



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 696 36 656 T2 2007.10.04

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 828 849 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 696 36 656.8

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US96/08014

(96) Europäisches Aktenzeichen: 96 920 573.1

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1996/038579

(86) PCT-Anmeldetag: 30.05.1996

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 05.12.1996

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 18.03.1998

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 25.10.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 04.10.2007

(51) Int Cl.⁸: C12P 19/34 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

458423	02.06.1995	US
458424	02.06.1995	US
465591	05.06.1995	US
465594	05.06.1995	US
479725	07.06.1995	US
479783	07.06.1995	US
618693	20.03.1996	US

(73) Patentinhaber:

Gilead Sciences, Inc., Foster City, Calif., US

(74) Vertreter:

LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

TOOTHMAN, J., Penelope, Boulder, CO 80304, US;
GOLD, Larry, Boulder, CO 80303, US; JANJIC,
Nebojsa, Boulder, CO 80301, US; RINGQUIST,
Steven, Lyons, CO 80540, US; PAGRATIS, Nikos,
Boulder, CO 80301, US

(54) Bezeichnung: OLIGONUKLEOTIDLIGANDEN MIT HOHER AFFINITÄT FÜR PDGF

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 eingelebt, 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**Gebiet der Erfindung**

[0001] Es werden hierin Verfahren zur Identifizierung und Herstellung von hochaffinen Nucleinsäureliganden für TGF β , PDGF und hKGF beschrieben. Das hierin zur Identifizierung derartiger Nucleinsäureliganden eingesetzte Verfahren wird SELEX genannt, ein Akronym für „Systematische Evolution von Liganden durch Exponentielle Anreicherung“. Die Erfindung umfasst hochaffine Nucleinsäureliganden von PDGF. Außerdem werden RNA- und DNA-Liganden für TGF β 1 und PDGF und RNA-Liganden für hKGF offenbart. Ebenfalls umfasst sind Oligonucleotide, die Nucleotidderivate enthalten, die an den 2'-Positionen von Pyrimidinen chemisch modifiziert sind. Außerdem offenbart werden RNA-Liganden für TGF β 1 und hKGF, die 2'-NH₂-Modifizierungen oder 2'-F-Modifizierungen enthalten, sowie RNA-Liganden für PDGF, die 2'-F-Modifizierungen enthalten. Diese Erfindung umfasst außerdem hochaffine Nucleinsäureinhibitoren von PDGF. Die Oligonucleotide der vorliegenden Erfindung sind als Pharmazeutika oder Diagnosemittel zweckdienlich.

Hintergrund der Erfindung**TGF β**

[0002] Die transformierenden Wachstumsfaktor- β -(TGF β -)Polypeptide beeinflussen Wachstum, Differenzierung und Genexpression in zahlreichen Zelltypen. Das erste Polypeptid dieser Familie, das charakterisiert wurde, TGF β 1, weist zwei identische 112-Aminosäuren-Untereinheiten auf, die kovalent gebunden sind. TGF β 1 ist ein höchst konserviertes Protein mit nur einem einzigen Aminosäureunterschied, der menschliche Formen von Maus-Formen unterscheidet. Es gibt zwei Elemente der TGF β -Genfamilie, die in Säugetieren exprimiert werden. TGF β 2 ist zu 71 % homolog zu TGF β 1 (de Martin et al., EMBO J. 6, 3673-3677 (1987)), wogegen TGF β 3 zu 80 % homolog zu TGF β 1 ist (Deryck et al., EMBO J. 7, 3737-3743 (1988)). Die mittels Kernmagnetresonanz ermittelten strukturellen Eigenschaften von TGF β 1 (Archer et al., Biochemistry 32, 1164-1171 (1993)) stehen im Einklang mit der Kristallstruktur von TGF β 2 (Daopin et al., Science 257, 369-374 (1992); Schlunegger and Grutter, Nature 358, 430-434 (1992)).

[0003] Obwohl die TGF β s ähnliche dreidimensionale Strukturen aufweisen, sind sie physiologisch keineswegs äquivalent. Es gibt zumindest drei verschiedene extracelluläre Rezeptoren, Typ I, II und III, die an der Transmembransignalisierung von TGF β an Zellen beteiligt sind, die die Rezeptoren tragen. Für einen Überblick siehe Deryck, TIBS 19, 548-553 (1994), und Massague, Annu. Rev. Cell Biol. 6, 597-641 (1990). Damit TGF β 2 wirksam mit dem Typ-II-TGF β -Rezeptor Wechselwirken kann, muss auch der Typ-III-Rezeptor zugegen sein (Deryck, TIBS 19, 548-553 (1994)). Gefäßendothelzellen fehlt der Typ-III-Rezeptor. Stattdessen exprimieren Endothelzellen ein strukturell verwandtes Protein, das Endoglin genannt wird (Cheifetz et al., J. Biol. Chem. 267, 19027-19030 (1992)), das nur TGF β 1 und TGF β 3 mit hoher Affinität bindet. Daher widerspiegelt die relative Wirksamkeit der TGF β s den Typ von Rezeptoren, der in einem Zell- und Organsystem exprimiert wird.

[0004] Zusätzlich zur Regulation der Komponenten im multifaktoriellen Signalweg beeinflusst auch die Verteilung und Synthese der TGF β -Polypeptide die physiologische Funktion. Die Verteilung von TGF β 2 und TGF β 3 ist eingeschränkter (Deryck et al., EMBO J. 7, 3737-3743 (1988)) als TGF β 1, z.B. ist TGF β 3 auf Gewebe mesenchymalen Ursprungs beschränkt, wogegen TGF β 1 in Mesenchymzellen sowie Epithelzellen gegen ist.

[0005] TGF β 1 ist ein multifunktionelles Cytokin, das für die Gewebereparatur entscheidend ist. Hohe Konzentrationen an TGF β 1 werden der Verletzungsstelle durch Blutplättchen-Granula zugeführt (Assoian und Sporn, J. Cell. Biol. 102, 1217-1223 (1986)). TGF β 1 löst eine Reihe von Ereignissen aus, die die Heilung fördern, einschließlich Chemotaxis von Zellen, wie z.B. Leukozyten, Monozyten und Fibroblasten, und Regulation von Wachstumsfaktoren und Cytokinen, die an der Angiogenese beteiligt sind, mit Zellreparatur zusammenhängende Zellteilung und entzündliche Reaktionen. TGF β 1 stimuliert außerdem die Synthese von Komponenten der extracellulären Matrix (Roberts et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4167-4171 (1986); Sporn et al., Science 219, 1329-1330 (1983); Massague, Cell 49, 437-438 (1987)), und insbesondere bedeutsam für das Verständnis der Pathophysiologie von TGF β 1 autoreguliert TGF β 1 seine eigene Synthese (Kim et al., J. Biol. Chem. 264, 7041-7045 (1989)).

[0006] Eine Anzahl von Krankheiten ist mit TGF β 1-Überproduktion in Zusammenhang gebracht worden. Mit TGF β 1-Überproduktion zusammenhängende fibrotische Krankheiten können in chronische Leiden, wie z.B. Fi-

brose von Niere, Lunge und Leber, sowie akutere Leiden, wie z.B. Hautvernarbung und Restenose, eingeteilt werden. Die Synthese und Sekretion von TGF β 1 durch Tumorzellen kann außerdem zur Immunsuppression führen, wie sie beispielsweise bei Patienten mit aggressiven Hirn- oder Brusttumoren beobachtet wird (Arteaga et al., J. Clin. Invest. 92, 2569-2576 (1993)). Der Verlauf der Leishmania-Infektion in Mäusen wird durch TGF β 1 drastisch verändert (Barral-Netto et al., Science 257, 545-547 (1992)). TGF β 1 verschlimmerte die Krankheit, wogegen TGF β 1-Antikörper das Fortschreiten der Krankheit in genetisch anfälligen Mäusen aufhielt. Genetisch widerstandsfähige Mäuse wurden nach Verabreichung von TGF β 1 für Leishmania-Infektion anfällig.

[0007] Die profunden Wirkungen von TGF β 1 auf die Abscheidung der extracellulären Matrix sind im Überblick beschrieben worden (Rocco und Ziyadeh, in: Contemporary Issues in Nephrology v23, Hormones, autocoids and the kidney, Jay Stein (Hrsg.), Churchill Livingston, NY, S. 391-410 (1991); Roberts et al., Rec. Prog. Hormone Res. 44, 157-197 (1988)) und umfassen die Stimulierung der Synthese und der Hemmung des Abbaus extracellulärer Matrixkomponenten. Da die Struktur und Filtrationseigenschaften des Glomerulus hauptsächlich von der Zusammensetzung der extracellulären Matrix von Mesangium und Glomerularmembran bestimmt sind, ist es nicht überraschend, dass TGF β 1 profunde Wirkungen auf die Niere ausübt. Die Anreicherung von Mesangiummatrix bei proliferativer Glomerulonephritis (Border et al., Kidney Int. 37, 689-695 (1990)) und diabetischer Nephropathie (Mauer et al., J. Clin. Invest. 74, 1143-1155 (1984)) sind eindeutige und dominierende pathologische Eigenschaften der Krankheiten. TGF β 1-Spiegel sind bei menschlicher diabetischer Glomerulosklerose (fortgeschrittene Neuropathie) erhöht (Yamamoto et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 1814-1818 (1993)). TGF β 1 ist ein wichtiger Vermittler bei der Entstehung von Nierenfibrose in einer Reihe von Tiermodellen (Phan et al., Kidney Int. 37, 426 (1990); Okuda et al., J. Clin. Invest. 86, 453 (1990)). Die Unterdrückung von experimentell induzierter Glomerulonephritis in Ratten ist mittels Antiserum gegen TGF β 1 (Border et al., Nature 346, 371 (1990)) und mittels eines extracellulären Matrixproteins, Decorin, das TGF β 1 binden kann, nachgewiesen worden (Border et al., Nature 360, 361-363 (1992)).

[0008] Zu viel TGF β 1 führt zu Hautnarbengewebebildung. Es ist gezeigt worden, dass neutralisierende TGF β 1-Antikörper, die in die Ränder heilender Wunden in Ratten injiziert wurden, die Vernarbung hemmten, ohne die Geschwindigkeit der Wundheilung oder die Zugfestigkeit der Wunde zu stören (Shah et al., Lancet 339, 213-214 (1992)). Gleichzeitig lagen verminderte Angiogenese, eine verminderte Anzahl von Makrophagen und Monozyten in der Wunde und ein vermindertes Ausmaß an ungeordneter Kollagenfaserablagerung im Narbengewebe vor.

[0009] TGF β 1 könnte ein Faktor bei der progressiven Verdickung der Arterienwand sein, die aus der Proliferation von Glattmuskelzellen und Ablagerung von extracellulärer Matrix in der Arterie nach Ballonangioplastie resultiert. Der Durchmesser der erneut verengten Arterie kann durch diese Verdickung um 90 % vermindert sein, und da der Großteil der Durchmesserverminderung auf extracelluläre Matrix und nicht auf Glattmuskelzellenkörperchen zurückzuführen ist, könnte es möglich sein, diese Gefäße einfach durch Vermindern einer extensiven Ablagerung extracellulärer Matrix auf 50 % zu öffnen. Bei unverletzten Schweinearterien, die *in vivo* mit einem TGF β 1-Gen transfiziert waren, war die TGF β 1-Genexpression mit der Synthese extracellulärer Matrix sowie Hyperplasie verbunden (Nabel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10759-10763 (1993)). Die TGF β 1-induzierte Hyperplasie war nicht so ausgeprägt wie jene mit PDGF-BB induzierte, jedoch war die extracelluläre Matrix ausgeprägter als bei TGF β 1-Transfektanten. Bei FGF-1-(eine sekretierte Form von FGF) induzierter Hyperplasie war mit diesem Gentransfer-Schweinemodell keine Ablagerung extracellulärer Matrix verbunden (Nabel, Nature 362, 844-846 (1993)).

[0010] Es gibt mehrere Krebstypen, bei denen durch den Tumor produziertes TGF β 1 schädlich sein kann. MATLyLu-Rattenkrebszellen (Steiner und Barrack, Mol. Endocrinol. 6, 15-25 (1992)) und menschliche MCF-7-Brustkrebszellen (Arteaga et al., Cell Growth and Differ. 4, 193-201 (1993)) wurden nach Transfektion mit einem Maus-TGF β 1 exprimierenden Vektor stärker tumorerregend und metastatisch. Bei Brustkrebs ist eine schlechte Prognose mit erhöhtem TGF β verbunden (Dickson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 837-841 (1987); Kasid et al., Cancer Res. 47, 5733-5738 (1987); Daly et al., J. Cell Biochem. 43, 199-211 (1990); Barrett-Lee et al., Br. J. Cancer 61, 612-617 (1990); King et al., J. Steroid Biochem. 34, 133-138 (1989); Welch et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 7678-7682 (1990); Walker et al., Eur. J. Cancer 238, 641-644 (1992)), und die Induktion von TGF β 1 durch Tamoxifen-Behandlung (Butta et al. Cancer Res. 52, 4261-4264 (1992)) ist mit dem Versagen von Tamoxifen-Behandlung für Brustkrebs in Zusammenhang gebracht worden (Thompson et al., Br. J. Cancer 63, 609-614 (1991)). Anti-TGF β 1-Antikörper hemmen das Wachstum von menschlichen MDA-231-Brustkrebszellen in athymischen Mäusen (Arteaga et al., J. Clin. Invest. 92, 2569-2576 (1993)), eine Behandlung, die mit einer Erhöhung natürlicher Killerzellenaktivität der Milz korreliert worden ist. Mit latentem TGF β 1 transfizierte CHO-Zellen zeigten auch verminderte NK-Aktivität und verstärktes Tumorzelltumorenbildung bei Nacktmäusen (Wallick et al., J. Exp. Med. 172, 1777-1784 (1990)). Folglich könnte von Brusttumoren

sekretiertes TGF β 1 eine endokrine Immunsuppression bewirken.

[0011] Es ist gezeigt worden, dass hohe Plasmakonzentrationen an TGF β 1 eine schlechte Prognose für fortgeschrittene Brustkrebspatienten anzeigen (Anscher et al., N. Engl. J. Med. 328, 1592-8 (1993)). Patienten mit hohem zirkulierendem TGF β vor hochdosierter Chemotherapie und autologer Knochenmarktransplantation weisen ein hohes Risiko für Lebervenenverschlusskrankheit (15-50 % aller Patienten mit einer Sterberate von bis zu 50 %) und idiopathische interstitielle Pneumonie auf (40-60 % aller Patienten). Die Konsequenz dieser Befunde ist 1), dass erhöhte Plasmaspiegel von TGF β 1 verwendet werden können, um Risikopatienten zu identifizieren, und 2), dass eine Verminderung von TGF β 1 die Morbidität und Mortalität dieser gebräuchlichen Behandlungen für Brustkrebspatienten herabsetzen könnte.

PDGF

[0012] Aus Blutplättchen gewonnener Wachstumsfaktor (PDGF) wurde ursprünglich aus Blutplättchenlysaten isoliert und als hauptsächliche wachstumsfördernde, in Serum, nicht jedoch in Plasma vorhandene Aktivität identifiziert. Es sind zwei homologe PDGF-Isoformen, PDGF A und B, identifiziert worden, die von gesonderten Genen (an den Chromosomen 7 und 22) kodiert werden. Die häufigste Spezies aus Blutplättchen ist das AB-Heterodimer, obgleich alle drei möglichen Dimere (AA, AB und BB) in der Natur vorkommen. Im Anschluss an die Translation werden PDGF-Dimere zu sekretierten ~30-kDa-Proteinen prozessiert. Zwei Zelloberflächenproteine, die PDGF mit hoher Affinität binden, sind identifiziert worden, α und β (Heldin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 3664 (1981); Williams et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 5867 (1981)). Beide Spezies enthalten fünf Immunglobulin-ähnliche extracelluläre Domänen, eine einzelne Transmembrandomäne und eine intracelluläre Tyrosinkinasedomäne, die durch eine Kinaseinsertdomäne getrennt ist. Der funktionelle hochaffine Rezeptor ist ein Dimer, und die Betätigung der extracellulären Domäne des Rezeptors durch PDGF resultiert in der Kreuz-Phosphorylierung (eine der Rezeptortyrosinkinasen phosphoryliert die andere im Dimer) mehrerer Tyrosinreste. Die Rezeptorphosphorylierung führt zu einer Kaskade von Ereignissen, die in der Übertragung der mitogenen oder chemotaktischen Signale an den Kern resultieren. Beispielsweise sind in der intracellulären Domäne des PGDF- β -Rezeptors neun Tyrosinreste identifiziert worden, die, wenn sie phosphoryliert sind, mit verschiedenen src-Homologie-2-(SH2-)Domänen-enthaltenden Proteinen, einschließlich Phospholipase C-g, Phosphatidyllinositol-3'-kinase, GTPase-aktivierendem Protein und mehreren Adaptermolekülen wie Shc, Grb2 und Nck wechselwirken (Heldin, Cell 80, 213 (1995)). In den letzten Jahren sind die Spezifitäten der drei PDGF-Isoformen für die drei Rezeptordimere ($\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ und $\beta\beta$) aufgeklärt worden. Das α -Rezeptorhomodimer bindet alle drei PDGF-Isoformen mit hoher Affinität, das β -Rezeptorhomodimer bindet nur PDGF-BB mit hoher Affinität und PDGF-AB mit etwa 10fach niedrigerer Affinität, und das $\alpha\beta$ -Rezeptorheterodimer bindet PDGF-BB und PDGF-AB mit hoher Affinität (Westermark und Heldin, Acta Oncologica 32, 101 (1993)). Das Spezifitätsmuster resultiert aus der Fähigkeit der A-Kette, nur an die α -Rezeptoruntereinheit zu binden, und der B-Kette, an α - sowie β -Rezeptoruntereinheiten mit hoher Affinität zu binden.

