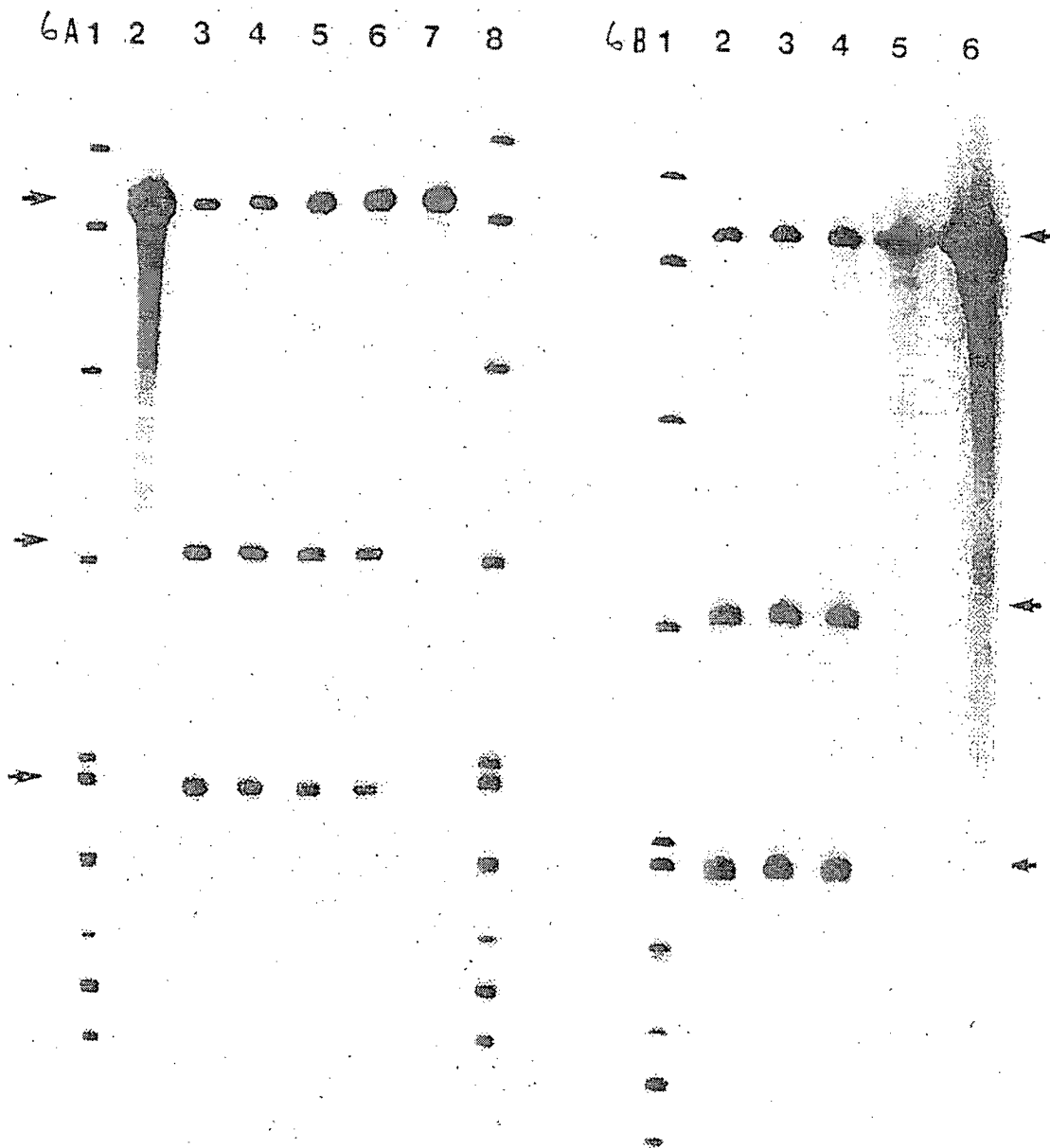
Figur 5A



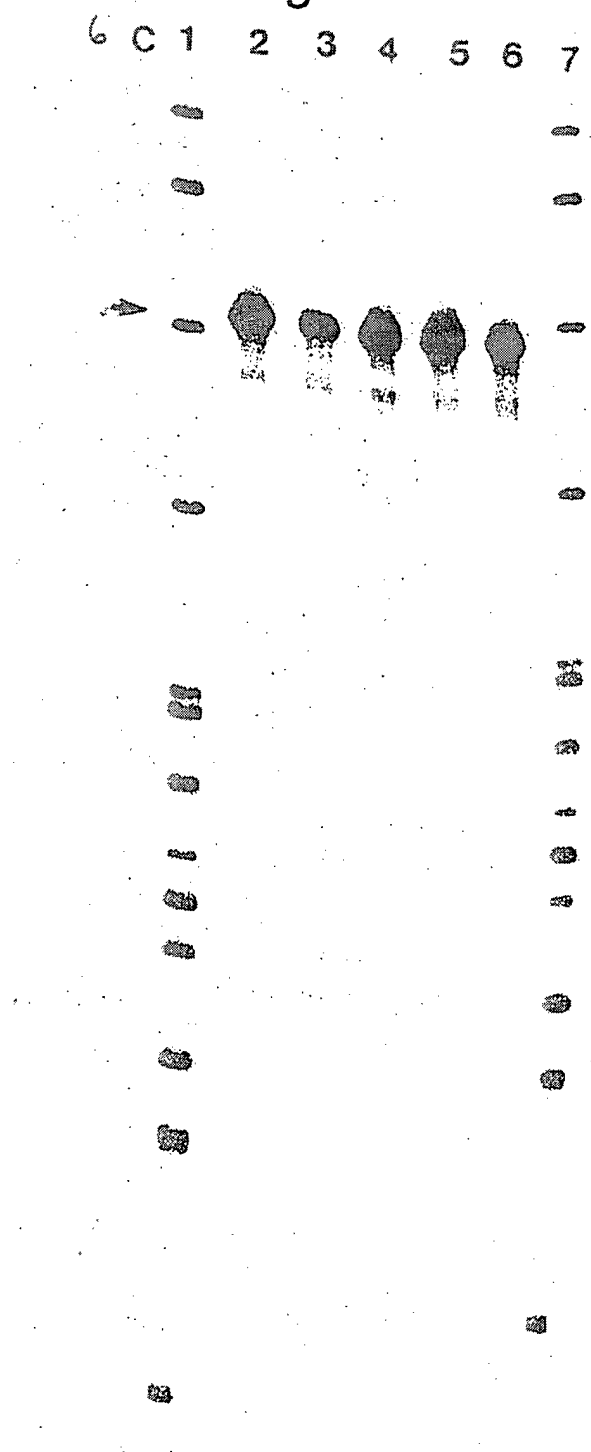
Figur 5B



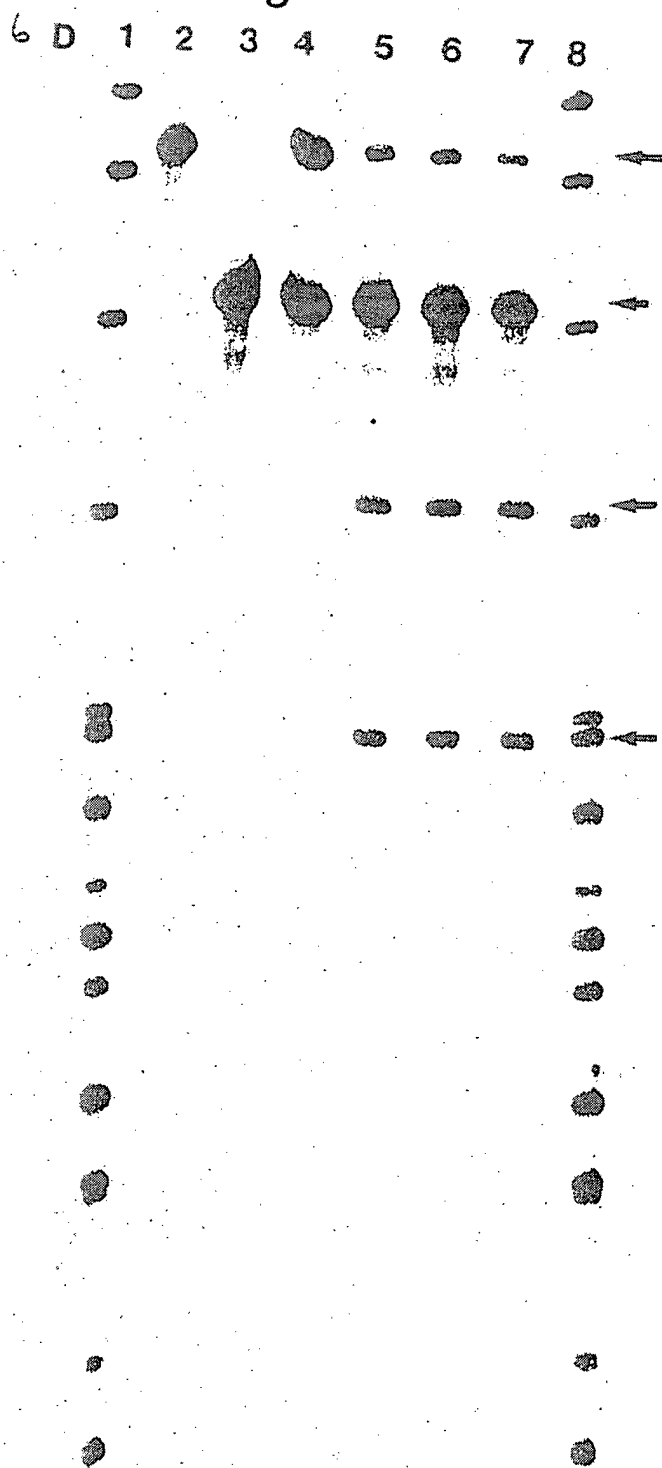
Figur 6A + 6B



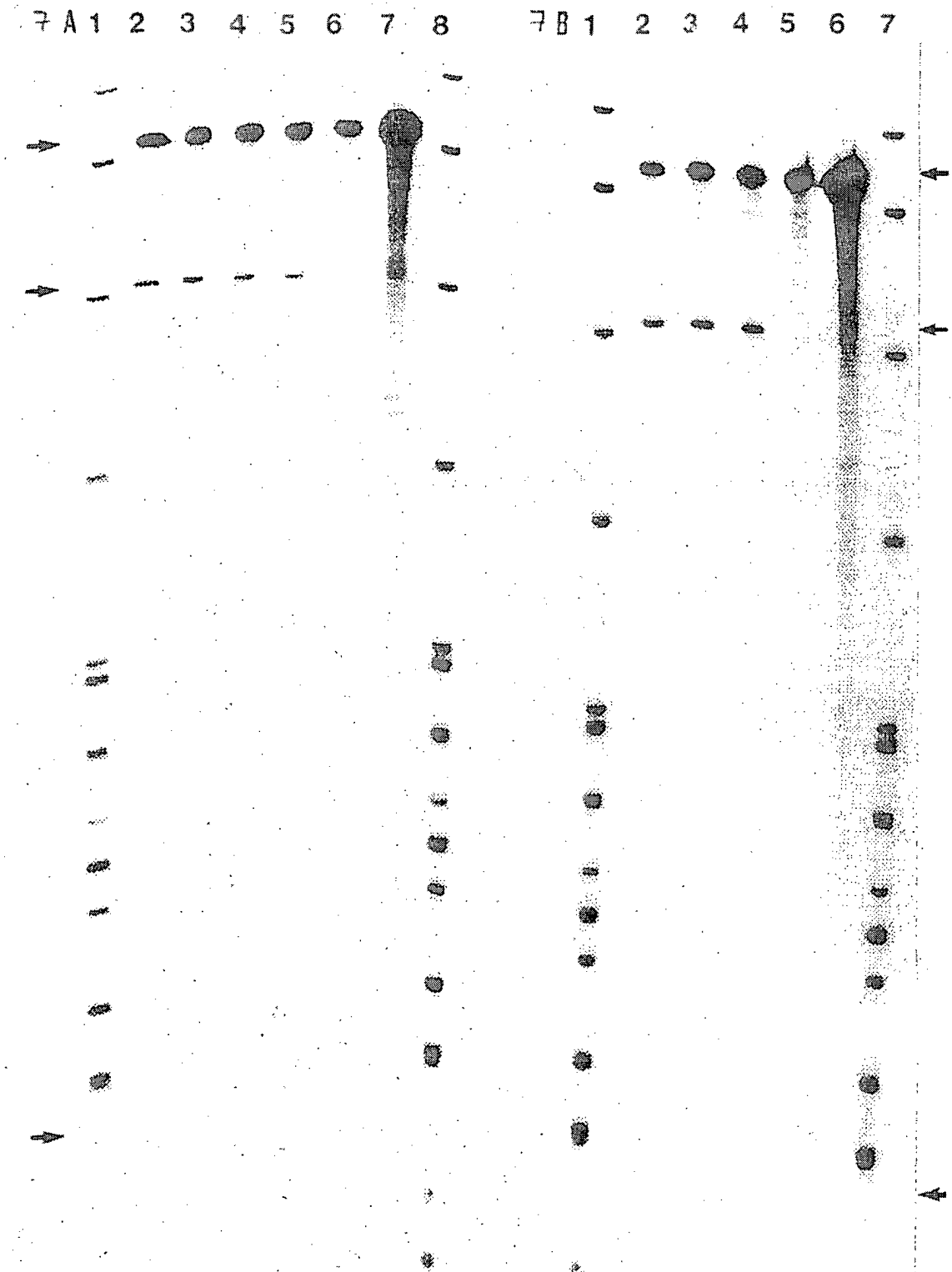
Figur 6C



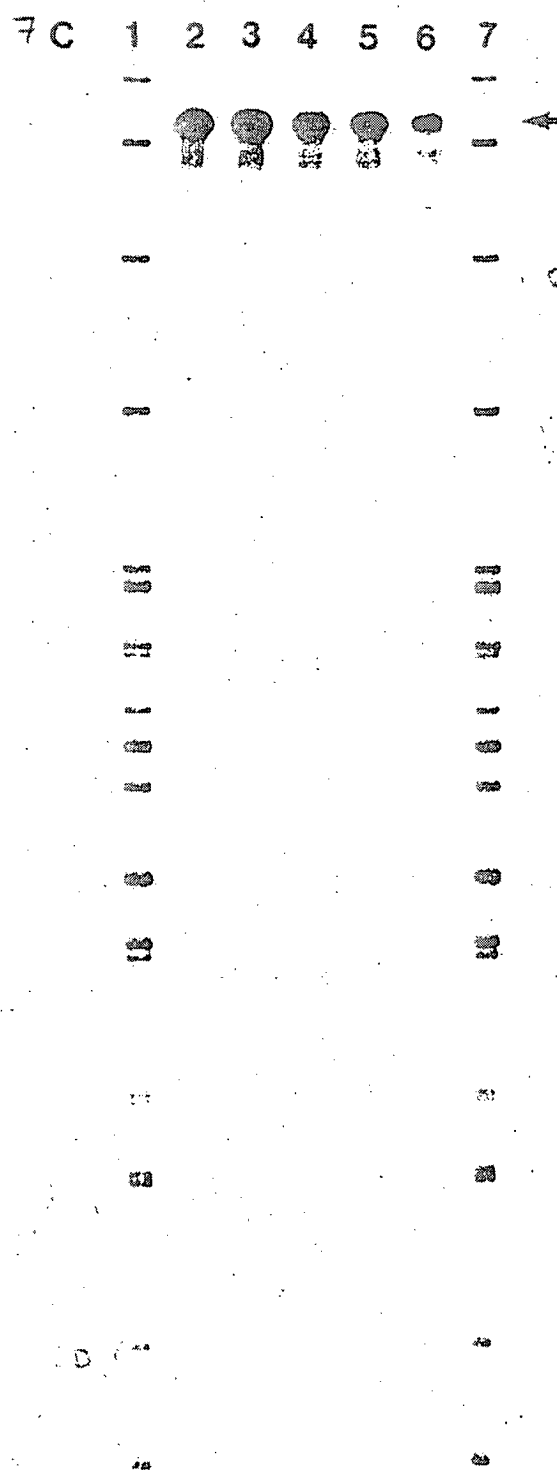
Figur 6D