[0013] Der früheste Hinweis darauf, dass die PDGF-Expression mit maligner Transformation verbunden ist, kam mit dem Befund, dass die Aminosäuresequenz der PDGF-B-Kette nahezu identisch ist mit der von p28^{SIS}, dem transformierenden Protein des Simian-Sarkom-Virus (SSV) (Waterfield et al., Nature 304, 35 (1983); Johnsson et al., EMBO J. 3, 921 (1984)). Das transformierende Potential des PDGF-B-Ketten-Gens und, in einem geringeren Ausmaß, des PDGF-A-Gens wurde bald darauf nachgewiesen (Clarke et al., Nature 308, 464 (1984); Gazit et al., Cell 39, 89 (1984); Beckmann et al., Science 241, 1346; Bywater et al., Mol. Cell. Biol. 8, 2753 (1988)). Von zahlreichen Tumorzelllinien ist seither gezeigt worden, dass sie PDGF produzieren und sekretieren, wobei manche davon PDGF-Rezeptoren exprimieren (Raines et al., Peptide Growth Factors and Their Receptors, Springer-Verlag, Teil I, S. 173 (1990)). Parakrine und in manchen Zelllinien autokrine Wachstumstimulierung durch PDGF ist daher möglich. Beispielsweise hat die Analyse von Biopsien aus menschlichen Gliomen die Existenz von zwei autokrinen Schleifen offenbart: PDGF-B/β-Rezeptor in tumorassoziierten Endothelzellen und PDGF-A/α-Rezeptor in Tumorzellen (Hermansson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 7748 (1988); Hermansson et al., Cancer Res. 52, 3213 (1992)). Das Fortschreiten zu hochgradigem Gliom war von einer Erhöhung der Expression von PDGF-B und des β-Rezeptors in tumorassoziierten Endothelzellen und PDGF-A in Gliomzellen begleitet. Eine erhöhte Expression von PDGF und/oder PDGF-Rezeptoren ist auch bei anderen Malignitäten, einschließlich Fibrosarkom (Smits et al., Am. J. Pathol. 140, 639 (1992)) und Schilddrüsenkarzinom (Heldin et al., Endocrinology 129, 2187 (1991)) beobachtet worden.

[0014] In Anbetracht der Bedeutung bei proliferativen Krankheitszuständen könnten Antagonisten von PDGF nützliche klinische Anwendungen finden. Gegenwärtig sind Antikörper gegen PDGF (Johnsson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1721-1725 (1985); Ferns et al., Science 153, 1129-1132 (1991); Herren et al., Biochimica et Biophysica Acta 1173, 194-302 (1993)) und die löslichen PDGF-Rezeptoren (Herren et al., Biochimica et Biophysica Acta 1173, 194-302 (1993))

et Biophysica Acta 1173, 194-302 (1993); Duan et al., J. Biol. Chem. 266, 413-418 (1991); Teisman et al., J. Biol. Chem. 268, 9621-9628 (1993)) die potentesten und spezifischsten Antagonisten von PDGF. Von neutralisierenden Antikörpern gegen PDGF ist gezeigt worden, dass sie den SSV-transformierten Phänotyp umkehren (Johnsson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1721-1725 (1985)) und die Entwicklung von Neointimalläsionen nach Arterienverletzung hemmen (Ferns et al., Science 153, 1129-1132 (1991)). Andere Inhibitoren von PDGF, wie z.B. Suramin (Williams et al., J. Biol. Chem. 259, 5287-5294 (1984); Betsholtz et al., Cell 39, 447-457 (1984)), Neomycin (Vassbotn et al., J. Biol. Chem. 267, 15635-15641 (1992)) und Peptide, die sich von der PDGF-Aminosäuresequenz herleiten (Engström et al., J. Biol. Chem. 267, 16581-16587 (1992)), sind beschrieben worden, sind jedoch entweder zu toxisch oder es fehlt ihnen ausreichende Spezifität oder Potenz, um gute Wirkstoffkandidaten zu sein. Andere Typen von Antagonisten möglicher klinischer Zweckdienlichkeit sind Moleküle, die die PDGF-Rezeptor-Tyrosinkinase selektiv hemmen (Buchdunger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 2558-2562 (1995); Kovalenk et al., Cancer Res. 54, 6106-6114 (1994)).

hKGF

a) Biochemische Eigenschaften von hKGF

[0015] Menschlicher Keratinozytenwachstumsfaktor (hKGF) ist ein kleiner (26-28 kD) basischer Heparin-bindender Wachstumsfaktor und ein Element der FGF-Familie. hKGF ist ein relativ neu identifiziertes Molekül, das auch als FGF-7 bekannt ist (Finch et al., Science 244, 752-755 (1989)). Er ist ein für Epithelzellen spezifischer Wachstumsfaktor (Rubin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 802-806 (1989)), und seine Hauptfunktion liegt in der Entwicklung/Morphogenese (Werner et al., Science 266, 819-822 (1994)) und in der Wundheilung (Werner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6896-6900 (1992)). Die hauptsächliche In-vivo-Quelle von hKGF sind Stroma-Fibroblasten (Finch et al., Science 244, 752-755 (1989)). Von Mikrogefäß-Endothelzellen (Smola et al., J. Cell. Biol. 122, 417-429 (1993)) und, in jüngster Zeit, aktivierten intraepithelialen gd-T-Zellen (Boismenu et al., Science 266, 1253-1255 (1994)) ist ebenfalls gezeigt worden, dass sie hKGF synthetisieren. hKGF-Expression ist in Wunden stimuliert (Werner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6896-6900 (1992)). Mehrere Cytokine erweisen sich als hKGF-Induktoren (Brauchle et al., Oncogene 9, 3199-3204 (1994)), wobei IL-1 der potenteste ist (Brauchle et al., Oncogene 9, 3199-3204 (1994); Chedid et al., J. Biol. Chem. 269, 10753-10757 (1994)). Im Gegensatz zu bFGF weist hKGF ein Signalpeptid auf und wird folglich durch Produktionszellen sekretiert (Finch et al., Science 244, 752-755 (1989)). hKGF kann in E. coli überexprimiert werden, und das rekombinante Protein (~19-21 kD) ist biologisch aktiv (Ron et al., J. Biol. Chem. 268, 2984-2988 (1993)). Das von E. coli stammende rekombinante Protein ist 10-Mal stärker mitogen als das native Protein (Ron et al., J. Biol. Chem. 268, 2984-2988 (1993)). Dieser Unterschied könnte an der Glykosylierung liegen. Das native Protein weist eine mögliche Asn-Glykosylierungsstelle auf (Ron et al., J. Biol. Chem. 268, 2984-2988 (1993)).

[0016] Die hKGF-Bioaktivität wird durch einen spezifischen Zelloberflächenrezeptor vermittelt (Miki et al., Science 251, 72-75 (1991)). Der hKGF-Rezeptor ist ein modifizierter FGF-Rezeptor, der aus der alternativen Spaltung der C-terminalen extracellulären Region des FGF-R2 resultiert (Miki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 246-250 (1992)). Mit dem hKGF-Rezeptor transfizierte NIH/3T3-Zellen exprimieren hochaffine (~200 pM) Bindungsstellen für hKGF (Miki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 246-250 (1992)). Die ungefähre Anzahl spezifischer Bindungsstellen pro NIH/3T3-Zelle ist etwa 500.000 (D. Bottaro und S. Aaronson, persönliche Mitteilung). Der hKGF-Rezeptor bindet hKGF und aFGF mit ähnlichen Affinitäten und bFGF mit etwa 20fach niedrigerer Affinität (Miki et al., Science 251, 72-75 (1991); Miki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 246-250 (1992)). Eine Variante des hKGF-Rezeptors erwies sich als ein amplifiziertes Gen (d.h. ein einziges Gen, mehrere Kopien), K-SAM genannt, in einer menschlichen Magenkarzinomzelllinie (Hattori et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88(7), 5983-5987 (1990)).

[0017] Es ist berichtet worden, dass Heparin ein Inhibitor der hKGF-Bioaktivität ist (Ron et al., J. Biol. Chem. 268, 2984-2988 (1993)). Dies steht im Gegensatz zur agonistischen Wirkung von Heparin für aFGF (Spivac-Kroixman et al., Cell 79, 1015-1024 (1994)).

b) Rolle von hKGF bei menschlichen Krankheiten

[0018] Das rekombinante hKGF-Molekül ist erst seit 1993 verfügbar. Daher gibt es nur begrenzte Informationen über die Rolle von hKGF bei menschlichen Krankheiten. Die veröffentlichte Literatur enthält jedoch starke Hinweise, die auf eine Rolle für hKGF bei zumindest zwei menschlichen Krankheiten, nämlich Psoriasis und Krebs, schließen lassen. hKGF ist außerdem mit entzündlicher Darmerkrankung in Verbindung gebracht worden (P. Finch, persönliche Mitteilung).

Psoriasis

[0019] Psoriasis ist eine Hauterkrankung, die schwächend sein kann (Greaves et al., N. Eng. J. Medicine 332, 581-588 (1995)) und durch Hyperproliferation der Epidermis und unvollständige Differenzierung von Keratinozyten zusammen mit Hautentzündung gekennzeichnet ist (Abel et al., Scientific American Medicine III-1 bis III-18 (1994); Greaves et al., N. Eng. J. Medicine 332, 581-588 (1995)). Es gibt noch keine wirksame Behandlung für Psoriasis (Anonymus, Drug & Market Development 4, 89-101 (1993); Abel et al., Scientific American Medicine III-1 bis III-18 (1994); Greaves et al., N. Eng. J. Medicine 332, 581-588 (1995)). Psoriasis tritt bei 0,5 bis 2,8 Prozent der Population mit dem höchsten Vorkommen in Skandinavien auf. In den USA im Jahre 1992 wurde geschätzt, dass 4-8 Millionen von Psoriasis befallene Menschen etwa 600 Millionen US-Dollar für verschiedene Medikamente und zugehörige Therapien ausgaben, von denen keine besonders wirksam ist. Der Großteil der Aufwendungen wurde von etwa 400.000 Patienten mit schwerer Psoriasis getätigt, die \$ 1.000-1.500 jährlich für Behandlungen ausgaben. Es gibt jedes Jahr ungefähr 200.000 neue Fälle von Psoriasis.

[0020] Die grundlegende Ursache der Störung ist nicht bekannt, jedoch resultiert sie aus einem primären oder sekundären Defekt der Mechanismen, die die epidermale Keratinozyten-Zellteilung regulieren (Abel et al., Scientific American Medicine III-1 bis III-18 (1994)). Psoriasis reagiert auf Steroide und Cyclosporin und ist in diesem Sinne als Immunerkrankung charakterisiert (Abel et al., Scientific American Medicine III-1 bis III-18 (1994)). Da hKGF der primäre spezifische Wachstumsfaktor für Keratinozyten ist, sind seine Überexpression und Deregulation Hauptkandidaten der Ursache der Keratinozyten-Hyperproliferation bei Psoriasis. Der Nachweis, dass das Immunsystem ein Hauptregulator der hKGF-Freisetzung ist (Bois menu et al., Science 266, 1253-1255 (1994); Brauchle et al., Oncogene 9, 3199-3204 (1994); Chedid et al., J. Biol. Chem. 269, 10753-10757 (1994)), stärkt die Auffassung, dass hKGF-Deregulation die Ursache der Psoriasis ist. Darüber hinaus erzeugt die Anwendung von hKGF bei Wunden beim Schwein eine histologische Erscheinungsform, die der Psoriasis gleicht (Staiano-Coico et al., J. Ex. Med. 178, 865-878 (1993)); verursachte von Keratinozyten stammendes hKGF in transgenen Mäusen eine an Psoriasis erinnernde Pathologie (Guo et al., EMBO J. 12, 973-986 (1993)), wiesen In-situ-Hybridisierungsexperimente eine mäßige und eine starke Up-Regulation von hKGF bzw. hKGF-Rezeptoren bei Psoriasis nach (P. Finch, persönliche Mitteilung). In-situ-Hybridisierungsexperimente wiesen außerdem die Beteiligung von hKGF an einer weiteren Immunerkrankung, nämlich entzündlicher Darmerkrankung, nach (P. Finch, persönliche Mitteilung).

Krebs

[0021] Es ist in der Literatur gut begründet, dass zu erwarten ist, dass die Deregulation der Expression von Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktor hKGF und/oder seines Rezeptors das Transformationsereignis bei manchen menschlichen Krebsformen ist. Die transformierende Fähigkeit des hKGF-Systems ist in vitro nachgewiesen worden (Miki et al., Science 251, 72-75 (1991)). In einer weiteren Untersuchung hat sich gezeigt, dass Karzinomzelllinien den hKGF-Rezeptor exprimieren und auf hKGF, nicht jedoch auf aFGF reagieren, während Sarkomzelllinien hKGF-Rezeptoren nicht exprimieren und auf aFGF, nicht jedoch auf hKGF reagieren (Ishii et al., Cancer Res. 54, 518-522 (1994)).

Magen-Darm-Krebs

[0022] Mehrere schlecht differenzierte Magenkrebssformen weisen ein amplifiziertes, K-sam genanntes Gen auf, das eine Isoform des hKGF-Rezeptors ist (Katoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 2960-2964 (1992)). Die In-vivo-Verabreichung von hKGF an Ratten bewirkt die Proliferation von Pankreasgang-Epithelzellen (Yi et al., Am. J. Pathol. 145, 80-85 (1994)), Hepatozyten und Epithelzellen im gesamten Magen-Darm-Trakt (Housley et al., J. Clin. Invest. 94, 1764-1777 (1994)).

Lungenkrebs

[0023] Verabreichung von hKGF an Ratten bewirkt Pneumozyten-Hyperplasie vom Typ II ähnlich zur Bronchus-Alveolen-Zellvariante von Lungenkarzinom (Ulrich et al., J. Clin. Invest. 93, 1298-1306 (1994)).

Brustkrebs

[0024] In vivo bewirkt hKGF Milchgangdilatation und wuchernde Epithelhyperplasie, wobei beide häufige Merkmale von Brustkrebsformen sind (Ulrich et al., Am. J. Pathol. 144, 862-868 (1994); Yi et al., Am. J. Pathol. 145, 1015-1022 (1994)). Jedoch ist das Duktusepithel von stillenden Ratten gegen die wachstumsfördernden

Wirkungen von hKGF resistent, und dies ist von Interesse in Bezug auf epidemiologische Beobachtungen, dass Schwangerschaft bei Frauen die Anfälligkeit für Brustkrebs vermindert und dass Milchkühe fast nie Brustkrebs entwickeln (Kuzma, Breast in Pathology, Mosby Co. (1977)). Es bestehen weitere unterstützende Hinweise, die hKGF mit Brustkrebs in Verbindung bringen. hKGF-mRNA ist kürzlich in normalem menschlichem Brustgewebe und in 12 von 15 getesteten Brustkrebsproben nachgewiesen worden (Koos et al., J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 45, 217-225 (1993)). Die Gegenwart von hKGF-mRNA in Brusttumoren betrachtet in Verbindung mit der Beobachtung, dass hKGF in nicht-neoplastischen Milchdrüsen vorhanden ist und dass hKGF eine wuchernde Proliferation von Mammaepithel bewirkt, legt nahe, dass hKGF ein autokriner oder parakriner Wachstumsfaktor sein könnte, der bei der Regulation des Wachstums von normalem und neoplastischem Mammaepithel von Bedeutung sein könnte (Ulrich et al., Am. J. Pathol. 144, 862-868 (1994)). Infiltrierendes Brustdrüsengangadenokarzinom ist charakteristischerweise von einem desmoplastischen Stroma umhüllt, von dem postuliert worden ist, dass es eine Abwehrreaktion des Wirts gegen das Karzinom darstellt (Ulrich et al., Am. J. Pathol. 144, 862-868 (1994)). Da hKGF vom Stroma abstammt, ist es möglich, dass desmoplastisches Stroma zum Wachstum des Tumors eher beiträgt, als dass es dieses hemmt.