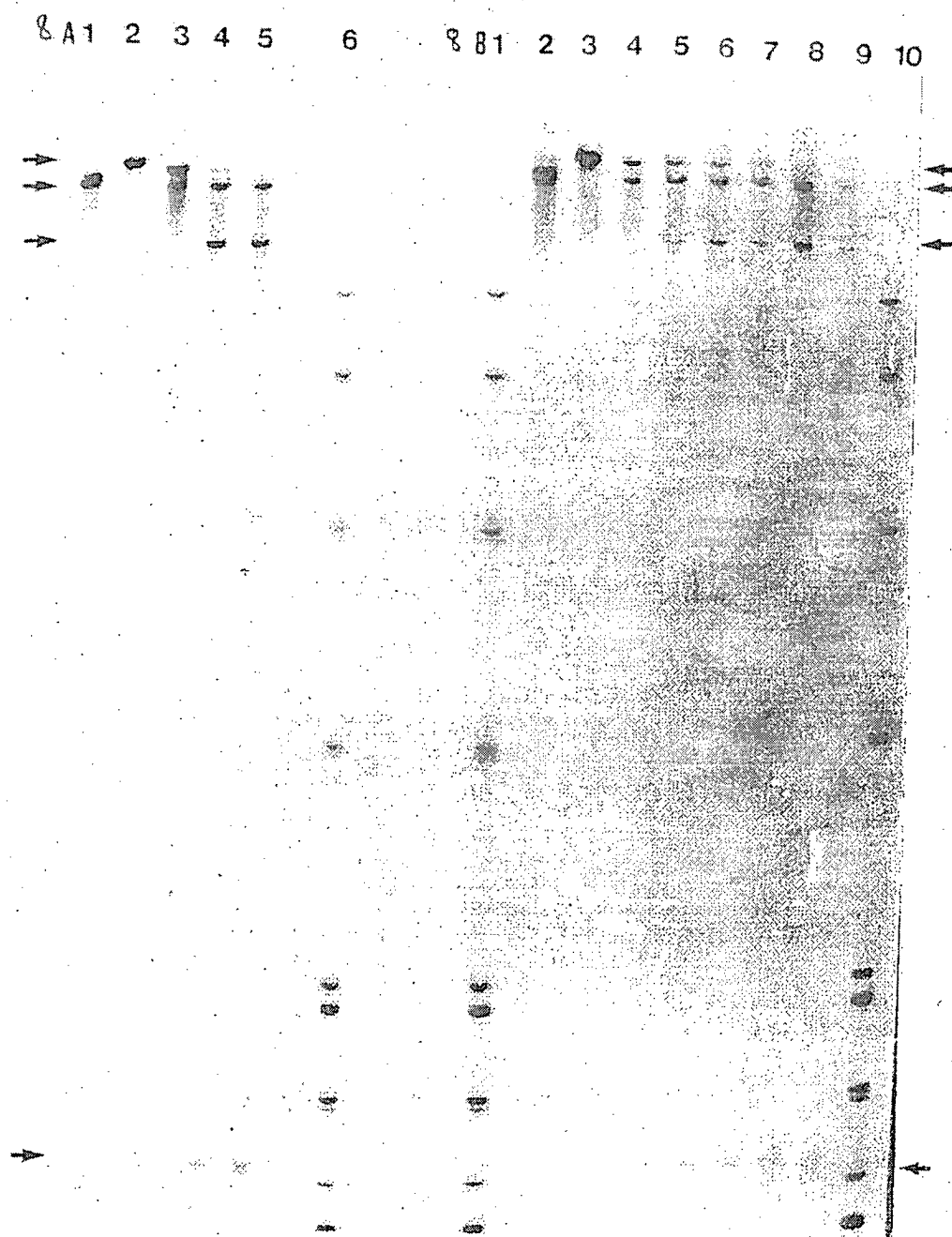
Figur 7A + B

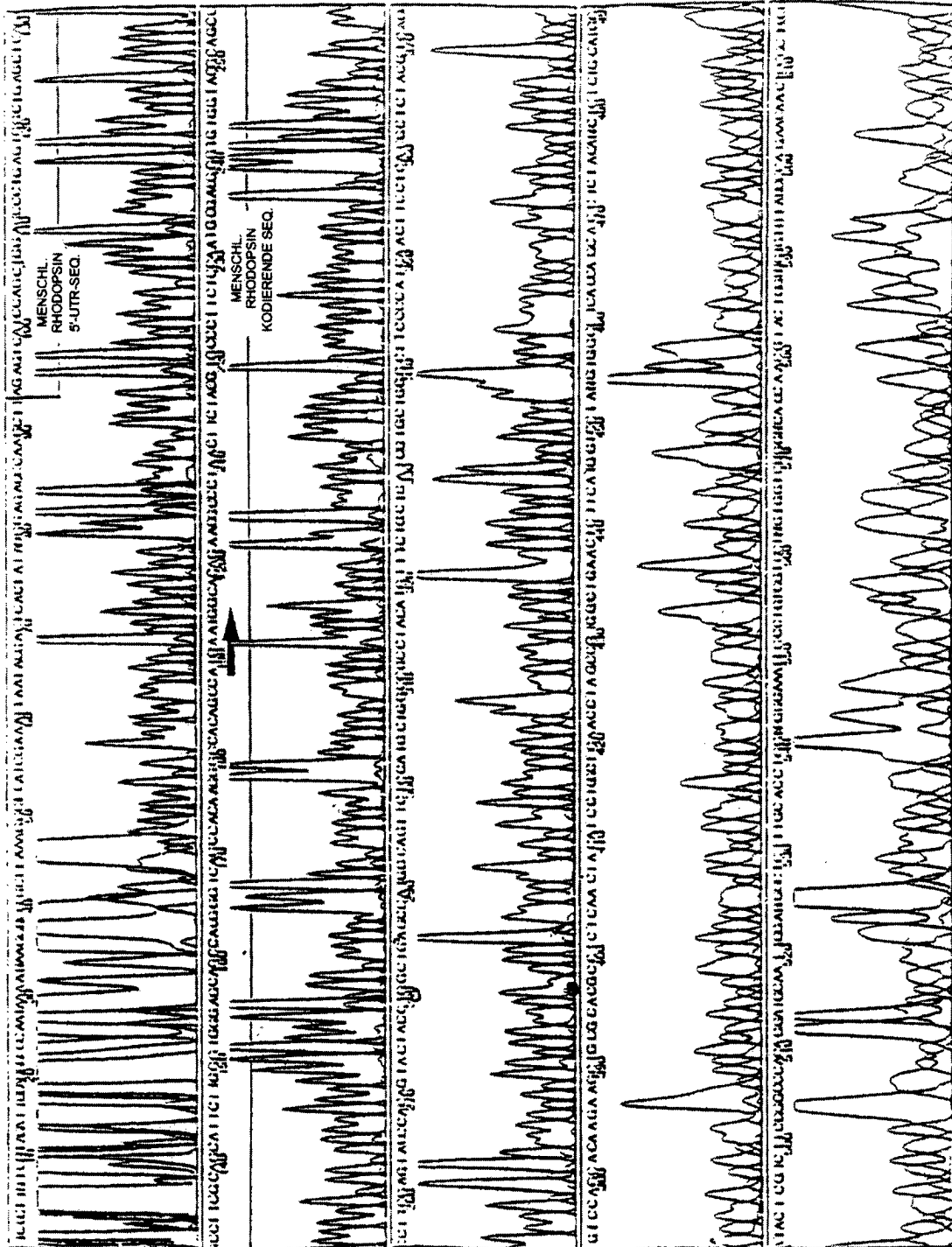


Figur 7C

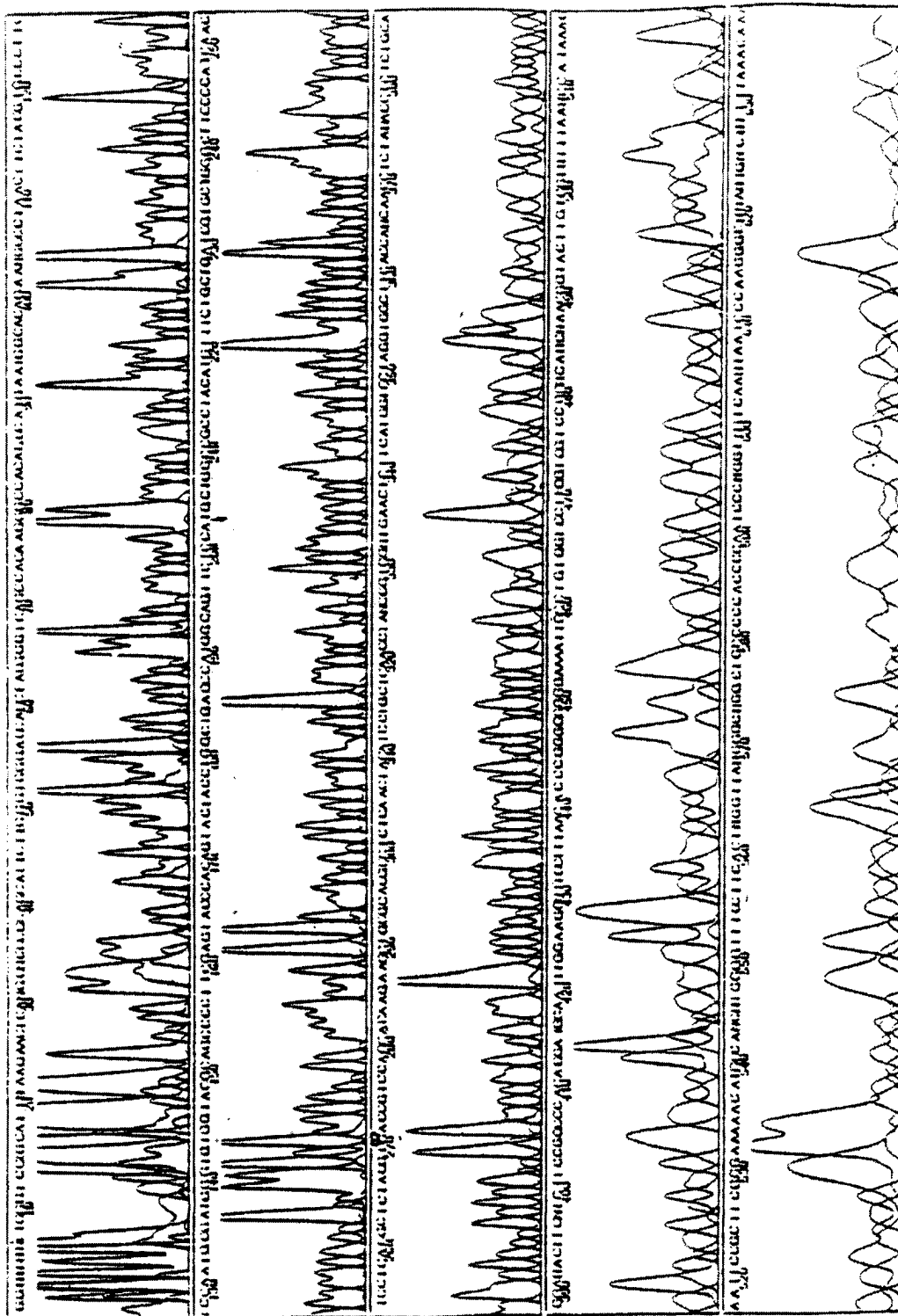


Figur 8A + B

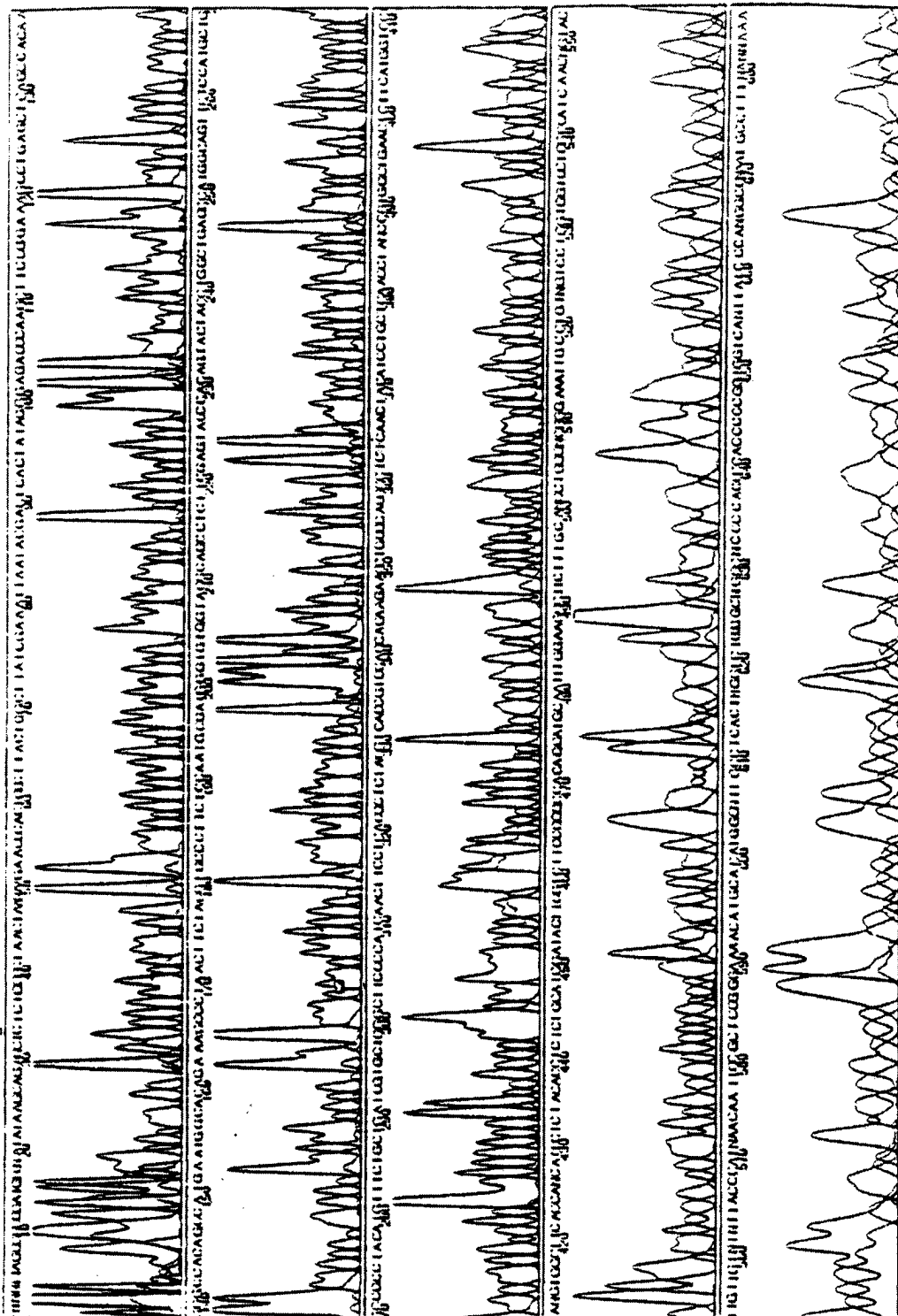




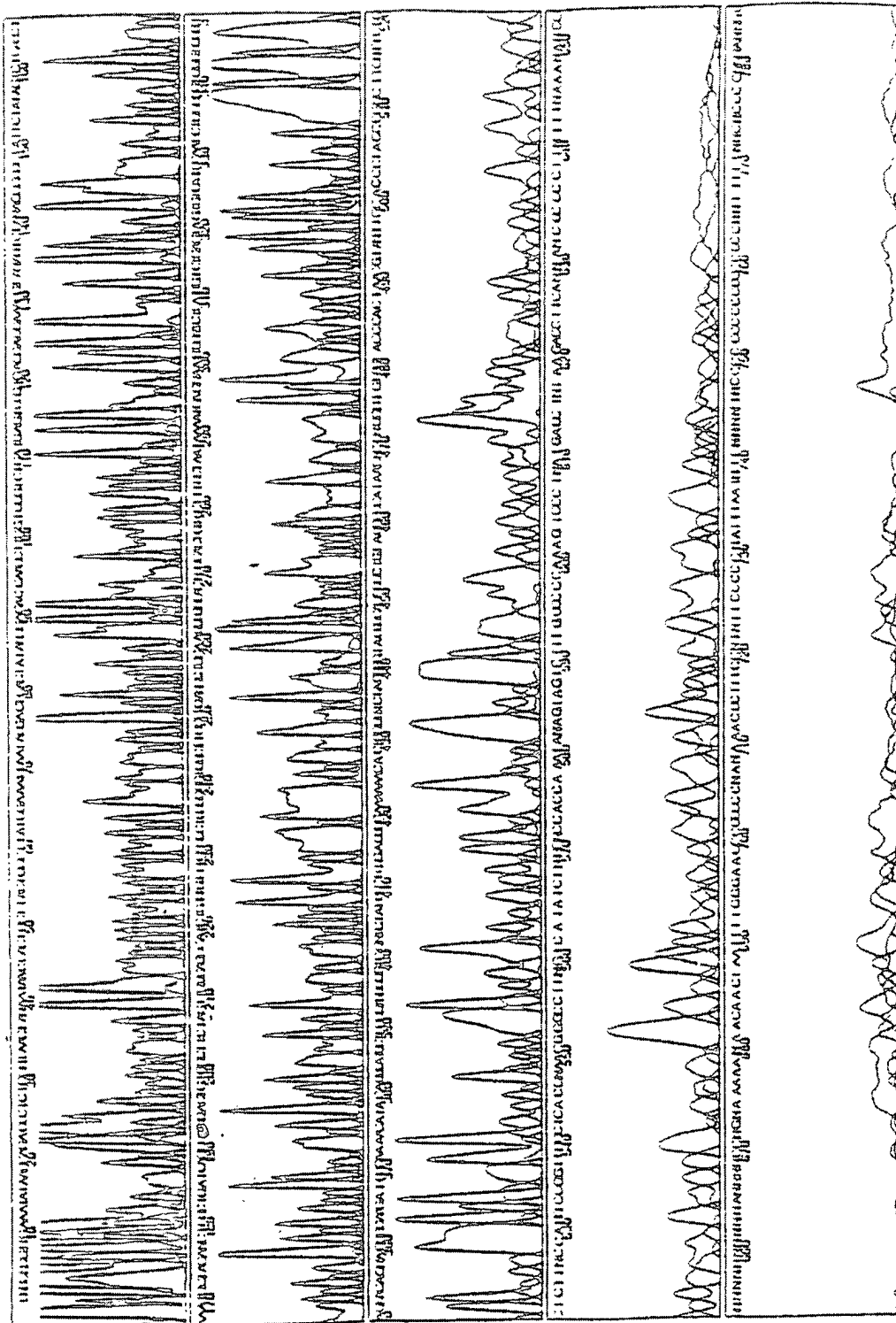
Seq. 2



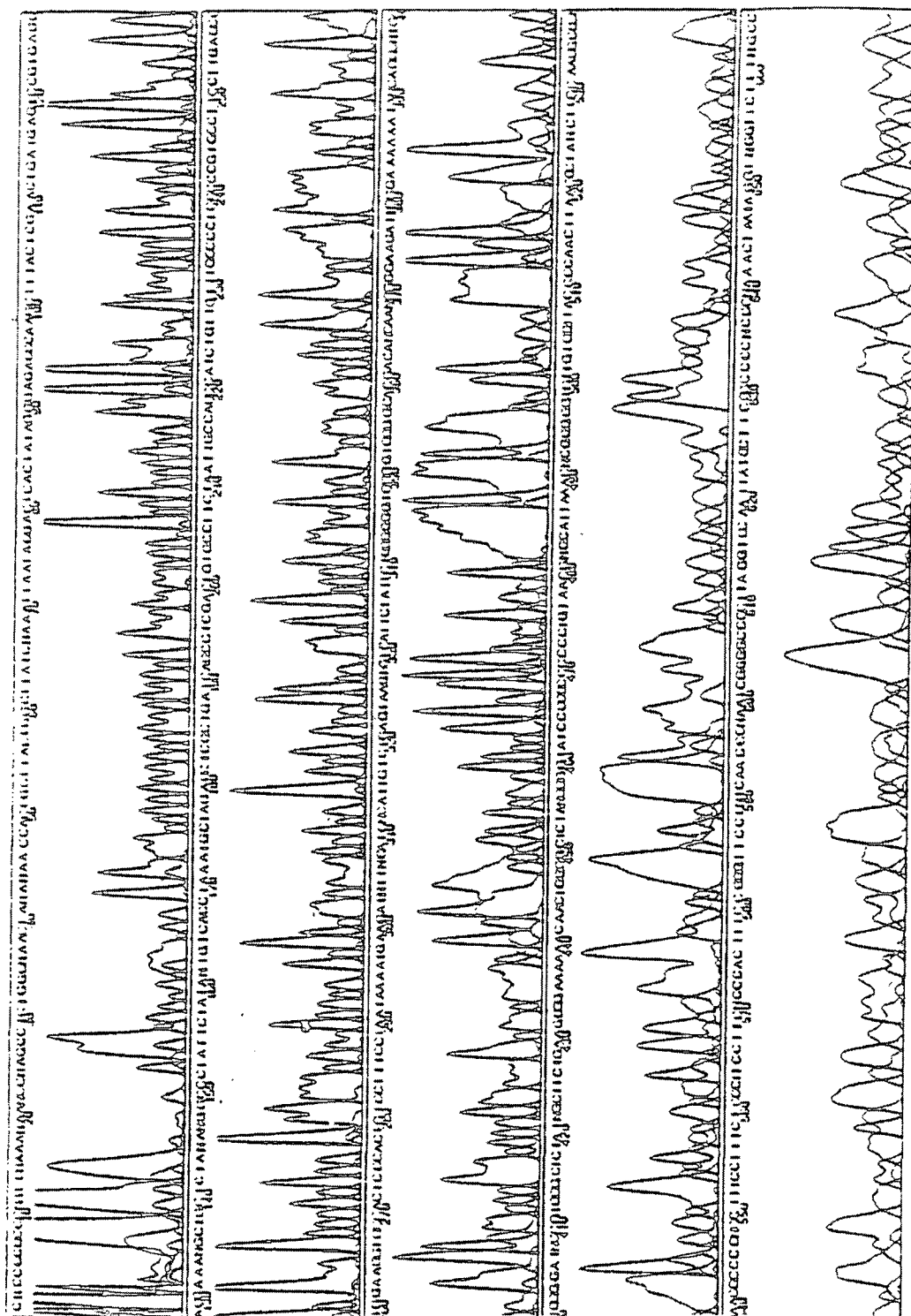