Prostatakrebs

[0025] Die wachstumsfördernde Wirkung von Androgenen auf Prostatatumoren scheint von hKGF vermittelt zu werden (Yan et al., Mol. Endo. 6, 2123-2128 (1992)), da Androgene die Expression von hKGF in Prostastromazellen induzieren. Prostatatumoren, die *in vivo* Androgen-abhängig sind, sind *in vitro* Androgen-unabhängig, jedoch hKGF-abhängig (Yan et al., Mol. Endo. 6, 2123-2128 (1992)). Im Einklang mit der Rolle von hKGF als Andromedin steht die Beobachtung, dass hKGF bei der Epithelinduktion während der Bläschedrüsenentwicklung wirksam ist, einem Vorgang, der von Androgen gesteuert wird (Alarid et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 1074-1078 (1994)). Darüber hinaus bewirkt hKGF die abnormale Aktivierung des Androgenrezeptors, was folglich zum Versagen der Androgenablationstherapie bei Prostatakrebs beiträgt (Culig et al., Cancer Res. 54, 5474-5478 (1994)). Auf Basis dieser Informationen ist es möglich, dass genetische Veränderungen bewirken, dass hKGF der Androgenregulation entweicht und daher den Androgen-abhängigen Tumor in einen Androgen-unabhängigen, höchst malignen Tumor umwandelt. Derartige Tumoren wären nach wie vor fähig, den Androgen-regulierten Marker PSA zu exprimieren, da hKGF auch die abnormale Aktivierung des Androgenrezeptors bewirkt. Es ist außerdem wahrscheinlich, dass hKGF für benigne Prostatahyperplasie (BPH), einem häufigen Gesundheitsproblem bei älteren Männern, verantwortlich ist (D. Bottaro, persönliche Mitteilung).

d) hKGF-Konkurrenten

[0026] Bisher sind ein monoklonaler Antikörper und ein kurzes, vom hKGF-Rezeptor stammendes Peptid (25mer) als hKGF-Konkurrenten beschrieben worden (Bottaro et al., J. Biol. Chem. 268, 9180-9183 (1993)). Der 1G4 genannte monoklonale Antikörper hat eine Kd von 200 pM für hKGF. Das kurze Peptid hemmt die Bindung von hKGF an die Zelloberfläche von NIH/3T3-Zellen, die den menschlichen Rezeptor binden, mit einer Ki von ungefähr 1-5 µM. Bottaro et al. (WO 94/25057) stellen hKGF-Rezeptorpeptide bereit, die die Bindung zwischen hKGF und seinem Rezeptor hemmen. Ebenfalls bereitgestellt wird ein Verfahren zum Testen von Testverbindungen auf die Fähigkeit, hKGF-Rezeptor-vermittelte Zellproliferation zu hemmen.

e) Testen auf Rezeptor-Wachstumsfaktor-Wechselwirkung

[0027] Das Blockieren der Wechselwirkung von Wachstumsfaktoren und Lymphokinen mit ihrem Zelloberflächenrezeptor unter Verwendung von Antagonisten ist ein Ansatz zur Krankheitsbehandlung gewesen. Die Entdeckung derartiger Antagonisten erfordert die Verfügbarkeit biochemischer Tests für die Rezeptor-Wachstumsfaktor- oder Lymphokin-Wechselwirkung. Ein klassischer Test ist die kompetitive Hemmung von radiomarkiertem Wachstumsfaktor oder Lymphokin (Tracer) an seinen Zelloberflächenrezeptor gewesen. Diese Testtypen setzen Zelllinien ein, die den relevanten Rezeptor an ihrer Oberfläche exprimieren, und ermitteln die Menge an zellgebundenem Tracer in Gegenwart verschiedener Konzentrationen möglicher Antagonisten. Zusätzlich setzen andere Tests Membranextrakte aus Zelllinien ein, die den maßgeblichen Rezeptor exprimieren, und die Tracer-Bindung wird mittels Filterbildung (siehe Nenquest Drug Discovery System: Human Tumor Necrosis Factor-Alpha, NEN Research Products, E.I. DePont de Nemours & Co. (Inc.), Boston, MA) oder mittels Immobilisieren der Membranextrakte an feste Träger verfolgt (Urdal et al., J. Biol. Chem. 263, 2870-2877 (1988); Smith et al., Bioch. Bioph. Res. Comm. 176, 335-342 (1991)). Rezeptor-induzierte Gel-Retentionsanalyse von Tracer ist angewendet worden, um die Gegenwart und Größe von Zelloberflächenrezeptoren durch Vernetzung des Rezeptors mit dem Tracer und anschließendes Analysieren an denaturierenden Gelen zu identifizieren (siehe beispielsweise Kull et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5756-5760 (1985); Hohmann et al., J. Biol.

Chem. 264, 14927-14934 (1989); Stauber et al., J. Biol. Chem. 264, 3573-3576 (1989)). Die Verwendung nativer Gele und nicht-vernetzter Komplexe ist für Wachstumsfaktoren oder Lymphokine und ihre Rezeptoren nicht beschrieben worden, ist jedoch breit angewendet worden, um Nucleinsäure-Protein-Wechselwirkungen zu untersuchen (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

[0028] Das Screening verschiedener Krebszelllinien auf die Gegenwart von hKGF-Rezeptoren mittels PCR offenbarte, dass alle Karzinomzelllinien hKGF-Rezeptor-mRNA exprimieren, während Sarkom-Zelllinien dies nicht tun. Die Gegenwart von mRNA bedeutet nicht notwendigerweise, dass hKGF-Rezeptor an der Oberfläche dieser Zellen vorhanden ist. Für hKGF sind nur auf Zellen basierende Tests unter Verwendung von Balb/MK-Keratinozyten (Weissman, Cell 32, 599-606 (1983)) oder mit dem hKGF-Rezeptor transfizierten NIH/3T3-Zellen (Miki, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 246-250 (1992)) beschrieben worden.

SELEX

[0029] Ein Verfahren für die In-vitro-Evolution von Nucleinsäuremolekülen mit hochspezifischer Bindung an Target-Moleküle ist entwickelt worden. Dieses Verfahren, Systematische Evolution von Liganden durch Exponentielle Anreicherung, SELEX genannt, wird in der US-Patentanmeldung mit der Seriennummer 07/714.131, eingereicht am 10. Juni 1991, mit dem Titel „Nucleic Acid Ligands“, nunmehr US-Patent Nr. 5.475.096, US-Patentanmeldung mit der Seriennummer 07/931.473, eingereicht am 17. August 1992, mit dem Titel „Nucleic Acid Ligands“, nunmehr US-Patent Nr. 5.270.163 (siehe auch PCT/US91/04078; WO 91/19813), beschrieben. Jede dieser Anmeldungen, die hierin zusammen als SELEX-Patentanmeldungen bezeichnet werden, beschreibt ein grundlegend neues Verfahren zur Herstellung eines Nucleinsäureliganden für ein beliebiges gewünschtes Target-Molekül.

[0030] Das SELEX-Verfahren umfasst die Selektion aus einem Gemisch von Kandidaten-Oligonucleotiden und die schrittweise Wiederholung von Bindung, Trennung und Amplifikation unter Verwendung desselben allgemeinen Selektionsschemas, um nahezu jedes gewünschte Kriterium von Bindungsaffinität und Selektivität zu erzielen. Beginnend mit einem Gemisch von Nucleinsäuren, das vorzugsweise ein Segment einer randomisierten Sequenz enthält, umfasst das SELEX-Verfahren die folgenden Schritte: Kontaktieren eines Gemischs mit dem Target unter Bedingungen, welche die Bindung begünstigen, Trennen ungebundener Nucleinsäuren von jenen Nucleinsäuren, die spezifisch an Target-Moleküle gebunden haben, Dissoziieren der Nucleinsäure-Target-Komplexe, Amplifizieren der von den Nucleinsäure-Target-Komplexen dissozierten Nucleinsäuren, um ein Liganden-angereichertes Gemisch von Nucleinsäuren zu erlangen, worauf die Schritte der Bindung, Trennung, Dissoziation und Amplifikation wie gewünscht so oft wiederholt werden, bis höchst spezifische, hochaffine Nucleinsäureliganden für das Target-Molekül erhalten werden.

[0031] Das grundlegende SELEX-Verfahren ist modifiziert worden, um eine Reihe von speziellen Zielen zu erreichen. Beispielsweise beschreibt die US-Patentanmeldung mit der Seriennummer 07/960.093 (US 5.475.096), eingereicht am 14. Oktober 1992, mit dem Titel „Method for Selecting Nucleic Acids on the Basis of Structure“ die Verwendung von SELEX in Verbindung mit Gelelektrophorese, um Nucleinsäuremoleküle mit speziellen strukturellen Eigenschaften, wie z.B. bent-DNA, zu selektieren. US-Patentanmeldung mit der Seriennummer 08/123.935 (WO 95/08003), eingereicht am 17. September 1993, mit dem Titel „Photoselection of Nucleic Acid Ligands“ beschreibt ein auf SELEX basierendes Verfahren zur Selektion von Nucleinsäureliganden, die photoreaktive Gruppen enthalten, die zur Bindung und/oder Photovernetzung an und/oder zur Photo-inaktivierung eines Target-Moleküls fähig sind. US-Patentanmeldung mit der Seriennummer 08/134.028 (WO 95/07364), eingereicht am 7. Oktober 1993, mit dem Titel „High-Affinity Nucleic Acid Ligands That Discriminate Between Theophylline and Caffeine“ beschreibt ein „Counter-SELEX“ genanntes Verfahren zur Identifizierung höchst spezifischer Nucleinsäureliganden, die dazu fähig sind, zwischen nahe verwandten Molekülen zu unterscheiden. US-Patentanmeldung mit der Seriennummer 08/143.564 (WO 95/08003), eingereicht am 25. Oktober 1993, mit dem Titel „Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment: Solution SELEX“ beschreibt ein auf SELEX basierendes Verfahren, das eine höchst effiziente Trennung zwischen Oligonucleotiden mit hoher und niedriger Affinität für ein Target-Molekül erzielt. US-Patentanmeldung mit der Seriennummer 07/964.624 (WO 94/08050), eingereicht am 21. Oktober 1992, mit dem Titel „Methods for Producing Nucleic Acid Ligands“ beschreibt Verfahren zum Erlangen besserter Nucleinsäureliganden im Anschluss an die Durchführung von SELEX. US-Patentanmeldung mit der Seriennummer 08/400.440 (WO 96/27605), eingereicht am 8. März 1995, mit dem Titel „Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment: Chemi-SELEX“ beschreibt Verfahren zur kovalenten Bindung eines Liganden an sein Target.

[0032] Das SELEX-Verfahren umfasst die Identifizierung hochaffiner Nucleinsäureliganden, die modifizierte

Nucleotide enthalten, die dem Liganden verbesserte Eigenschaften, wie z.B. verbesserte In-vivo-Stabilität oder verbesserte Abgabeeigenschaften, verleihen. Beispiele derartiger Modifizierungen umfassen chemische Substitutionen an den Ribose- und/oder Phosphat- und/oder Basen-Positionen. Mittels SELEX identifizierte Nucleinsäureliganden, die modifizierte Nucleotide enthalten, werden in der US-Patentanmeldung mit der Seriennummer 08/117.991 (WO 95/07364), eingereicht am 8. September 1993, mit dem Titel „High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides“ beschrieben, die Oligonucleotide beschreibt, die Nucleotidderivate enthalten, die an den 5- und 2'-Positionen von Pyrimidinen chemisch modifiziert sind. US-Patentanmeldung mit der Seriennummer 08/134.028 (WO 95/07364) beschreibt höchst spezifische Nucleinsäureliganden, die ein oder mehrere Nucleotide enthalten, die mit 2'-Amino (2'-NH₂), 2'-Fluor (2'-F) und/oder 2'-O-Methyl (2'-OMe) modifiziert sind. US-Patentanmeldung mit der Seriennummer 08/264.029 (WO 95/35102), eingereicht am 22. Juni 1994, mit dem Titel „Novel Method of Preparation of 2' Modified Pyrimidine Intramolecular Nucleophilic Displacement“ beschreibt Oligonucleotide, die verschiedene 2'-modifizierte Pyrimidine enthalten.

[0033] Das SELEX-Verfahren umfasst das Kombinieren von ausgewählten Oligonucleotiden mit anderen ausgewählten Oligonucleotiden bzw. funktionellen Nicht-Oligonucleotid-Einheiten, wie beschrieben in der US-Patentanmeldung mit der Seriennummer 08/284.063 (US 5.637.459), eingereicht am 2. August 1994, mit dem Titel „Systemic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Chimeric SELEX“ bzw. US-Patentanmeldung mit der Seriennummer 08/234.997 (WO 95/07364), eingereicht am 28. April 1994, mit dem Titel „Systemic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Blended SELEX“. Diese Anwendungen ermöglichen die Kombination des breiten Felds von Formen und anderen Eigenschaften sowie der effizienten Amplifikations- und Replikationseigenschaften von Oligonucleotiden mit den wünschenswerten Eigenschaften anderer Moleküle.

[0034] Jellinek et al. (Inhibition of Receptor Bindung by High-Affinity RNA Ligands to Vascular Endothelial Growth Factor. Biochemistry 33, 10450-10456 (1994)) verwendeten SELEX, um RNA-Liganden zu identifizieren, die an VEGF binden. Trunkierte Liganden aus den sechs identifizierten Ligandenfamilien hemmten die Bindung von [¹²⁵I]VEGF an seine Zelloberflächenrezeptoren.

Kurzzusammenfassung der Erfindung

[0035] Die vorliegende Erfindung umfasst Nucleinsäureliganden für aus Blutplättchen gewonnenem Wachstumsfaktor (PDGF) und homologe Proteine. Unter im Wesentlichen homolog wird ein Ausmaß an Aminosäuresequenzidentität von 70 % oder mehr verstanden. Zum Zwecke dieser Anmeldung bezieht sich PDGF auf PDGF-AA-, -AB- und -BB-Isoformen und homologe Proteine. In der Definition speziell umfasst sind menschliche PDGF-AA-, -AB- und -BB-Isoformen. Insbesondere werden RNA-Sequenzen bereitgestellt, die fähig sind, spezifisch an PDGF zu binden. Außerdem werden ssDNA-Sequenzen bereitgestellt, die fähig sind, spezifisch an PDGF zu binden. Die Erfindung kann die in Tabelle 13 gezeigten RNA-Ligandensequenzen umfassen (Seq.-ID Nr. 128-170). Ebenfalls umfasst sind in der Erfindung ssDNA-Liganden von PDGF, die in den Tabellen 8, 9 und [Fig. 3](#), [Fig. 4](#) und [Fig. 9](#) gezeigt sind (Seq.-ID Nr. 93-124, 171-176). Ebenfalls in dieser Erfindung umfasst sind ssDNA-Liganden von PDGF, die die Funktion von PDGF hemmen, vermutlich durch Hemmung der Wechselwirkung von PDGF mit seinem Rezeptor.

[0036] Ferner wird ein Verfahren zur Identifizierung von Nucleinsäureliganden und Nucleinsäureligandensequenzen gegen ein Target offenbart, das aus der aus TGFβ, PDGF und hKGF bestehenden Gruppe ausgewählt ist, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst: (a) Kontaktieren eines Kandidatgemisches von Nucleinsäuren mit dem Target, (b) Trennung zwischen Elementen des Kandidatgemisches auf Basis von Affinität für das Target und (c) Amplifizieren der selektierten Moleküle, um ein Gemisch von Nucleinsäuren zu liefern, das hinsichtlich Nucleinsäuresequenzen mit einer relativ höheren Affinität für Bindung an das Target angereichert ist.

[0037] Außerdem kann die vorliegende Erfindung die nach dem oben beschriebenen Verfahren identifizierten ssDNA- und RNA-Liganden für PDGF umfassen, einschließlich jene Liganden, die in Tabelle 8 und 13 und in [Fig. 3](#), [Fig. 4](#) und [Fig. 9](#) gezeigt sind (Seq.-ID Nr. 93-124, 128-176). Ebenfalls umfasst sind DNA- und RNA-Liganden für PDGF, die im Wesentlichen homolog zu irgendeinem der vorgegebenen Liganden sind und die im Wesentlichen dieselbe Fähigkeit zur Bindung von PDGF aufweisen. Außerdem sind in dieser Erfindung Nucleinsäureliganden für PDGF umfasst, die im Wesentlichen dieselbe strukturelle Form wie die hierin präsentierten Liganden aufweisen und die im Wesentlichen dieselbe Fähigkeit zur Bindung von PDGF aufweisen.

[0038] Die vorliegende Erfindung umfasst außerdem andere modifizierte Nucleotidsequenzen auf Basis der hierin identifizierten RNA-Liganden und Gemische derselben.

[0039] Ebenfalls offenbart ist ein Verfahren zum Testen einer Testverbindung auf die Fähigkeit zur Hemmung der Wechselwirkung eines Wachstumsfaktors mit seinem plasmamembrangebundenen Rezeptor, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst: (a) Solubilisieren von Zellen, die den plasmamembrangebundenen Rezeptor enthalten; (b) Erzeugen eines Plasmamembranextrakts der Zellen; (c) Umsetzen des Extraks mit markiertem Wachstumsfaktor alleine und in Gegenwart der Testverbindung, wodurch Komplexe gebildet werden; (d) Analysieren der Komplexe durch Elektrophorese unter nativen Bedingungen; (e) Sichtbarmachen der Komplexe durch Bildgebung; und (f) Vergleichen des Bilds des Extraks mit markiertem Wachstumsfaktor alleine, um den Extrakt in Gegenwart der Testverbindung darzustellen, um zu ermitteln, ob die Testverbindung die Wechselwirkung zwischen dem Wachstumsfaktor und seinem plasmamembrangebundenen Rezeptor hemmte.

[0040] Außerdem wird ein Verfahren zum Testen von Zellen offenbart, um zu ermitteln, ob sie einen plasmamembrangebundenen Wachstumsfaktor-Rezeptor exprimieren, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst: (a) Solubilisieren der Zellen; (b) Erzeugen eines Plasmamembranextrakts der Zellen; (c) Umsetzen des Plasmamembranextrakts mit einem markierten Wachstumsfaktor; (d) Analysieren der Reaktion zwischen Plasmamembranextrakt mit dem markierten Wachstumsfaktor durch Elektrophorese unter nativen Bedingungen; (e) Vergleichen der Elektrophorese aus Schritt (d) mit der Elektrophorese von markiertem Wachstumsfaktor; und (e) Sichtbarmachen der Ergebnisse der Elektrophorese, um zu ermitteln, ob ein Komplex mit veränderter Mobilität im Vergleich zur Mobilität eines markierten Wachstumsfaktors alleine gebildet wird.

Kurzbeschreibung der Figuren

[0041] [Fig. 1](#) zeigt die Bindungsanalyse der 40D7-DNA-Bibliothek für TGF β 1. Es sind Bindungsdaten dargestellt, die aus Umlauf 19 (Dreiecke) und Umlauf 0 (Kreise) erlangt wurden.

[0042] [Fig. 2](#) zeigt die Ergebnisse des PAI-Luciferase-Tests von TGF β 1 (10 pM), inkubiert mit Oligonucleotiden (0,1 μ M) oder Anti-TGF β (60 μ g/ml).

[0043] [Fig. 3](#) zeigt die Konsensus-Sekundärstruktur für den in Tabelle 9 gezeigten Satz von Sequenzen. R = A oder G, Y = C oder T, K = G oder T, N und N' bezeichnen ein beliebiges Basenpaar.

[0044] [Fig. 4](#) zeigt die gemäß dem Konsensus-Sekundärstrukturmotiv gefalteten Minimal-Liganden 20t, 36t und 41t. [3'T] stellt ein angefügtes 3'-3'-verbundenes Thymidin-Nucleotid dar, um den 3'-Exonucleaseabbau zu verringern.

[0045] [Fig. 5A](#), [Fig. 5B](#) und [Fig. 5C](#) zeigen die Bindung von hochaffinen Minimal-DNA-Liganden an PDGF-AA, -AB bzw. -BB. Der Anteil von an variierenden Konzentrationen von PDGF gebundenen, 32 P-5'-end-markierten DNA-Liganden wurde durch das Nitrocellulosefilterbindungsverfahren bestimmt. Getestete Minimal-Liganden waren 20t (o), 36t (Δ) und 41t (■). Oligonucleotidkonzentrationen in diesen Experimenten betrugen ~10 pM (PDGF-AB und PDGF-BB) und ~50 pM (PDGF-AA). Datenpunkte wurden an GI. 1 (für die Bindung von DNA-Liganden an PDGF-AA) oder GI. 2 (für die Bindung an PDGF-AB und -BB) unter Verwendung des nicht-linearen Verfahrens der kleinsten Quadrate angepasst. Bindungsreaktionen wurden bei 37 °C in Bindungspuffer (PBSM mit 0,01 % HSA) durchgeführt.

[0046] [Fig. 6](#) zeigt die Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeit für die hochaffine Wechselwirkung zwischen den Minimal-DNA-Liganden und PDGF-AB. Der Anteil der an PDGF-AB (1 nM) gebunden, 5'- 32 P-Ende-markierten Liganden 20t (o) 36t (Δ) und 41t (■), alle bei 0,17 nM, wurde durch Nitrocellulosefilterbindung zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Zugabe eines 500fachen Überschusses des unmarkierten Konkurrenten gemessen. Die Werte der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{off}) wurden durch Anpassen der Datenpunkte an GI. 3 bestimmt. Die Experimente wurden bei 37 °C in Bindungspuffer durchgeführt.

[0047] [Fig. 7](#) zeigt die Wirkung von DNA-Liganden auf die Bindung von 125 I-PDGF-BB und 125 I-PDGF-AA an in PAE-Zellen exprimierte PDGF-a-Rezeptoren.

[0048] [Fig. 8](#) zeigt die Wirkung von DNA-Liganden auf die mitogene Wirkung von PDGF-BB an PAE-Zellen, die die PDGF β -Rezeptoren exprimieren.

[0049] [Fig. 9](#) zeigt das 2'-O-Methyl-2'-desoxy- und 2'-Fluor-2'-desoxyribonucleotid-Substitutionsmuster, das mit hochaffiner Bindung an PDGF-AB kompatibel ist. Unterstrichene Symbole bezeichnen 2'-O-Methyl-2'-desoxynucleotide; kursive Symbole bezeichnen 2'-Fluor-2'-desoxynucleotide; normale Schrift bezeichnet 2'-Des-

oxyribonucleotide; [3'T] bezeichnet invertiert ausgerichtetes (3'3') Thymidin-Nucleotid (Glen Research, Sterling, VA); PEG in den Schleifen der Helices II und III bezeichnet Pentaethylenglykol-Spacer-Phosphoramidit (Glen Research, Sterling, VA).

[0050] [Fig. 10A](#) zeigt die Sättigungsbindung von radiomarkiertem hKGF an der Oberfläche der PC-3-Zellen. TB (Gesamtbinding) ist die in Abwesenheit von konkurrierendem unmarkiertem hKGF beobachtete Bindung, wogegen NSB (nicht-spezifische Bindung) die in Gegenwart eines 100fachen molaren Überschusses an unmarkiertem hKGF beobachtete Bindung ist. SB (spezifische Bindung) demonstriert spezifische Bindung, und diese Kurve wurde durch Subtrahieren der NSB-Kurve von der TB-Kurve hergeleitet. [Fig. 10B](#) ist die Scatchard-Analyse der in [Fig. 10A](#) gezeigten Datenpunkte für die SB-Kurve.

[0051] [Fig. 11](#) zeigt die Verschiebung der elektrophoretischen Mobilität aufgrund von Plasmamembranextrakten aus PC-3-Zellen. In Bahnen 1-8 wurden die Membranextrakte mit verschiedenen Konzentrationen an radiomarkiertem hKGF wie unter jeder Bahn dargestellt umgesetzt. Zusätzlich zum radiomarkierten hKGF (wie unter jeder Bahn dargestellt) war für Bahnen 9-12 ein 100facher molarer Überschuss von unmarkiertem hKGF enthalten. C1 und C2 stellen zwei beobachtete Komplexe aufgrund der Gegenwart von hKGF-bindenden Gruppierungen in den PC-3-Plasmamembranextrakten dar.

[0052] [Fig. 12A-D](#) zeigen die vorgeschlagene Angleichung von 2'F- und 2'NH₂-Liganden. Kursiv gedruckte Sequenzreste in Kleinbuchstaben bezeichnen die konstante Region des Templaats. In der Konsensussequenz werden Groß- und Kleinbuchstaben für Reste verwendet, die sich in mehr als oder gleich 80 % bzw. 60 % der Elemente jeder Familie finden. K_d- und K_i-Werte sind neben der Bezeichnung jedes Liganden ebenfalls angegeben. Die hier gezeigten K_i-Werte wurden unter Verwendung der Formel K_i = IC50/(1 + (C/K_d)) berechnet, wobei IC50 die in Beispiel 16 beschriebene gemessene halbmaximale Hemmkonzentration jedes Liganden im PC-3-Zelltest ist; C die Konzentration von ¹²⁵I-KGF ist; und K_d die Gleichgewichtsdissoziationskonstante von KGF für seinen Rezeptor ist (ungefähr 150 pM). Die mit Sternchen markierten Liganden zeigen biphasische Bindungskurven.

[0053] [Fig. 12A](#) und [Fig. 12B](#) zeigen die vorgeschlagene Angleichung von 2'F-Liganden. Der Großteil der 2'F-Liganden kann zu Pseudoknotenstrukturen gefaltet werden. Zwei Klassen werden wie dargestellt vorgeschlagen. Die Summenstruktur für jede Klasse ist ebenfalls gezeigt. An Stamm 1 (S1) beteiligte Basen sind mit einer einfachen Linie unterstrichen, während Basen von Stamm 2 (S2) mit Doppellinien unterstrichen sind. Lücken wurden zur Angleichung der verschiedenen Elemente der Pseudoknoten eingeführt.

[0054] [Fig. 12C](#) und [Fig. 12D](#) zeigen die vorgeschlagene Faltung von 2'NH₂-Liganden. Diese Liganden werden zwei Klassen zugeordnet. Wie in den Summenstrukturen dargestellt, können Liganden der Klasse 1 und 2 eine Bäumchen- bzw. Hantelstruktur ausbilden. Lücken wurden eingeführt, um die Sequenzangleichung zu ermöglichen. An den Stämmen teilnehmende Reste sind unterstrichen. In den Summenstrukturen bezeichnen Punkte (.) eine variable Anzahl von Resten. Liganden 2N und 54N sind zirkuläre Permutationen derselben Hantelstruktur. Zur Angleichung der entsprechenden Schleifen sind diese Liganden um zwei Linien gewickelt.

[0055] [Fig. 13](#) zeigt die minimale Sequenzanforderung für die Bindung der Liganden 6F und 14F an hKGF. Die vorhergesagte Faltung jedes Liganden ist dargestellt. Konstante Regionen der Liganden sind in Kleinbuchstaben dargestellt. Konservierte Sequenzen sind unterstrichen. Kreise und Dreiecke markieren die 3'-Enden von aktiven bzw. inaktiven Verkürzungen.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0056] Diese Anmeldung beschreibt Hochaffinitäts-Nucleinsäureliganden für TGFβ, PDGF und hKGF, die durch das als SELEX bekannte Verfahren identifiziert wurden. SELEX wird beschrieben in der US-Patentanmeldung mit der Seriennummer 07/714.131 (US 5.475.096), eingereicht am 10. Juni 1991, mit dem Titel „Nucleic Acid Ligands“, US-Patentanmeldung mit der Seriennummer 07/931.473, eingereicht am 17. August 1992, mit dem Titel „Nucleic Acid Ligands“, nunmehr US-Patent Nr. 5.270.163 (siehe auch PCT/US91/04078; WO 91/19813). Diese Anmeldungen werden zusammen SELEX-Patentanmeldungen genannt.

[0057] In seiner grundlegenden Form kann der SELEX-Prozess durch die folgende Reihe von Schritten definiert werden:

- 1) Ein Kandidatgemisch von Nucleinsäuren unterschiedlicher Sequenz wird hergestellt. Das Kandidatgemisch umfasst im Allgemeinen Regionen festgelegter Sequenzen (d.h. jedes der Elemente des Kandidatgemisches enthält dieselben Sequenzen an derselben Stelle) und Regionen randomisierter Sequenzen. Die

festgelegten Sequenzregionen werden ausgewählt, um entweder (a) die unten beschriebenen Amplifikationsschritte zu unterstützen, (b) eine Sequenz nachzuahmen, die bekanntermaßen an das Target bindet, oder (c) die Konzentration einer gegebenen strukturellen Anordnung von Nucleinsäuren im Kandidatgemisch zu erhöhen. Die randomisierten Sequenzen können völlig randomisiert (d.h. dass die Wahrscheinlichkeit des Auffindens einer Base an jeder Position Eins zu Vier beträgt) oder nur teilweise randomisiert sein (d.h. dass die Wahrscheinlichkeit des Auffindens einer Base in jeder Höhe zwischen 0 und 100 % gewählt werden kann).

2) Das Kandidatgemisch wird mit dem gewählten Target unter Bedingungen kontaktiert, die für die Bindung zwischen dem Target und Elementen des Kandidatgemischs günstig sind. Unter diesen Umständen kann angenommen werden, dass die Wechselwirkung zwischen dem Target und den Nucleinsäuren des Kandidatgemischs Nucleinsäure-Target-Paare zwischen dem Target und jenen Nucleinsäuren bildet, die die stärkste Affinität für das Target aufweisen.

3) Die Nucleinsäuren mit der höchsten Affinität für das Target werden von jenen Nucleinsäuren mit niedrigerer Affinität für das Target getrennt. Da nur eine extrem kleine Anzahl von Sequenzen (und möglicherweise nur ein Molekül von Nucleinsäure), die den Nucleinsäuren mit der höchsten Affinität entsprechen, im Kandidatgemisch existieren, ist es im Allgemeinen wünschenswert, die Trennkriterien so zu wählen, dass eine signifikante Menge der Nucleinsäuren im Kandidatgemisch (etwa 5-50 %) während der Trennung zurückgehalten wird.

4) Jene Nucleinsäuren, die bei der Trennung als eine relativ höhere Affinität für das Target aufweisend selektiert werden, werden dann amplifiziert, um ein neues Kandidatgemisch zu erzeugen, dass an Nucleinsäuren angereichert ist, die eine relativ höhere Affinität für das Target aufweisen.

5) Durch Wiederholen der obigen Trenn- und Amplifikationsschritte enthält das neu gebildete Kandidatgemisch weniger und weniger schwach bindende Sequenzen, und das mittlere Ausmaß an Affinität der Nucleinsäuren für das Target wird im Allgemeinen ansteigen. Im Extremfall wird der SELEX-Prozess ein Kandidatgemisch liefern, das eine oder eine kleine Anzahl an einzigartigen Nucleinsäuren enthält, die jene Nucleinsäuren aus dem ursprünglichen Kandidatgemisch darstellen, die die höchste Affinität für das Targetmolekül aufweisen.

[0058] Die SELEX-Patentanmeldungen beschreiben diesen Prozess und arbeiten ihn bis ins Einzelne aus. Umfasst sind Targets, die in diesem Prozess verwendet werden können; Verfahren zur Trennung von Nucleinsäuren in einem Kandidatgemisch; und Verfahren zur Amplifikation von getrennten Nucleinsäuren, um ein angereichertes Kandidatgemisch zu erzeugen. Die SELEX-Patentanmeldungen beschreiben außerdem Liganden, die für eine Reihe von Target-Spezies erlangt wurden, einschließlich Protein-Targets, wo das Protein ein oder kein Nucleinsäure-bindendes Protein ist.

[0059] Die hierin beschriebenen Nucleinsäureliganden können mit einer lipophilen Verbindung (z.B. Cholesterin) komplexiert oder an einen Komplex angebunden oder in einen Komplex verpackelt werden, der aus lipophilen Komponenten besteht (z.B. ein Liposom). Die komplexierten Nucleinsäureliganden können die Zellaufnahme der Nucleinsäureliganden durch eine Zelle zur Abgabe der Nucleinsäureliganden an ein intracelluläres Target verstärken. Die US-Patentanmeldung Nr. 08/434.465 (WO 96/34876), eingereicht am 4. Mai 1995, mit dem Titel „Nucleic Acid Ligand Complexes“ beschreibt ein Verfahren zur Herstellung eines therapeutischen oder diagnostischen Komplexes, der aus einem Nucleinsäureliganden und einer lipophilen Verbindung oder einer nicht-immunogenen Verbindung mit hohem Molekulargewicht zusammengesetzt ist.