Seq. 3



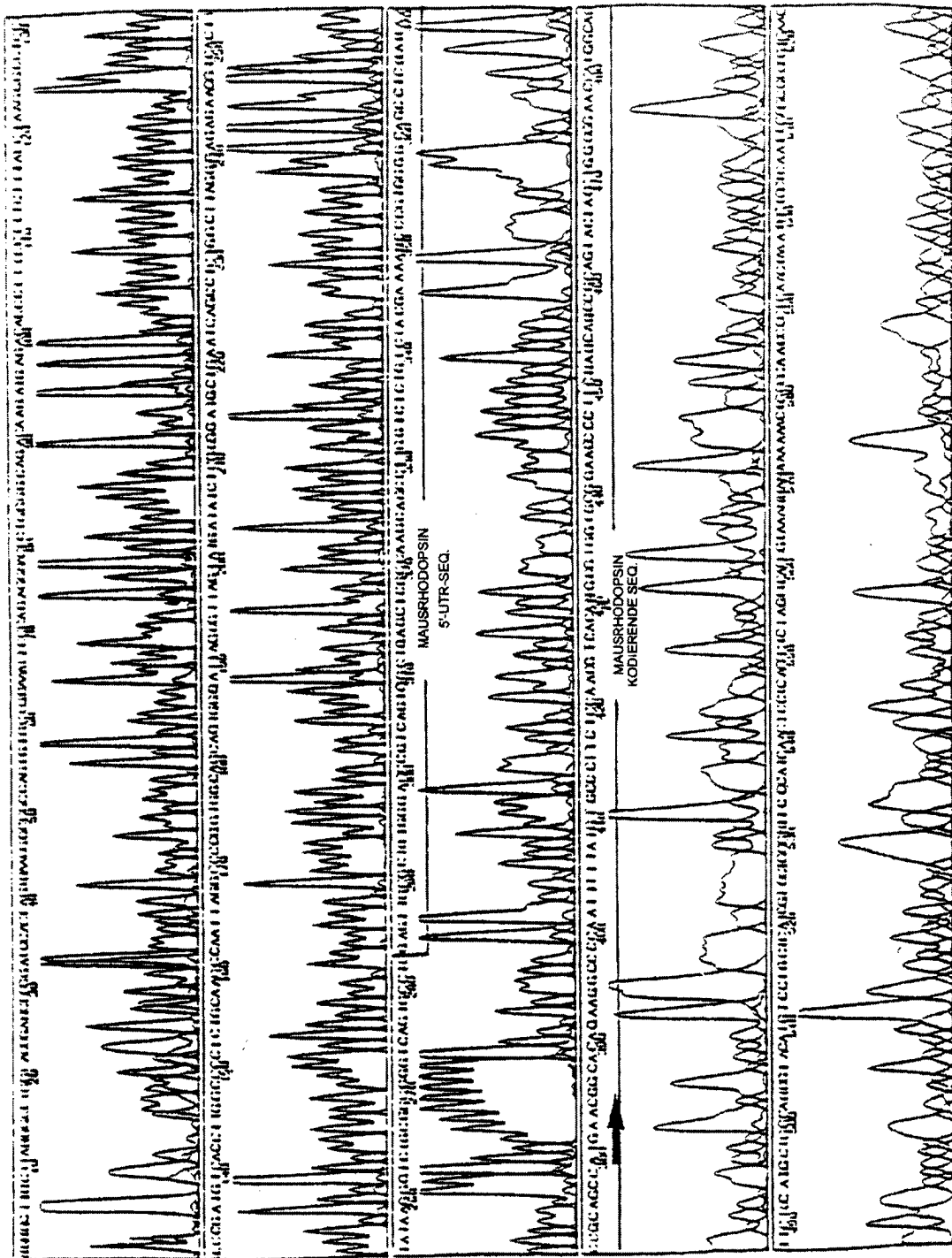
Seq. 4



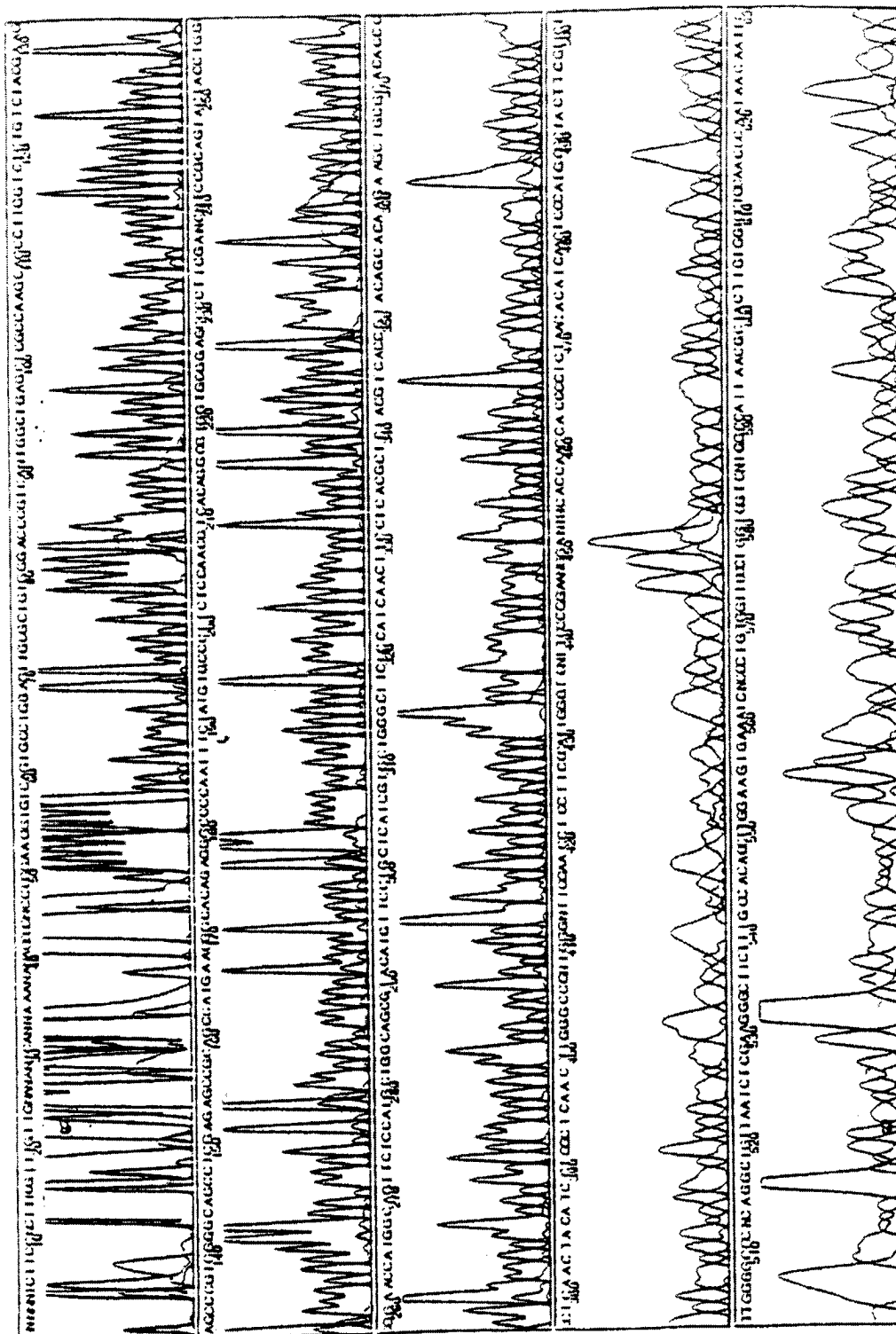
Seq. 5