[0060] Die hierin beschriebenen Verfahren und die durch derartige Verfahren identifizierten Nucleinsäureliganden sind für therapeutische sowie diagnostische Zwecke brauchbar. Therapeutische Verwendungen umfassen die Behandlung oder Prävention von Krankheiten oder medizinischen Konditionen bei menschlichen Patienten. Diagnostische Verwendung kann sowohl In-vivo- als auch In-vitro-Diagnoseanwendungen umfassen. Das SELEX-Verfahren im Allgemeinen und die speziellen Anpassungen des hierin gelehrt und beanspruchten SELEX-Verfahrens im Speziellen sind insbesondere für Diagnoseanwendungen geeignet. SELEX identifiziert Nucleinsäureliganden, die fähig sind, an Targets mit hoher Affinität und mit überraschender Spezifität zu binden. Diese Eigenschaften sind selbstverständlich erwünschte Eigenschaften, die ein Fachmann auf dem Gebiet der Erfindung bei einem diagnostischen Liganden üblicherweise anstrebt.

[0061] Die Nucleinsäureliganden der vorliegenden Erfindung können routinemäßig für diagnostische Zwecke gemäß einer beliebigen Anzahl von Techniken angepasst werden, die vom Fachmann auf dem Gebiet der Erfindung eingesetzt werden. Diagnosemittel müssen lediglich in der Lage sein, es dem Anwender zu ermöglichen, die Gegenwart eines gegebenen Targets an einem bestimmten Ort oder in einer bestimmten Konzentration festzustellen. Lediglich die Fähigkeit zur Bildung von Bindungspaarern mit dem Target kann ausreichen, um ein positives Signal für diagnostische Zwecke auszulösen. Außerdem ist der Fachmann auf dem Gebiet

der Erfindung üblicherweise in der Lage, jeglichen Nucleinsäureliganden durch auf dem Gebiet der Erfindung bekannte Verfahren anzupassen, so dass er einen Marker enthält, um die Gegenwart eines derartigen Liganden zu verfolgen. Ein derartiger Marker könnte in einer Reihe von diagnostischen Verfahren verwendet werden. Die hierin beschriebenen Nucleinsäureliganden können speziell zur Identifizierung der TGFβ-, PDGF- und hKGF-Proteine verwendet werden.

[0062] SELEX stellt hochaffine Liganden eines Target-Moleküls bereit. Dies stellt eine außerordentliche Errungenschaft dar, die auf dem Gebiet der Nucleinsäureforschung beispiellos ist. Diese Offenbarung wendet das SELEX-Verfahren auf die speziellen Targets TGFβ, PDGF und hKGF an. Im unten stehenden Beispiele-Abschnitt werden die zur Isolierung und Identifizierung der Nucleinsäureliganden für TGFβ, PDGF und hKGF verwendeten experimentellen Parameter beschrieben.

[0063] Um zur Verwendung als Pharmazeutikum wünschenswerte Nucleinsäuren herzustellen, wird bevorzugt, dass der Nucleinsäureligand (1) an das Target auf eine Weise bindet, die zur Erzielung der gewünschten Wirkung auf das Target tauglich ist; (2) so klein wie möglich ist, um die gewünschte Wirkung zu erzielen; (3) so stabil wie möglich ist; und (4) ein spezifischer Ligand für das gewählte Target ist. Unter den meisten Gegebenheiten ist es bevorzugt, dass der Nucleinsäureligand die höchstmögliche Affinität für das Target aufweist.

[0064] In der ebenfalls anhängigen und gemeinsam abgetretenen US-Patentanmeldung mit der Seriennummer 07/964.624, eingereicht am 21. Oktober 1992 ('624), nunmehr US-Patent Nr. 5.496.938, werden Verfahren zur Erlangung verbesserter Nucleinsäureliganden beschrieben, nachdem SELEX durchgeführt worden ist. Die '624-Anmeldung mit dem Titel „Methods of Producing Nucleic Acid Ligands“ ist hierin ausdrücklich durch Verweis aufgenommen. Außerdem sind in diesem Patent Verfahren zur Ermittlung der dreidimensionalen Struktur von Nucleinsäureliganden umfasst. Derartige Verfahren umfassen mathematische Modellierung und Strukturmodifizierungen der SELEX-hergeleiteten Liganden, wie z.B. chemische Modifizierung und Nucleotidsubstitution.

[0065] In dieser Offenbarung wurden SELEX-Experimente durchgeführt, um RNA- und DNA-Liganden mit spezifischer hoher Affinität für TGFβ1 aus degenerierten Bibliotheken zu identifizieren, die 40 oder 60 Zufallspositionen (40N oder 60N) enthalten (Tabellen 1 und 5). Diese Offenbarung umfasst spezifische RNA-Liganden für TGFβ1, die in Tabelle 3 (Seq.-ID Nr. 12-42) gezeigt sind und durch in den Beispielen 1 und 2 beschriebene Methoden identifiziert worden sind. Diese Offenbarung umfasst außerdem RNA-Liganden für TGFβ, die die TGFβ1-Funktion vermutlich durch Hemmung der Wechselwirkung von TGFβ1 mit seinem Rezeptor hemmen. Diese Offenbarung umfasst die spezifischen, in Tabelle 6 (Seq.-ID Nr. 55-89) gezeigten ssDNA-Liganden für TGFβ1, die durch die in den Beispielen 5 und 6 beschriebenen Verfahren identifiziert worden sind.

[0066] In der vorliegenden Erfindung wurden zwei SELEX-Experimente außerdem durchgeführt, um ssDNA und RNA mit spezifischer hoher Affinität für PDGF aus degenerierten Bibliotheken zu identifizieren, die 40 bzw. 50 (40N bzw. 50N) Zufallspositionen enthalten (Tabellen 7 und 12). Diese Erfindung kann die in Tabellen 8, 9 und 13 und [Fig. 3](#), [Fig. 4](#) und [Fig. 9](#) (Seq.-ID Nr. 93-124, 128-176) gezeigten spezifischen ssDNA- und RNA-Liganden für PDGF umfassen, die durch die in den Beispielen 7 und 15 beschriebenen Verfahren identifiziert worden sind.

[0067] In dieser Offenbarung wurde außerdem ein SELEX-Experiment durchgeführt, um RNA-Liganden mit spezifischer hoher Affinität für hKGF aus degenerierten Bibliotheken aufzufinden, die 40 Zufallspositionen (40N) enthalten (Tabelle 14). Diese Offenbarung umfasst die in Tabellen 16 und 23 (Seq.-ID Nr. 189-262, 272-304) gezeigten spezifischen RNA-Liganden für hKGF, die durch die in den Beispielen 16 und 17 beschriebenen Verfahren identifiziert worden sind. Diese Offenbarung umfasst außerdem RNA-Liganden für hKGF, die die Wechselwirkung von hKGF mit seinem Rezeptor hemmen.

[0068] Der Schutzmfang der von dieser Erfindung umfassten Liganden erstreckt sich auf alle Nucleinsäureliganden von PDGF, modifizierte oder unmodifizierte, wie sie in den Ansprüchen definiert sind, sowie vorzugsweise jene, die gemäß dem SELEX-Verfahren identifiziert wurden. Im Spezielleren umfasst diese Erfindung Nucleinsäuresequenzen, die im Wesentlichen homolog zu den in Tabellen 8, 9, 13 und [Fig. 3](#), [Fig. 4](#) und [Fig. 9](#) (Seq.-ID Nr. 93-124, 128-176) gezeigten Liganden sind. Unter im Wesentlichen homolog wird ein Ausmaß an Primärsequenzhomologie von mehr als 70 %, insbesondere bevorzugt mehr als 80 %, verstanden. Ein Überblick der Sequenzhomologien der in Tabellen 3 und 6 (Seq.-ID Nr. 12-42, 55-89) für TGFβ, Tabellen 8 und 13 (Seq.-ID Nr. 93-124, 128-170) für PDGF und Tabellen 16 und 23 (Seq.-ID Nr. 189-262, 272-304) für hKGF gezeigten Nucleinsäureliganden zeigt, dass Sequenzen mit geringer oder keiner Primärhomologie im Wesentlichen dieselbe Fähigkeit zur Bindung eines gegebenen Targets aufweisen können. Aus diesen Gründen kann

diese Erfindung auch Nucleinsäureliganden umfassen, die im Wesentlichen dieselbe Struktur und Fähigkeit zur Bindung von PDGF wie die in Tabellen 8, 9, 13 und [Fig. 3](#), [Fig. 4](#) und [Fig. 9](#) (Seq.-ID Nr. 93-124, 128-176) gezeigten Nucleinsäureliganden aufweisen. Im Wesentlichen dieselbe Struktur für PDGF umfasst alle Nucleinsäureliganden, die die in [Fig. 3](#) gezeigten gemeinsamen Strukturelemente aufweisen, die zur Affinität für PDGF führen. Im Wesentlichen dieselbe Fähigkeit zur Bindung von PDGF bedeutet, dass sich die Affinität innerhalb einer oder zwei Größenordnungen der Affinität der hierin beschriebenen Liganden befindet. Es liegt im Ermessen des Fachmanns auf dem Gebiet der Erfindung, zu ermitteln, ob eine gegebene Sequenz – die im Wesentlichen homolog zu den hierin im Speziellen beschriebenen ist – im Wesentlichen dieselbe Fähigkeit zur Bindung von PDGF aufweist.

[0069] Diese Erfindung umfasst außerdem die oben beschriebenen Liganden, worin gewisse chemische Modifizierungen vorgenommen werden, um die In-vivo-Stabilität des Liganden zu erhöhen oder die Abgabe des Liganden zu steigern oder zu vermitteln. Beispiele derartiger Modifizierungen umfassen chemische Substitutionen an den Zucker- und/oder Phosphat- und/oder Basenpositionen einer gegebenen Nucleinsäuresequenz. Siehe z.B. US-Patentanmeldung mit der Seriennummer 08/117.991 (WO 95/07364), eingereicht am 9. September 1993, mit dem Titel „High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides“, die hierin ausdrücklich durch Verweis aufgenommen ist. Andere Modifizierungen sind dem Fachmann auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Derartige Modifizierungen können im Anschluss an SELEX (Modifizierung von vorher identifizierten modifizierten oder unmodifizierten Liganden) oder durch Einbindung in das SELEX-Verfahren vorgenommen werden.

[0070] Beispiel 20 beschreibt die Modifizierung eines Nucleinsäureliganden für basischen Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) im Anschluss an das SELEX-Verfahren. Der Nucleinsäureligand wurde durch Anfügen von Thiophosphat-Kappen und Substitution mehrerer Ribopurine mit 2'-Desoxy-2'-O-methylpurinen modifiziert.

[0071] Wie oben beschrieben, sind die hierin beschriebenen Nucleinsäureliganden für TGF β , PDGF und hKGF aufgrund ihrer Fähigkeit, TGF β , PDGF und hKGF selektiv zu binden, als Pharmazeutika zweckdienlich. Diese Erfindung umfasst daher auch die Verwendung eines hierin beschriebenen PDGF-Nucleinsäureliganden bei der Herstellung eines Medikaments zur Verwendung bei der Behandlung von PDGF-vermittelten pathologischen Zuständen durch Verabreichung eines Nucleinsäureliganden, der zur Bindung an PDGF fähig ist.

[0072] Therapeutische Zusammensetzungen der Nucleinsäureliganden können parenteral durch Injektion verabreicht werden, obgleich andere wirksame Verabreichungsformen, wie z.B. intraartikuläre Injektion, Inhalationsnebel, oral aktive Formulierungen, transdermale Iontophorese oder Suppositorien ebenfalls vorgesehen sind. Einer der bevorzugten Träger ist physiologische Salzlösung, jedoch ist vorgesehen, dass andere pharmazeutisch annehmbare Träger ebenfalls verwendet werden können. In einer der bevorzugten Ausführungsformen ist vorgesehen, dass Träger und Ligand eine physiologisch annehmbare Formulierung mit langsamer Freisetzung bilden. Das primäre Lösungsmittel in einem derartigen Träger kann entweder wässriger oder nicht-wässriger Natur sein. Außerdem kann der Träger andere pharmakologisch annehmbare Exzipienten zur Modifizierung oder Erhaltung von pH, Osmolarität, Viskosität, Durchsichtigkeit, Farbe, Sterilität, Stabilität, Auslösungsgeschwindigkeit oder Geruch der Formulierung enthalten. Gleichermaßen kann der Träger noch weitere pharmakologisch annehmbare Exzipienten zur Modifizierung oder Erhaltung der Stabilität, Geschwindigkeit der Auflösung, Freisetzung oder Absorption des Liganden enthalten. Derartige Exzipienten sind jene Substanzen, die üblicherweise und herkömmlicherweise eingesetzt werden, um Dosierungen für parenterale Verabreichung entweder in Einheitsdosis oder Mehrfachdosisform zu formulieren.

[0073] Sobald die therapeutische Zusammensetzung formuliert worden ist, kann sie in sterilen Fläschchen als Lösung, Suspension, Gel, Emulsion, Feststoff oder entwässertes oder lyophilisiertes Pulver gelagert werden. Derartige Formulierungen können entweder als gebrauchsfertige Form gelagert werden oder die Rekonstitution unmittelbar vor der Verabreichung erfordern. Die Art und Weise der Verabreichung von Formulierungen, die Nucleinsäureliganden für systemische Abgabe enthalten, kann über subkutane, intramuskuläre, intravenöse, intranasale oder vaginale oder rektale Suppositorien erfolgen.

[0074] Die folgenden Beispiele werden bereitgestellt, um die vorliegende Erfindung zu erklären und zu illustrieren und beabsichtigen nicht die Einschränkung der Erfindung. Beispiele 1-4 beschreiben anfängliche Experimente, um RNA mit spezifischer Affinität für TGF β 1 zu identifizieren. Beispiel 1 beschreibt die verschiedenen Materialien und experimentellen Verfahren, die in den Beispielen 2-4 verwendet werden. Beispiel 2 beschreibt ein typisches Verfahren zur Identifizierung von RNA-Liganden durch das SELEX-Verfahren, die TGF β 1 binden. Beispiel 3 beschreibt die Affinitäten, die die Liganden für TGF β 1 aufweisen, und zeigt, dass die Liganden fähig

sind, die Funktion von TGF β 1, vermutlich durch Hemmen der Wechselwirkung von TGF β 1 mit seinem Rezeptor, zu hemmen. Beispiel 4 beschreibt, von welchen Regionen der Liganden angenommen wird, dass sie zur TGF β 1-Bindung und Hemmung von TGF β 1-Rezeptorbindung notwendig sind. Beispiel 5 beschreibt ein weiteres typisches Verfahren zur Identifizierung von RNA- und DNA-Liganden durch das SELEX-V erfahren, die TGF β 1 binden. Beispiel 6 berichtet über Bindungsanalyse, Biote st und Sequenzen einer ssDNA-SELEX-Bibliothek. Beispiel 7 beschreibt die verschiedenen Materialien und experimentellen Verfahren, die zur Evolution der in den Beispielen 8-13 beschriebenen ssDNA-Liganden für PDGF verwendet werden. Beispiel 8 beschreibt die ssDNA-Liganden für PDGF und die vorhergesagte Sekundärstruktur ausgewählter Nucleinsäureliganden. Beispiel 9 beschreibt die Minimalsequenz, die zur Bindung mit hoher Affinität notwendig ist. Beispiel 10 beschreibt die kinetische Stabilität von PDGF-Nucleinsäureligand-Komplexen. Beispiel 11 beschreibt die thermischen Schmelzeigenschaften für ausgewählte Liganden. Beispiel 12 beschreibt die Photovernetzung von Nucleinsäureliganden und PDGF. Beispiel 13 beschreibt die Hemmung von PDGF-Isoformen auf kultivierten Zellen durch DNA-Liganden und die Hemmung der mitogenen Wirkungen von PDGF in Zellen durch DNA-Liganden. Beispiel 14 beschreibt die Modifizierung von Nucleinsäureliganden für PDGF mit modifizierten Nucleotiden. Beispiel 15 beschreibt die bei der Evolution von RNA-Liganden für PDGF verwendeten experimentellen Verfahren und zeigt die Ligandensequenzen. Beispiel 16 beschreibt die bei der Evolution der in den Beispielen 17-19 beschriebenen Nucleinsäureliganden für hKGF verwendeten verschiedenen Materialien und experimentellen Verfahren. Beispiel 17 beschreibt die RNA-Liganden für hKGF, die Affinitäten, die diese Liganden für hKGF aufweisen, und die Spezifität der RNA-Liganden für hKGF. Beispiel 18 beschreibt die Hemmung der hKGF-Bindung an Zelloberflächenrezeptoren. Beispiel 19 berichtet über die Hemmung der mitogenen Aktivität von hKGF durch einen ausgewählten Liganden. Beispiel 20 beschreibt die Modifizierung von Nucleinsäureliganden für bFGF mit 2'-Desoxy-2'-O-methylpurinen.