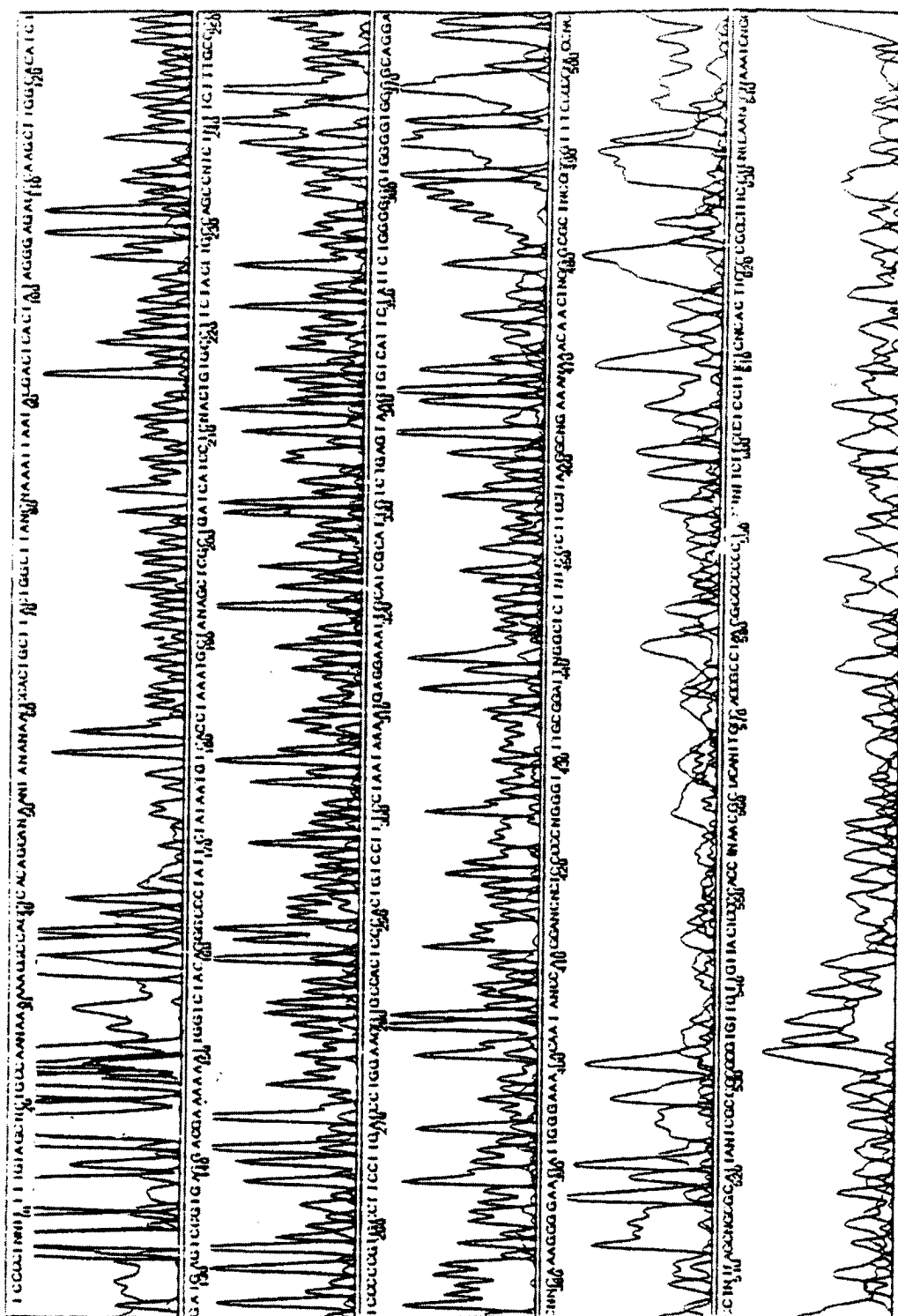
Seq. 6



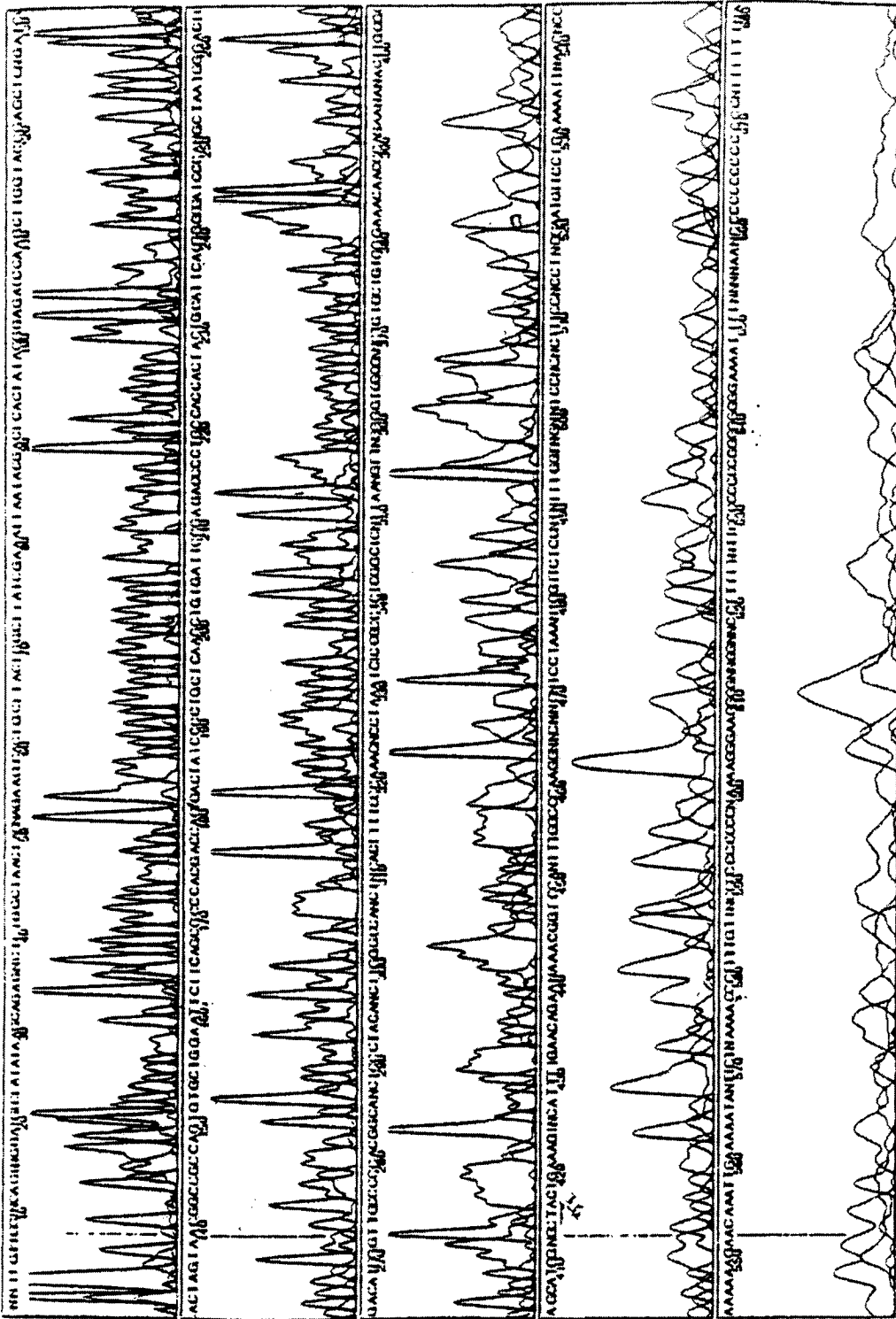
Seq. 7



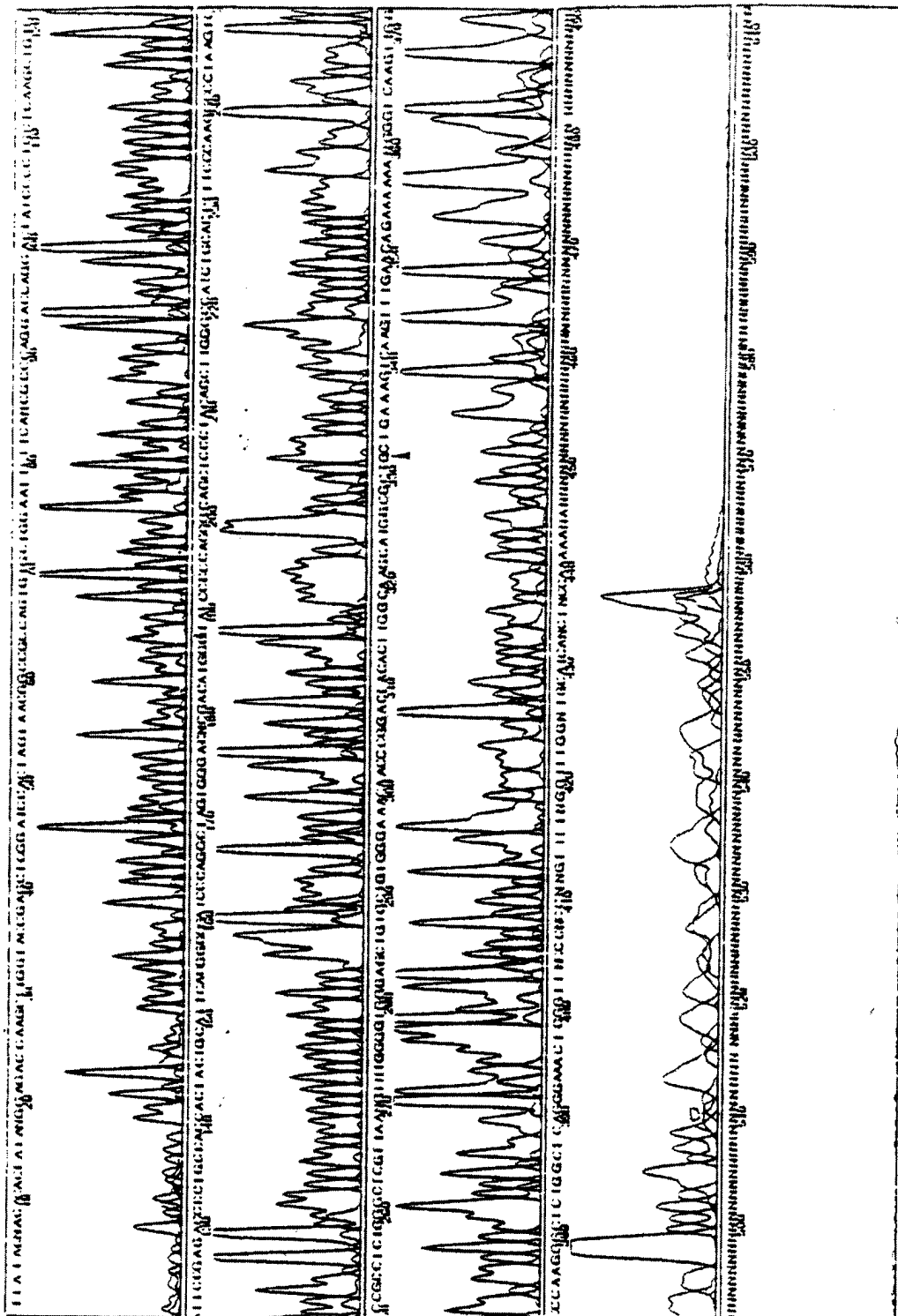
Seq. 8