BEISPIELE

BEISPIEL 1. EXPERIMENTELLE VERFAHREN

[0075] Dieses Beispiel stellt die allgemeinen Verfahren bereit, die in den Beispielen 2-4 befolgt werden und enthalten sind.

A. Materialien

[0076] Bei diesem SELEX-Verfahren verwendetes menschliches rekombinantes TGF β 1 wurde von Genentech erworben. Menschliches rekombinantes TGF β 1 kann außerdem von R&D Systems, Minneapolis, MN, USA, erworben werden.

[0077] Biotinyliertes TGF β 1 wurde hergestellt, indem 3,6 μ M TGF β 1 mit einem 11fachen molaren Überschuss an Sulfo-NHS-Biotin (Pierce, Rockford, IL, USA) in 50 mM NaHCO₃ 3 Stunden lang in einem Eisbad umgesetzt wurde. Die Reaktion wurde mit 0,036 Volumenanteilen 10 % Essigsäure angesäuert und auf eine 40-mg-Vydac-Umkehrphasensäule (The Separations Group, Hesperia, CA, USA) aufgegeben, die in einer silikonisierten Pipettenspitze hergestellt wurde, um unreaktiertes Biotin vom biotinylierten TGF β 1 zu trennen. Die Säule wurde mit 200 μ l Ethanol vorgewaschen, gefolgt von 200 μ l 1 % Essigsäure, es wurde die Biotinylierungsreaktion aufgegeben, freies Biotin mit 200 μ l 50 mM Natriumacetat, pH 5,5, gefolgt von 200 μ l 20 % Acetonitril ausgewaschen und schließlich mit 200 μ l 60 % Acetonitril eluiert. Die Probe wurde lyophilisiert und in 50 mM Natriumacetat, pH 5,0, in einer Konzentration von 40 μ M resuspendiert und bei 4 °C gelagert. Das TGF β 1 wurde mit 100.000 cpm iodiertem TGF β 1 versetzt, um die Gewinnung zu verfolgen und den Erfolg der Biotinylierungsreaktion durch Messen des Anteils der Radioaktivität zu beurteilen, der vor und nach Biotinylierung an Streptavidin-beschichtete Agaroseperlen (Pierce) bindet. Eine Aliquote des TGF β 1 vor und nach Biotinylierung wurde der analytischen Umkehrphasenchromatographie unterzogen. Das biotinierte TGF β 1 lief im Wesentlichen als einzelner Peak, der in Bezug auf unbiotinyliertes TGF β verzögert war. Eine kleine Menge (5 %) unreaktiertes TGF β 1 war nachweisbar. Die Effizienz der Bindung des iodierten, biotinylierten TGF β 1 an Streptavidin-(SA)-Agaroseperlen (30 μ l) betrug 30 % unter den für die SELEX-Trennung verwendeten Bedingungen.

[0078] Iodiertes TGF β 1 wurde mittels Lactoperoxidase-Verfahren (50 mM Natriumphosphat, pH 7,3, 0,16 % Glucose) mit BioRad-Enzymo-Beads (BioRad, Richmond, CA, USA) hergestellt und das gebundene Iod vom freien Iod durch Gelfiltration an G25-Sephadex in 50 mM Natriumacetat, 0,01 % Tween abgetrennt.

[0079] Die das Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle des PAI-1-Promotors exprimierende Herz-Lungenzelllinie (Abe et al., Anal. Biochem. 216, 276-284 (1994)) war eine Schenkung von Dr. Dan Rifkin (Department of Cell Biology, New York Medical Center, New York, New York 10016). Luciferase wurde mittels Reagenzien

getestet, die vom Analytical Luminescence Laboratory, San Diego, CA, USA, erworben wurden.

[0080] 2'-NH₂-modifiziertes CTP und UTP wurden nach dem Verfahren von Pieken et al., Science 253, 314-317 (1991), hergestellt. DNA-Oligonucleotide wurden unter Anwendung von Standardverfahren entweder bei NeXstar Pharmaceuticals, Inc. (Boulder, CO, USA) oder durch Operon Technologies (Alameda, CA, USA) synthetisiert. Alle anderen Reagenzien und Chemikalien wurden von standardmäßigen Handelsquellen erworben, und die Quellen sind angegeben.

B. SELEX-Verfahren

[0081] SELEX-Liganden, die an TGFβ1 binden, wurden im Wesentlichen wie im US-Patent Nr. 5.270.163 beschrieben erlangt (siehe auch Tuerk und Gold, Science 249, 505-510 (1990)). Um den Ausgangspool des PCR-Templats zu erzeugen, wurde PCR-Produkt aus zwanzig gesonderten PCR-Reaktionen, die jeweils 16,1 pmol ungereinigte, einzelsträngige DNA (zumindest insgesamt 2×10^{12} bis 2×10^{13} verschiedene Moleküle) enthielten, vor der ersten Transkription gepoolt. PCR-Bedingungen waren 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9, 0,1 % Triton-X100, 1,5 mM MgCl₂, jeweils 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 2 μM jedes Primers und 0,075 Units/μl Taq-DNA-Polymerase, 100 μl je Reaktion in einem silikonisierten Mikrozentrifugenröhren. Alle PCR-Zyklen machten sich den „Hot-Start“ unter Verwendung von Ampliwax (Perk und Elmer, Norwalk, CN, USA) zunutze. Die Dauer der anfänglichen PCR betrug 10 Zyklen: Ein PCR-Zyklus war 94 °C – 1', 52 °C – 1', 72 °C – 2'. Eine anfängliche Denaturierung war 94 °C 4' lang und die abschließende Extension bei 72 °C 5' lang. Die PCR-Reaktionen wurden kombiniert, mittels Phenol/Chloroform extrahiert und mittels Isopropanol (2,0 M Ammoniumacetat, 50 Isopropanol) präzipitiert, um Primer zu entfernen.

[0082] Transkriptionsreaktionen enthielten 200 nM DNA, 0,9 mM GTP, 0,9 mM 2'-NH₂-UTP, 0,9 mM 2'-NH₂-CTP, 0,5 mM ATP, 87 mM Tris-HCl, pH 8,0, 17 mM MgCl₂, 4,4 mM Spermidin, 22 mM DTT, 100 μg/ml acetyliertes BSA (Promega, Madison, WI, USA) und 4 Units/μl T7-RNA-Polymerase. (2'-F-UTP und 2'-F-CTP (United States Biochemical, Cleveland, OH, USA) wurden bei 3,0 mM verwendet, wogegen UTP und CTP bei jeweils 0,9 mM verwendet wurden.) Die Transkriptionsreaktionen wurden über Nacht bei 28 °C (zumindest 10 Stunden lang) inkubiert. Nach der Transkription wurde das Templat durch Zugabe von 2 μl RQ1-Dnase (Promega) 15' lang bei 28 °C verdaut und dann mit Phenol/CHCl₃ extrahiert, gefolgt von drei Ethanolpräzipitationen aus Ammoniumacetat (3,9 M Ammoniumacetat, 72 % Ethanol).

[0083] Die RNA-Moleküle wurden mit TGFβ1, das wie unten beschrieben an SA-Agaroseperlen gebunden war, in Krebs-Ringer-Lösung (KR) (120 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 10 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,4, 1,2 mM MgSO₄, 2,6 mM CaCl₂) inkubiert, die so modifiziert war, dass sie 20 mM Na-Hepes, pH 7,5 und 0,2 % Triton X100 (Pierce) enthielt. Dieser Puffer wird als KRHT bezeichnet.

[0084] TGFβ1-RNA-Komplexe wurden von ungebundener RNA durch Waschen der Perlen getrennt. Die Gewinnung der selektierten 2'-NH₂- oder F-Pyrimidin-modifizierten RNA aus den Agaroseperlen erforderte eine Guanidin-Thiocyanat-Extraktion (5 M GnSCN, 10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,0, 0,1 M Beta-Mercaptoethanol) oder 2 % SDS (0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 2 % SDS, 1,5 mM DTT) aus Seradyne-SA-beschichteten Perlen. Normale 2'-OH-RNA wurde leicht unter weniger drastischen Bedingungen mit demselben Puffer gewonnen, der für die Seradyne-Perlen verwendet wurde und nur 0,2 % SDS enthielt. Nach Extraktion und Präzipitation zur Reinigung und Konzentrierung der RNA wurde die Probe mit einer klonierten MMLV-RT mit deletierter RNase-H-Sequenz revers transkribiert. Die Reaktion enthielt weniger als oder gleich 16 nM RNA, 10 μM 3'-Primer, 50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 75 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM dNTP's. Vor der Zugabe von Puffer wurden die RNA und der Primer zusammen aufgekocht. Nach Zugabe von Puffer und Salzen wurde die Reaktion vor Zugabe von 600 Units Superscript-reverse-Transkriptase (Bethesda Research Labs, Gaithersburg, MD, USA) und einstündiger Synthese bei 50 °C 10 Minuten lang bei 28 °C annealiert.

[0085] Die PCR-Amplifikation dieser cDNA (< 1 pmol) resultierte in etwa 250 pmol doppelsträngiger DNA, und davon wurden 40 pmol transkribiert und verwendet, um den nächsten SELEX-Umlauf zu beginnen.

C. Trennungsverfahren für SELEX

[0086] 2,5 pmol biotinyliertes TGFβ1 wurden an 30 μl SA-Agaroseperlen (Pierce) in 200 μl KRHT gebunden. Das Gemisch wurde auf einem Rotiergerät bei 37 °C 15 bis 30 Minuten lang inkubiert. Die Perlen wurden dreimal durch Zentrifugation und Resuspension in 200 μl kaltem KRHT gewaschen, um ungebundenes TGFβ1 zu entfernen, und in einem Endvolumen von 500 μl KRHT resuspendiert. 2'-NH₂-Pyrimidine enthaltende RNA wur-

de drei Minuten lang auf 70 °C erwärmt (2'-OH- oder 2'-F-Pyrimidine enthaltende RNAs wurden auf 95 °C erwärmt) und in KRHT verdünnt, das an SA-Perlen gebundenes TGFβ1 enthielt. Die Endkonzentration von RNA beträgt 1 µM, und die des TGFβ1 betrug 5 nM. Die Bindung erfolgt unter Rotation bei 37 °C 30 Minuten lang. Die Perlen wurden durch dreimalige Zentrifugation und Resuspension mit 200 µl Bindungspuffer zur Entfernung ungebundener RNA gewaschen. RNA wurde von den Perlen wie oben beschrieben eluiert.

D. Bindungstests

[0087] Zwei Bindungstests für Liganden für TGFβ1 lieferten gleichwertige Resultate bei allen Tests. Im SA-Perlen-Test wurde das biotinylierte TGFβ1 in KRHT in Polypropylenrörchen (Linbro, ICN, Irvine, CA, USA) reihenverdünnt und wie oben beschrieben an die Perlen gebunden. Nachdem ungebundenes TGFβ1 ausgewaschen war, wurden Spurenmengen von ³²P-markierter RNA (< 0,1 nM) zu jedem Röhrchen zugegeben und zur Vermischung gevortext. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C ohne Bewegung wurde die ungebundene RNA durch dreimaliges Waschen mit 200 µl KRHT entfernt.

[0088] Im Nitrocellulosefilterbindungstest wurde TGFβ1 in KRH reihenverdünnt, das 0,1 entfettetes BSA (Fluka-Radioimmunt-Qualität, Fluka, Hauppauge, NY, USA) als Träger anstelle von Triton X-100 enthielt. Die Inkubation mit RNA-Tracer erfolgte wie oben. Proben wurden mit einem Multiwell-Pipettiergerät auf eine Multiwell-Verteilervorrichtung pipettiert, die ein Blatt nasse 0,45-Mikrometer-Nitrocellulose von Biorad enthielt, abgesaugt und dreimal mit 200 µl KRH (kein BSA enthaltend) gewaschen. Die Filter wurden luftgetrocknet und in einem Flüssigszintillationszähler (Beckmann Instruments, Palo Alto, CA) gezählt.

[0089] Die zur Anpassung der Bindung von Liganden an TGFβ1 verwendete Gleichung beschreibt die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor (in diesem Falle TGFβ1), die den Massenwirkungsgesetzen folgt und für die eine einzige Bindungsstelle vorliegt: $Y = B_{max} \cdot X / (K_d + X)$: wobei Y der Anteil des gebundenen Liganden, B_{max} der Maximalanteil des gebundenen Liganden, X die Konzentration von TGFβ1 und K_d die Dissoziationskonstante von TGFβ1 und dem Liganden ist. Datenpunkte wurden mittels nichtlinearer Regression unter Verwendung des Computerprogramms Graphpad Prism (Graphpad Software, San Diego, CA) angepasst. Der Algorithmus minimierte die Summe der Quadrate des tatsächlichen Abstands der Punkte von der Kurve. Konvergenz wurde erreicht, wenn zwei aufeinander folgende Iterationen die Summe der Quadrate um weniger als 0,01 % veränderte.

E. Klonierung und Sequenzierung

[0090] SELEX-Experimente werden in Tabelle 2 beschrieben. Primer für die in Tabelle 1 gezeigten SELEX-Experimente 1 und 2 enthalten Erkennungsstellen für die Restriktionsendonucleasen SacI (5'-Primer T7SacBam; Seq.-ID Nr. 7) und XbaI (3'-Primer 3XH; Seq.-ID Nr. 9). PCR-Produkte aus SELEX-Experimenten 1 und 2 wurden gerichtet in SacI/XbaI-verdautes pGem 9zf (Promega) kloniert. Die 5'-Primer T7SB2N (Seq.-ID Nr. 8) und 3'-Primer 3XH (Seq.-ID Nr. 9) (Tabelle 1) wurden für die SELEX-Experimente 3-9 verwendet. PCR-Produkte aus SELEX-Experimenten 3-9 wurden gerichtet in die BamH1/XbaI-Stelle eines modifizierten pGem9zf:BamH1-Klonierungsvektors kloniert. Die BamH1-Stelle wurde auf folgende Weise in pGem9zf hinein konstruiert. Ein aus Bibliothek 2 (lib2-6-2) isolierter Klon, der nicht an TGFβ1 band (Sequenz nicht gezeigt), wurde mit BamH1 und XbaI verdaut. Die die Klonierungsstelle des modifizierten pGem9zf-Vektors flankierende Sequenz ist in Tabelle 1 gezeigt (Seq.-ID Nr. 10-11).

[0091] Nach Verdau des Plasmids mit Restriktionsendonuclease und Dephosphorylierung mit CIP (Kälberdarm-Phosphatase) wurden die Vektoren mittels Gel gereinigt. Inserte wurden ligiert und rekombinante Plasmide in E. coli, Stamm DH10B (Bethesda Research Labs), transformiert. Plasmid-DNA wurde durch alkalische Lyse, Miniprep-Verfahren, hergestellt. Zweiundzwanzig Klone, die 9 einzigartige Sequenzen darstellen, wurden aus den Bibliotheken 1 und 2 statistisch sequenziert. 50 Klone wurden aus den Bibliotheken 3-9 unter Anwendung einer einzigen Didesoxy-G-Reaktion (G-Track genannt) sequenziert. Sequenzleitern wurden verglichen und nach Ähnlichkeiten geordnet. Selektierte Klone aus jeder Familie wurden für die vollständige Sequenzanalyse ausgewählt. TGFβ1-Bindungstests wurden an Transkripten durchgeführt, die verschiedene G-Sequenzen in jeder Bibliothek darstellten. Von insgesamt 140 Bindungstests banden 27 Liganden mit einer K_d von weniger als 10 nM, und 21 von diesen wurden sequenziert. Klone wurden mit dem Sequenace-Sequenzierer sequenziert (United States Biochemical Corporation, Cleveland, OH).