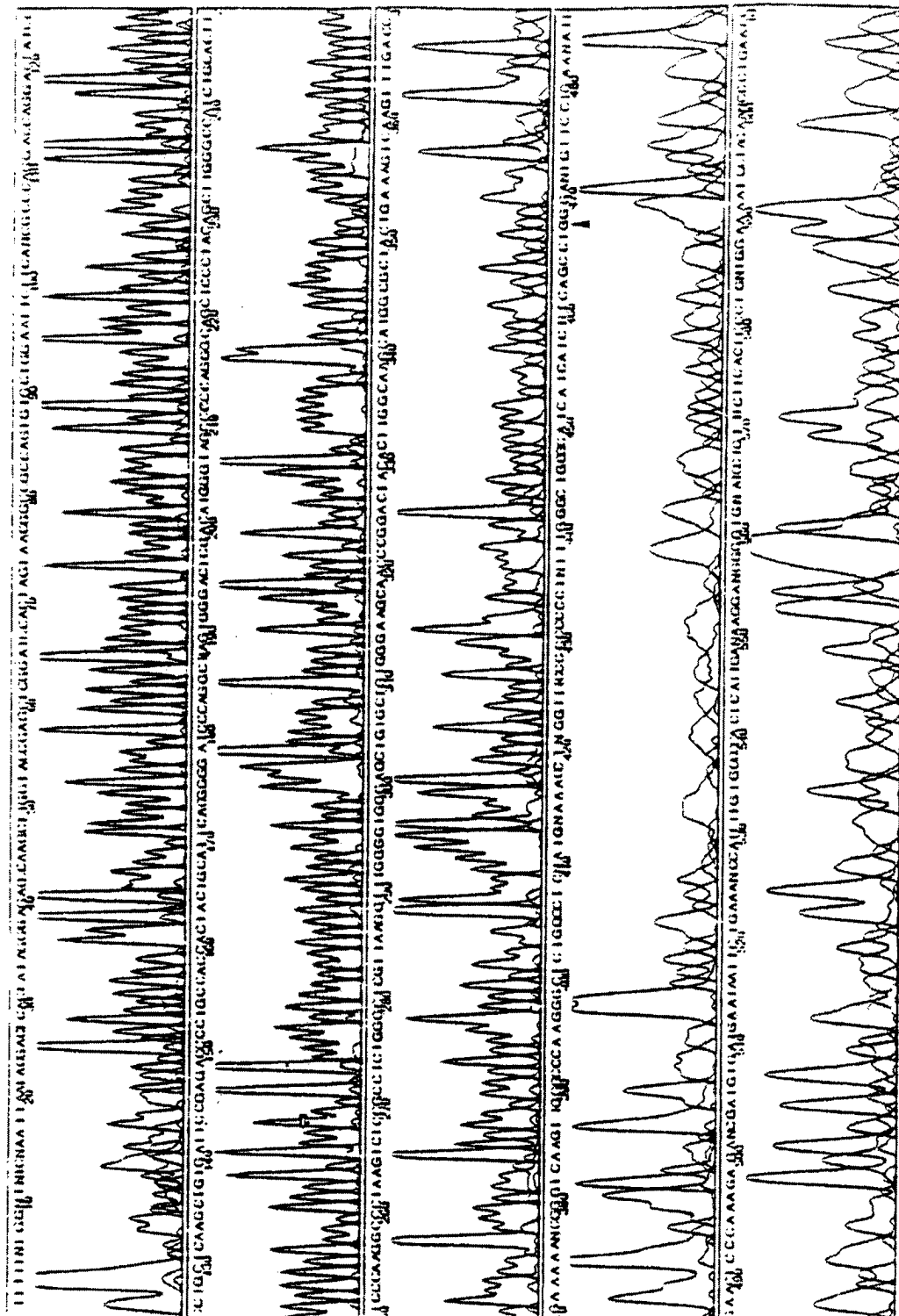


Seq. 9

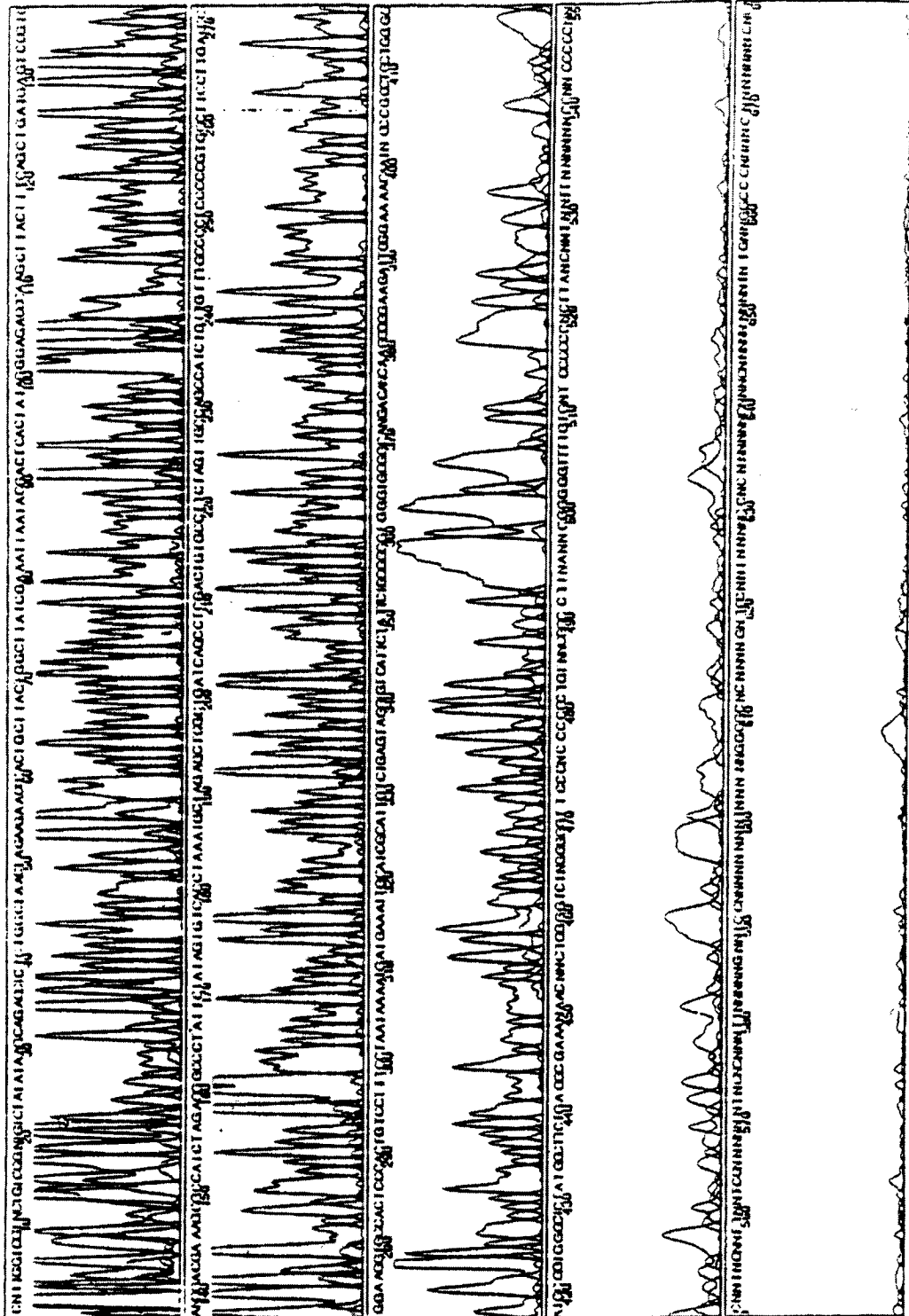


Seq. 10

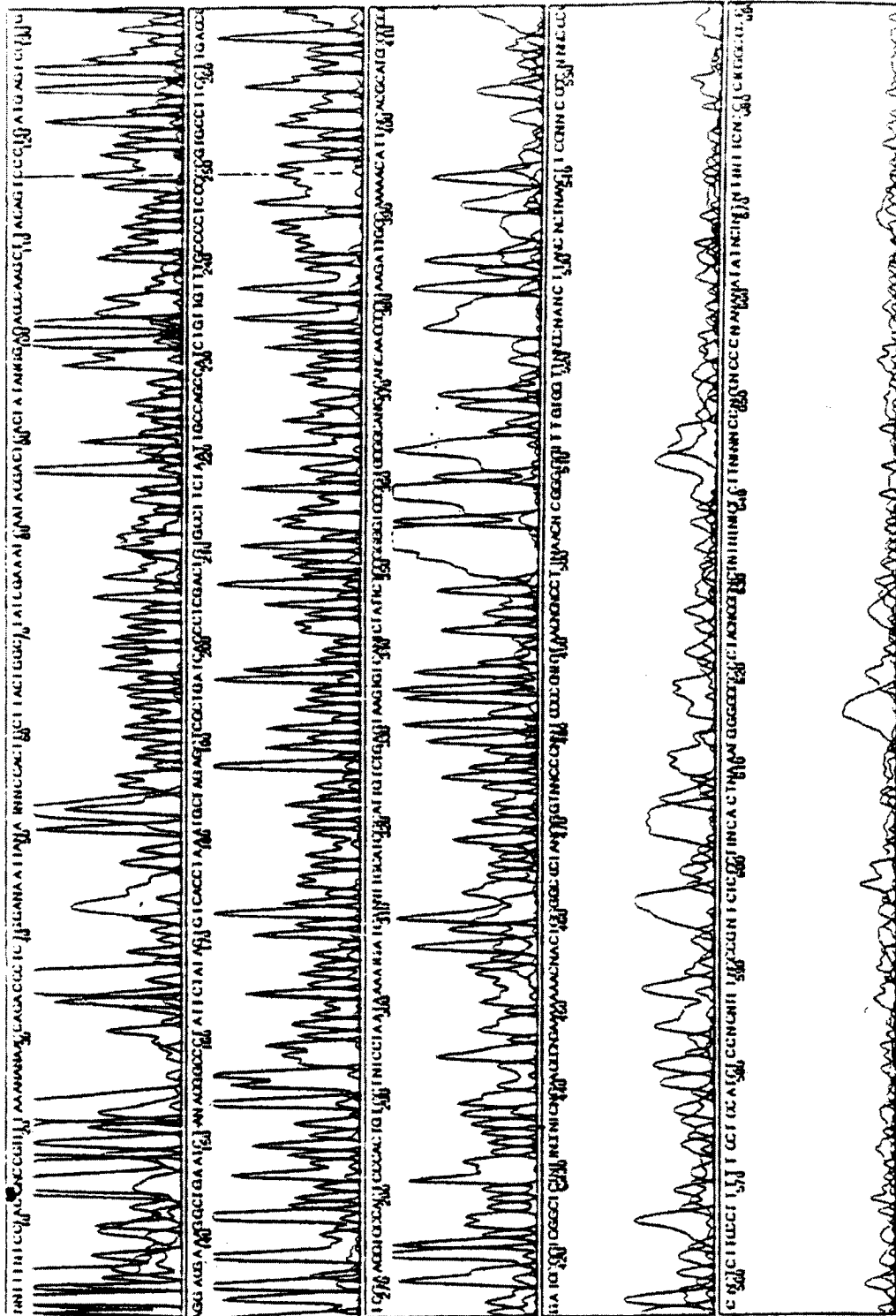




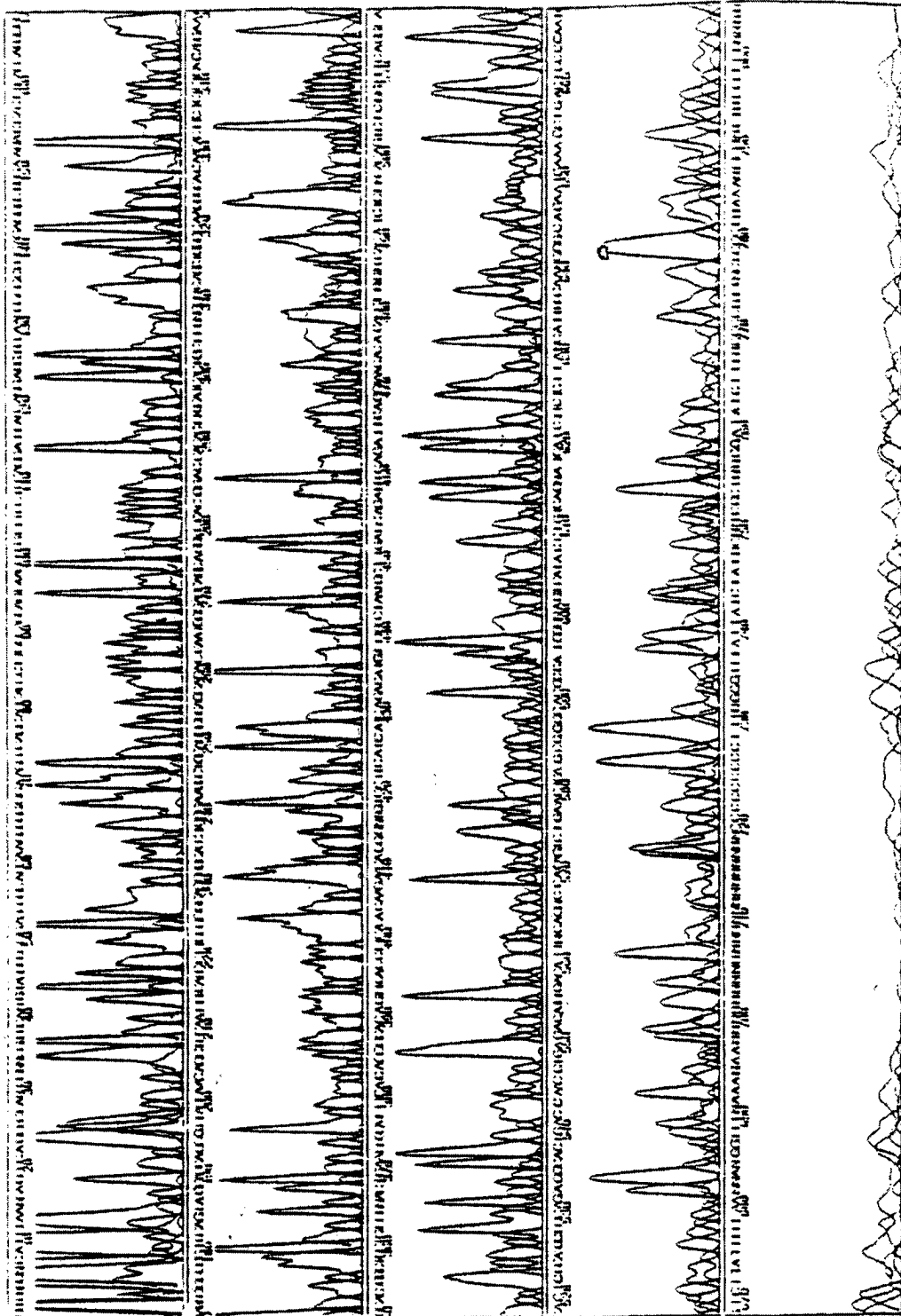
Seq. 12



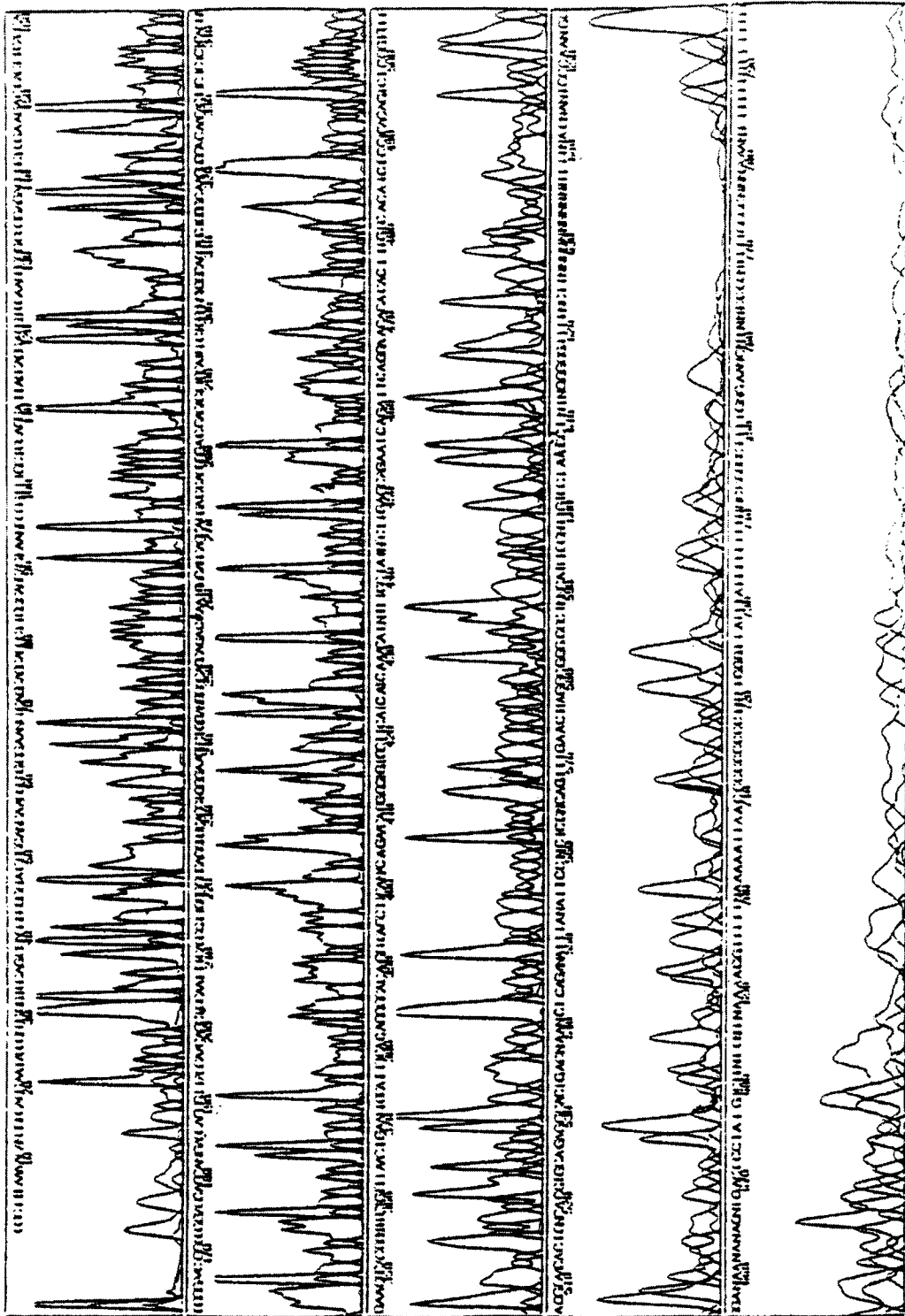
Seq. 13



Seq. 14



Seq. 15



Seq. 16