F. Ligandentrunkation

[0092] Trunkationsexperimente wurden durchgeführt, um die minimale Sequenz zu ermitteln, die zur hochaf-

finen Bindung der RNA-Liganden an TGF β 1 erforderlich ist. Für die Ermittlung der 3'-Begrenzung wurden die RNA-Liganden mit γ - 32 P-ATP unter Verwendung von T4-Polynukleotidkinase 5'-endmarkiert. 5'-Begrenzungen wurden mit 3'-endmarkierten Liganden unter Verwendung von α - 32 P-pCp und T4-RNA-Ligase festgestellt. Nach partieller alkalischer Hydrolyse wurden radiomarkierte RNA-Liganden mit TGF β 1 bei Konzentrationen im Bereich von 1 nM bis 50 nM inkubiert und proteingebundene RNA durch Nitrocellulose-trennung getrennt. RNA-Trunkate wurden an einem hochauflösenden denaturierenden Polyacrylamidgel analysiert. Eine Leiter von radioaktiv markierten, mit G-Resten terminierenden Liganden wurde durch partiellen RNase-T1-Verdau erzeugt und als Marker verwendet.

G. Hemmung der TGF β 1-Funktion

[0093] Die TGF β 1-Signaltransduktion beginnt mit der Bindung an einen Zelloberflächenrezeptor und resultiert in der Induktion der Transkription einer Auswahl von Genen. Eines dieser Gene ist Pail. Der TGF β -Test setzt die Nerz-Lungenepithelzelle (MLEC) ein, die das an den Pai-1-Promotor fusionierte Luciferase-Reportergen trägt. Die MLEC weist TGF β 1-Rezeptoren an ihrer Zelloberfläche auf. Daher kann man die Reaktion der Zellen auf TGF β 1 und die wirksame Konzentration von TGF β 1 im Kulturmedium messen, indem die Luciferase-Enzymaktivität nach einem Induktionszeitraum gemessen wird.

[0094] Nerz-Lungenepithelzellen (MLEC), die das Pai1/luc-Konstrukt tragen, wurden in DME gehalten, das 10 % fötales Rinderserum und 400 μ g/ml G418 enthielt. MLEC-Pai1/luc-Zellen wurden zu $3,2 \times 10^4$ Zellen pro Well in einer 96-Well-Falcon-Platte in 100 μ l DME + 10 % fötales Rinderserum über Nacht ausplattiert. Das Medium wurde mit autoklaviertem Wasser hergestellt. Die Zellen wurden drei Mal (100 μ l) in serumfreiem DME plus Lösung A (1:1) gewaschen. Lösung A ist 30 mM Hepes, pH 7,6, 10 mM Glucose, 3,0 mM KCl, 131 mM NaCl, 1,0 mM Dinatriumphosphat. Proben (100 μ l) wurden in DME zugegeben, das 20 mM Hepes, pH 7,5, und 0,1 % BSA enthielt (Fluka, Radioimmuntest-Qualität). Alle Proben lagen in dreifacher Ausführung vor. Nach sechs Stunden bei 37 °C in einem Inkubator mit 5 % CO₂ wurde das Medium entfernt und die Zellen drei Mal (je 100 μ l) in kaltem PBS gewaschen. Lysepuffer (75 μ l) (Analytical Luminescence Laboratory) wurde zugegeben und die Platten auf Eis 20 Minuten lang inkubiert. Die Platten wurden versiegelt und bis zur Analyse bei -80 °C eingefroren. Proben (25 μ l) wurden auf Luciferase-Aktivität mit dem „Enhanced Luciferase Assay Kit“ von Analytical Luminescence Laboratory (San Diego, CA, USA) nach den Vorschriften des Herstellers unter Verwendung des Luminometers Berthold Microlumat LB96P getestet. Die Lumineszenz ist reproduzierbar eine Funktion der dem Medium zugegebenen TGF β 1-Konzentration.

[0095] Auf Hemmung von TGF β 1-Aktivität getestete Liganden wurden bei zumindest fünf Konzentrationen getestet. Die Liganden wurden in DME, 20 mM Hepes, pH 7,5, 0,1 % Fluka-BSA in Polypropylenröhrenchen reihenverdünnt, und es wurde zu jedem Röhrchen ein gleiches Volumen von 12 pM TGF β 1 enthaltendem Medium zugegeben, gevortext und ohne weitere Inkubation auf die Zellen übertragen. Aus der auf jeder Platte enthaltenen TGF β 1-Standardkurve wurde die wirksame TGF β 1-Konzentration in Gegenwart der hemmenden Liganden durch Verminderung der gemessenen Lumineszenz ermittelt. Manche Liganden wurde bei 3 pM und 6 pM TGF β 1 mit denselben Ergebnissen getestet. Um die IC₅₀ (jene Konzentration von SELEX-Ligand, die notwendig ist, um die TGF β 1-Aktivität um 50 % zu vermindern) zu ermitteln, wurden fünf für jeden Liganden erlangte Werte aufgetragen und der Wert bei 50 % Hemmung unter Verwendung von Graphpad Prism unter der Annahme einer hyperbolischen Anpassung der Daten und Anwendung nicht-linearer Regression graphisch bestimmt.

BEISPIEL 2. RNA-LIGANDEN FÜR TGF β 1

A. SELEX-Experimente

[0096] Um RNA-Liganden für TGF β 1 zu erzeugen, wurden neun SELEX-Experimente wie in Tabelle 2 zusammengefasst unter Anwendung der in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Wie in Tabelle 1 dargestellt ist, unterscheiden sich die RNA-Pools hinsichtlich der im zentralen Abschnitt des Moleküls vorhandenen Zufallsbasen: 40 Nukleotide im 40N6-(Seq.-ID Nr. 2) SELEX und 64 Nukleotide im 64N6- und lib2-6-1RN6-(Seq.-ID Nr. 1, 3) SELEX-Experiment. Da das Ziel die Selektion von RNA-Liganden war, die nicht nur an TGF β 1 banden, sondern auch die Rezeptorbindung blockierten, wurde die große Zufallsregion (64N) gewählt. In zwei Experimenten wurde eine kürzere Zufallsregion (40N) aufgenommen. Liganden für TGF β 1 waren mit 40N sehr selten und waren qualitativ dieselben wie die selektierten 64N6-Liganden.

[0097] Die Sequenzen von Klonen aus den SELEX-Experimenten sind in Tabelle 3 (Seq.-ID Nr. 12-42) dargestellt. Die in den verschiedenen SELEX-Experimenten gewählten Pyrimidine unterschieden sich an der

2'-Position des Zuckers (Tabelle 2). In den ersten beiden SELEX-Experimenten wurden Liganden als 2'-OH-Pyrimidine erzeugt. Liganden wurden im Anschluss an SELEX mit 2'-NH₂- oder 2'-F-substituierten Pyrimidinen modifiziert, um zu sehen, ob sie die TGFβ1-Bindung beibehalten. Da die 2'-Substitutionen die Liganden gegen RNase A resistent machen, wurden sie auch im Zellkulturttest auf Hemmung von TGFβ1-Aktivität getestet. Von einem derartigen Liganden, lib2-6-1 (Gruppe D, Tabelle 3; Seq.-ID Nr. 35), wurde gezeigt, dass er bei Substitution mit 2'-NH₂-UTP und 2'-F-CTP die TGFβ1-Rezeptor-vermittelte Aktivität hemmte. Um mehr Liganden zu selektieren, wurden sechs weitere unabhängige SELEX-Experimente (lib3-7 und lib9) unter Verwendung von 2'-F- und 2'-NH₂-substituierten Pyrimidinen während des Evolutionsprozesses durchgeführt. Im Experiment lib8 wurde der biologisch aktive Klon lib2-6-1 (Seq.-ID Nr. 35) randomisiert und der Neuselektion unterzogen, um festzustellen, ob das Bindungs- und Hemmverhalten des Klons verbessert werden konnte. Lib8 wurde als 2'-OH-Pyrimidin-RNA evolviert. In manchen Fällen wurde im Anschluss an SELEX eine Modifizierung von aus Experimenten 3-9 stammenden TGFβ1-Liganden durchgeführt, um z.B. zu ermitteln, ob ein mit 2'-F-Pyrimidin-Substitutionen evolvierte Ligand auch mit 2'-NH₂-Substitutionen binden würde.

[0098] Jeder Ausgangspool für ein SELEX-Experiment enthielt 3×10^{14} RNA-Moleküle (500 pmol). Die Affinität der Ausgangs-RNA für TGFβ1 wurde mit größer als 50 mM geschätzt. Nach vier SELEX-Umläufen hatten sich die Affinitäten der evolvierenden Pools auf etwa 10 nM verbessert und verschoben sich nicht mehr signifikant in weiteren Umläufen. RNA wurde als Ganzes sequenziert und erwies sich als nicht-zufällig und wurde kloniert.

[0099] Lib1 benötigte 20 Umläufe zur Evolution, da optimale Konzentrationen von TGFβ1 bis zum Umlauf 15 nicht verwendet wurden, und Bibliotheken 5, 6 und 7 benötigten länger, da optimale Bedingungen für die Gewinnung gebundener Liganden während des Trennschritts im SELEX bis zum Umlauf 8 nicht eingesetzt wurden. Optimale TGFβ1-Konzentrationen und Trennbedingungen werden im Beispiel 1 beschrieben.

B. RNA-Sequenzen

[0100] Viele Klone in einer SELEX-Bibliothek weisen eine identische oder ähnliche Sequenz auf. Die Bibliotheken wurden mittels G-Track gescreent, und nur Stellvertreter jedes G-Track-Typs wurden in einem Bindungstest getestet. Der Bindungstest bestand aus 5 Punkten (16,5 nM, 5,5 nM, 1,8 nM, 0,6 nM und 0,2 nM) und konnte nur jene SELEX-Klone mit einer Kd von weniger als oder gleich 10 nM detektieren. RNA-Liganden, die im Bindungstest gut banden (Kd < 10 nM), wurden sequenziert. Die Sequenzen wurden visuell geprüft und unter Verwendung von Computerprogrammen analysiert, die Angleichungen durchführen und Nucleinsäuresequenzen falten, um Regionen der Sekundärstruktur vorherzusagen. Liganden wurden anhand der Sequenzhomologie in fünf Gruppen (A, B, C, D und Waisen) eingeteilt. Jede Gruppe weist charakteristische erlaubte 2'-Substitutionen auf.

[0101] Es wurde mittels G-Track festgestellt, dass 58 Klone aus 7 gesonderten SELEX-Experimenten den Liganden der Gruppe A angehören (Tabelle 3; Seq.-ID Nr. 12-42). 15 Klone wurden sequenziert; 13 waren ähnlich, jedoch nicht identisch, wogegen 3 Klone, lib3-13 (Seq.-ID Nr. 12), lib5-6 und lib5-13, identisch waren. Liganden der Gruppe A wurden aus sieben der acht SELEX-Bibliotheken gewonnen, die Bibliotheken umfassten, die als 2'-NH₂-, 2'-OH- oder 2'-F-substituierte Pyrimidine evolviert wurden, sowie einer als 2'-F-UTP, 2'-NH₂-CTP evolvierten Bibliothek. Die Modifizierung im Anschluss an SELEX weist darauf hin, dass 2'-NH₂-UTP, 2'-F-CTP die Bindung von lib8-9 an TGFβ1 nicht zerstört, und daher scheint die Struktur der Liganden der Gruppe A keine spezifische 2'-Gruppierung am Pyrimidin-Zucker zu erfordern, um die Bindung zu erhalten.

[0102] Liganden der Gruppe B binden als 2'-NH₂- sowie 2'-F-Pyrimidin-substituierte RNA. 28 Klone der Gruppe B wurden mittels G-Track-Analyse aus 3 Bibliotheken detektiert. Zwei der Bibliotheken wurden als 2'-NH₂- und eine als 2'-F-Bibliothek evolviert. Vier Klone wurden sequenziert, zwei waren identisch (lib5-47 und lib4-12; Seq.-ID Nr. 28). Eine interne Deletion kann in Gruppe B, wie in lib3-44, auftreten. Der 40N-Waise, lib3-42, wurde auf Basis der Sekundärstruktur in Gruppe B gestellt. Die interne Deletion in lib3-44, die Bindungsaffinität, die Bioaktivität und Experimente hinsichtlich der Begrenzungen unterstützen alle die Zuordnung von lib3-42 zu dieser Gruppe.

[0103] Liganden der Gruppe C binden wie erwartet als 2'-OH- oder 2'-F-Liganden, da Elemente dieser Gruppe als 2'-OH-Liganden in lib1 und als 2'-F-Pyrimidin-substituierte Liganden in lib6 evolviert wurden. Lib1-20-3 (Seq.-ID Nr. 32) wurde im Anschluss an SELEX und als 2'-F-Derivat modifiziert. Lib1-20-3 band nicht mit eingebauten 2'-NH₂-Pyrimidinen.

[0104] Der Ligand der Gruppe D, lib2-6-1 (Seq.-ID Nr. 35), wurde nach 2'-OH-SELEX isoliert, wurde jedoch im Anschluss an SELEX modifiziert und bindet gut als 2'-NH₂-UTP- und 2'-F-CTP-Pyrimidin-Derivat. Lib2-6-1 bindet nicht gut an TGFβ1 mit 2'-NH₂-, 2'-F- oder 2'F-UTP-, 2'-NH₂-CTP-substituierten Pyrimidinen. Varianten der Gruppe D wurden nur in zwei anderen SELEX-Experimenten neu selektiert, lib8, einer 2'-OH-Bibliothek, und lib9, einer 2'-NH₂-UTP-, 2'-F-CTP-Bibliothek, was die Beobachtung stützt, dass eine Spezifität für die 2'-Pyrimidinposition in diesem Liganden vorliegt.

[0105] Die Elemente der Waisen genannten Gruppe sind nicht homolog zueinander, und es sind keine Variantensequenzen für diese Liganden ermittelt worden. Der G-Track weist darauf hin, dass acht dem lib3-45 ähnliche 40N-Klone aus zwei Bibliotheken isoliert wurden. Zwei der acht wurden sequenziert und sind identisch. Lib3-45 (Seq.-ID Nr. 39) bindet, ob er 2'-NH₂- oder 2'-F-substituierte Pyrimidine enthält oder die 2'-F-UTP-, 2'-NH₂-CTP-Kombination. Als 2'-OH-Ligand isoliertes Lib1-20-5 (Seq.-ID Nr. 40) bindet als 2'-F, wogegen lib1-20-12 (Seq.-ID Nr. 41) und lib2-6-8 (Seq.-ID Nr. 42) nur als 2'-OH-Pyrimidine gut binden und keine 2'-NH₂- oder 2'-F-Modifizierungen im Anschluss an SELEX tolerieren.

[0106] Da es ungewöhnlich war, dass aus verschiedenen SELEX-Experimenten, die verschiedene Modifizierungen enthielten, ähnliche Sequenzen erlangt wurden, wurde ein weiterer Satz von SELEX-Experimenten durchgeführt, um RNA- und ssDNA-Liganden für TGFβ1 wie in den unten stehenden Beispielen 5 und 6 beschrieben aufzufinden.

BEISPIEL 3. HEMMUNG DER TGFβ1-REZEPTORBINDUNG

[0107] Die in Tabelle 4 für Liganden der Gruppe A berichteten Kd- und B_{max}-Werte gelten, falls nicht anders angegeben, für die 2'-NH₂-substituierte Version des Liganden. B_{max} für die Liganden der Gruppe A betrug 0,38 +/- 0,12 (n = 14), was im Einklang mit der gemessenen Retention von TGFβ1 an den Nitrocellulosefiltern steht. Die Kd-Werte für Liganden der Gruppe A waren alle ähnlich, 2,2 +/- 1,1 nM (n = 14). Wo sie gemessen wurden, lieferten Nitrocellulose- und SA-Agaroseperlen-Bindungstests gleichwertige Ergebnisse.

[0108] Die IC₅₀-Werte in Tabelle 4 für Liganden der Gruppe A wurden alle, wenn nicht anders bezeichnet, mit den 2'-NH₂-Pyrimidin-substituierten Liganden getestet. 2'-NH₂-Liganden wurden im Gewebekultur-Biotest verwendet, da sie die höchste Stabilität unter den Bedingungen des Biostests zeigten. Fünf von zehn getesteten Liganden der Gruppe A hemmten die TGFβ1-Rezeptor-Aktivität. IC₅₀-Werte für die Inhibitoren lagen typischerweise 25fach über der Kd für TGFβ1. Die Daten sind reproduzierbar; die Kd für Ligand lib3-13 betrug 0,83 +/- 0,11 nM (n = 3), und die IC₅₀ für lib3-13 (Seq.-ID Nr. 12) betrug 25 +/- 14 nM (n = 4). Alle RNA-Konzentrationen in den Biostests sind Schätzwerte auf Basis der Annahme eines Extinktionskoeffizienten und 100 % Reinheit des Liganden. Die RNA-Konzentrationen können daher beim Biotest überschätzt sein, was wiederum die IC₅₀ überbewerten würde.

[0109] Weitere fünf Liganden der Gruppe A hemmten nicht die TGFβ-Rezeptorbindungsaktivität. Einer der offensichtlichen Unterschiede zwischen den nicht-bioaktiven Liganden lib2-6-4 (Seq.-ID Nr. 20), lib5-48 (Seq.-ID Nr. 19) und lib6-23 (Seq.-ID Nr. 21) und den bioaktiven Liganden ist die Substitution am Nucleotid 72. Lib7-21 (Seq.-ID Nr. 23) und lib7-43 (Seq.-ID Nr. 24) wurden als 2'-F-UTP-, 2'-NH₂-CTP-Liganden für Bioaktivität getestet. Diese Liganden waren trotz ihrer hohen Affinität für TGFβ nicht bioaktiv. Schließlich sind Bindung und Bioaktivität gesonderte Funktionen des TGFβ-Liganden der Gruppe A.

[0110] Liganden der Gruppe B weisen andere Bindungseigenschaften als Liganden der Gruppe A auf (Tabelle 4). Kd (0,63 +/- 0,5 nM, n = 4) sowie B_{max} (0,14 +/- 0,04, n = 4) sind für Liganden der Gruppe B niedriger. Einer der Inhibitoren der Gruppe B, lib4-12 (Seq.-ID Nr. 28), scheint tatsächlich TGFβ1-Aktivität im Gewebekulturbiotest bei niedrigen Konzentrationen zu stimulieren. Die Basis dieses gemischten Agonist/Antagonist-Verhaltens ist nicht ermittelt worden. Der beste Inhibitor in dieser Gruppe, lib3-42 (Seq.-ID Nr. 30), weist eine IC₅₀ von 22 nM auf und zeigte kein Agonist-Verhalten über die getesteten Konzentrationsbereiche.

[0111] Liganden der Gruppe C wurden als 2'-F-Derivate getestet und waren nicht bioaktiv. Auch der 2'-F-Waise lib1-20-5 (Seq.-ID Nr. 40) war es nicht. Der 2'-NH₂-, 40N-Waise lib3-45 ist ein Beispiel eines weiteren Liganden mit hoher Affinität für TGFβ1 und ohne die Fähigkeit zur Hemmung von TGFβ1-Rezeptorbindung.

[0112] Liganden der Gruppe D wurden im Biotest als 2'-NH₂-UTP-, 2'-F-CTP-Derivate getestet. Sowohl lib2-6-1 (Seq.-ID Nr. 35) als auch die trunkierte Version lib2-6-1-81 (Seq.-ID Nr. 36) können die TGFβ1-Rezeptorbindung hemmen; jedoch vermindert eine einzige Mutation von C auf G an Position 53 die Bioaktivität im Klon lib8-23. Gleichzeitig erhöht eine Deletion von 2 Basenpaaren im Klon lib6-30 (Seq.-ID Nr. 34) an Po-

sitionen, die Nucleotiden 67 und 68 in lib2-6-1 (Seq.-ID Nr. 45) entsprechen, die Bindung um das 10fache, eliminiert jedoch die Bioaktivität.

[0113] Lib2-6-1 (Seq.-ID Nr. 35) erwies sich als voll wirksam nur gegen TGF β 1 und nicht gegen TGF β 2 und TGF β 3. Lib2-6-1 (Seq.-ID Nr. 35) war biologisch aktiv in Gegenwart von 10 % Pferdeserum im Zellkulturmedium zusätzlich zu den 0,1 % BSA. Daher zeigt der Ligand Spezifität gegen TGF β 1, die durch Gegenwart des Pferdeserums in diesem Test nicht gestört wird. Den stärksten Hinweis darauf, dass die Hemmung der TGF β 1-Rezeptorbindung eine spezifische Erscheinung ist, ist die Tatsache, dass nicht alle TGF β 1-Liganden die Rezeptorbindung blockieren, dass jedoch diejenigen, die die Rezeptorbindung blockieren, dies in reproduzierbarer Weise tun. Es gibt keine Beispiele von Liganden, die nicht an TGF β 1 binden und die TGF β 1-Rezeptorbindungsaktivität blockieren.

[0114] Zusammenfassend sind RNA-Liganden, die die TGF β 1-Rezeptorbindung blockieren können, eine Untergruppe von Liganden. Bindung ist notwendig, jedoch nicht ausreichend für Bioaktivität. Ungefähr 50 % der getesteten Liganden mit hoher Affinität waren Inhibitoren. Von den Inhibitoren waren 30 % gute Inhibitoren ($IC_{50} < 25$ nM).

BEISPIEL 4. ANALYSE DER BEGRENZUNGEN

[0115] Trunkationsexperimente wurden an einer Reihe von TGF β 1-Liganden durchgeführt, um die für Bindung essentiellen Nucleotide zu ermitteln. Liganden der Gruppe A, lib3-13 (Seq.-ID Nr. 12) und lib8-9 (Seq.-ID Nr. 16), wurden mit beständigen Ergebnissen trunkiert. Das Fragment lib3-13-79 bindet an TGF β 1, daher ist keines der Nucleotide 3' zu Nucleotid 79 in lib3-13 für die Bindung essentiell. Wenn alle Nucleotide 5' zu Nucleotid 38 deletiert werden, kann das verbleibende Fragment lib3-13-(38-123) nach wie vor an TGF β 1 binden. Die 5'-Begrenzung steht im Einklang mit der Sequenz lib6-23 (Seq.-ID Nr. 21), die eine den Nucleotiden 19-36 von lib3-13 (Seq.-ID Nr. 25) entsprechende Deletion aufweist und nach wie vor an TGF β 1 bindet. Folglich könnten alle hochaffinen Bindungsdeterminanten für Klone der Gruppe A vollständig innerhalb der Zufallsregion liegen und könnten einem Fragment von 42 Nucleotiden, lib3-13-(38-79), entsprechen. Zahlreiche Liganden der Gruppe A enthalten Deletionen oder Substitutionen innerhalb der vorhergesagten essentiellen Bindungsdomäne in der Region, die lib3-13-(72-81) entspricht. Die Deletion und Substitution in lib4-32 haben keine Wirkung auf seine 3'-Begrenzung, die dem lib3-13-Nucleotid 80 entspricht. Daher ist die 3'-Begrenzung wahrscheinlich korrekt und die Veränderungen in der Nucleotidsequenz 72-81 sind solche, die die zur Bindung erforderliche Nucleinsäurestruktur nicht signifikant verändern. Mutationen in dieser Region, vor allem Nucleotid 72, können jedoch die Fähigkeit des Liganden modifizieren, die TGF β 1-Rezeptorbindung wie vorher erwähnt zu blockieren.

[0116] Die Analyse der Begrenzungen des 3'-Endes des Gruppe-B-Liganden lib4-12 (Seq.-ID Nr. 28) sagt vorher, dass nichts für TGF β 1-Bindung erforderlich ist, was über das Nucleotid 72 hinausgeht. Wenn die 5'-Begrenzung von lib4-12 ermittelt wurde, waren alle außer die ersten drei Nucleotide für die Bindung erforderlich, was darauf hinweist, dass die 5'-Konstantregion ein essentieller Abschnitt des Liganden ist, zumindest wenn die Begrenzungen des Liganden voller Länge ermittelt wurden. Unter der Annahme, dass Ligand lib3-44 (Seq.-ID Nr. 29) eine ähnliche Bindungsdeterminante wie lib4-12 (Seq.-ID Nr. 28) aufweist, können die Erfinder außerdem schließen, dass Nucleotide 37-46 von lib4-12 für die Bindung nicht erforderlich sind, da diese in lib3-44 und lib3-42 (Seq.-ID Nr. 30) deletiert sind.

[0117] Die 3'-Konstantregion ist zur Bindung in Liganden der Gruppen C und D nicht notwendig. Beide Ligandentypen binden ohne die 3'-Nucleotide in der Konstantregion. Lib1-20-3-82, ein trunkierte Version von lib1-20-3 (Seq.-ID Nr. 32) von 82 Nucleotiden, bindet genau so gut wie lib1-20-3 voller Länge. Gleichermaßen bleibt die Bindung und Bioaktivität von lib2-6-1 durch die sich in lib2-6-1-81 (Seq.-ID Nr. 36) findende 3'-Trunkation unbeeinflusst.

BEISPIEL 5. EXPERIMENTELLE VERFAHREN

[0118] In der bevorzugten Ausführungsform wurde ein zweiter Satz von SELEX-Experimenten durchgeführt, um RNA- und DNA-Liganden mit spezifischer hoher Affinität für TGF β 1 aus degenerierten Bibliotheken aufzufinden, die 40 Zufallspositionen (40N) enthielten. Dieses Beispiel stellt die allgemeinen Verfahren bereit, die in Beispiel 6 befolgt werden und enthalten sind.

A. Materialien

[0119] Reverse Transkriptase M-MLV-Superscript wurde von Gibco BRL (Gaithersburg, MD) bezogen. T7-RNA-Polymerase wurde nach Standardverfahren bei NeXstar Pharmaceuticals, Inc. (Boulder, CO) gereinigt. Taq-DNA-Polymerase (AmpliTaq) war von Perkin Elmer/Cetus (Richmond, CA). T4-Polynukleotidkinase, DNA-Polymerase (Klenow-Fragment) und Alkalische Phosphatase wurden von New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) bezogen. Die 2'-Amino-substituierten Nukleotidtriphosphate Amino-UTP und Amino-CTP wurden nach Standardverfahren bei NeXstar Pharmaceuticals, Inc. (Boulder, CO) synthetisiert. Andere in dieser Arbeit verwendete Reagenzien hatten die höchste erhältliche Qualität.

B. Nucleinsäuren

[0120] RNAs wurden durch In-vitro-Transkription unter Verwendung von doppelsträngigen DNA-Oligonukleotiden und T7-RNA-Polymerase synthetisiert. DNA-Oligonukleotide (Tabelle 5) wurden von Operon, Inc. (Alameda, CA) bezogen und mittels 6%iger präparativer Polyacrylamidgelektrophorese gereinigt. PCR-Amplifikation wurde in 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,6), 2,5 mM MgCl₂, 170 mg/ml BSA und dNTPs (mit jeweils 1 mM zugegen) durchgeführt. Taq-DNA-Polymerase wurde mit 100 Units pro 0,1-ml-Reaktion verwendet, und die 5'- und 3'-Primer waren in einer Konzentration von 1 mM zugegen. Die Transkription wurde in 40 mM NaCl, 10 mM Dithiothreitol, 50 mM Tris-Acetat (pH 8,0), 8 mM Magnesiumacetat, 2 mM Spermidin und 2 mM NTP durchgeführt. T7-RNA-Polymerase war mit 1 Unit/ml zugegen, Die Reaktion wurde bei 28 Grad 16 Stunden lang inkubiert und dann mit 20 Units DNase I für 10 Minuten lang bei 37 °C behandelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von einem halben Volumenanteil Beladungspuffer (93 % Formamid, 10 mM EDTA, pH 8,0) gestoppt und drei Minuten lang auf 95 Grad erhitzt, bevor sie der Elektrophorese an einem denaturierenden Gel aus 6 % Polyacrylamid/8 M Harnstoff unterzogen wurde. Das RNA-Transkript wurde mit UV-Schattierung sichtbar gemacht und wurde aus dem Gel herausgeschnitten und in TE-Puffer (10 mM Tris-Acetat, pH 8,0, 2 mM EDTA) eluiert. Das RNA-Transkript wurde mittels Ethanol präzipitiert, unter Vakuum getrocknet und wieder in destilliertem Wasser aufgelöst. Die Konzentration von RNA sowie einzelsträngiger DNA wurden durch Messen der A₂₆₀ und die Annahme quantifiziert, dass 1 A₂₆₀-Einheit 40 mg/ml bzw. 33 mg/ml entspricht.

C. Evolution von Liganden hoher Affinität

[0121] SELEX-Liganden, die an TGFβ1 binden, wurden im Wesentlichen wie im US-Patent Nr. 5.270.163 beschrieben (siehe auch Tuerk und Gold, Science 249, 505-510 (1990)) unter Verwendung der in Tabelle 5 illustrierten Oligonukleotide (Seq.-ID Nr. 43-54) hergeleitet. Die DNA-Template enthielten eine variable Sequenz von 40 Nukleotiden (40N), die durch Mischnukleotid-DNA-Synthese sowie 5'- und 3'-fixierte Sequenzen erzeugt wurden, die für die PCR-Amplifikation des Templaats erforderlich waren. Die 5'-fixierte Sequenz von Oligonukleotiden 40N7 (Seq.-ID Nr. 43) und 40N8 (Seq.-ID Nr. 49) enthielten außerdem einen T7-RNA-Polymerasepromotor. RNA für den ersten Umlauf von RNA-SELEX wurde aus doppelsträngigen DNA-Templaten transkribiert, die durch Primerextension an einzelsträngigen DNA-Templaten 40N7 und 40N8 mit dem Klenow-Fragment von DNA-Polymerase I erzeugt wurden. Der RNA-SELEX bestand aus bis zu 15 Umläufen der RNA-Synthese, Bindung an Target, Trennung von gebundener und ungebundener RNA durch Nitrocellulosefiltration, cDNA-Synthese und PCR-Amplifikation zur Regenerierung des doppelsträngigen DNA-Templats. Die Bindung an das Target durch den RNA-Pool wurde in Bindungspuffer A (120 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,12 mM MgSO₄, 40 mM HEPES, 20 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 7,4, 0,01 % HSA) bei 37 °C zumindest 10 Minuten lang vor der Filtration durchgeführt. Im Gegensatz dazu wurde der erste Umlauf des einzelsträngigen DNA-SELEX durch direktes Verwenden der synthetisch synthetisierten Oligonukleotide 40D7 und 40D8 durchgeführt. Der SELEX bestand aus 25 Umläufen der Bindung an Target, Trennung von gebundener und ungebundener einzelsträngiger DNA durch Nitrocellulosefiltration, PCR-Amplifikation zur Erzeugung einer doppelsträngigen DNA-Population und präparativen Polyacrylamidgelektrophorese zur Reinigung einzelsträngiger DNA für den nächsten SELEX-Umlauf. Die Bindung des Targets an den einzelsträngigen DNA-Pool wurde in Bindungspuffer B (150 mM NaCl, 10 mM Tris-Acetat, pH 7,5, 0,001 % BSA) bei 37 Grad zumindest 15 Minuten lang vor der Filtration durchgeführt. Die Radiomarkierung von RNA- sowie DNA-Repertoires wurde durch Inkubation von 5 Picomol Nucleinsäure, 2 Units T4-Polynukleotidkinase und 6 ml [³²P]ATP (800 Ci/mmol) in einem Volumen von 10 ml bei 37 Grad 30 Minuten lang durchgeführt. Die Konzentration an Nucleinsäure in jedem Umlauf des SELEX-Experiments variierte zwischen 1.500 nM und 1 nM, während die Konzentration des Target-TGFβ1 zwischen 150 nM und 0,03 nM variierte.

D. Klonierung und Sequenzierung von Liganden

[0122] Die Klonierung des Nucleinsäure-Repertoires wurde wie von Tuerk und Gold, Science 249, 505-510

(1990), beschrieben unter Verwendung von doppelsträngiger DNA durchgeführt, die aus dem RNA-Repertoire durch PCR-Amplifikation erzeugt wurde. PCR-amplifizierte DNA wurde mit den Restriktionsenzymen SphI und HindIII verdaut und in kompatible Stellen in pGEM ligiert. Ligierte Plasmide wurden in *E. coli* transformiert und auf LB-Agar ausplattiert, der 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid, Isopropylthiogalactosid und 100 mg/ml Ampicillin enthielt. Kolonien, die keine β-Galactosidase exprimierten, wurden analysiert. Die Sequenzierung der DNA wurde wie von Tuerk und Gold (1990) beschrieben unter Verwendung des Didesoxynucleotid-Verfahrens von Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467 (1977), durchgeführt. Plasmide wurden aus *E. coli* durch das Miniprep-Verfahren der alkalischen Lyse isoliert (Maniatis et al., in: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1982)). DNA wurde in 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 60 mM NaCl, 6 mM Magnesiumacetat und 1 mM DTT mit 0,4 mM dNTP und 0,2 mM Didesoxy-NTP 20 Minuten lang bei 48 Grad inkubiert. DNA-Polymerase war mit 4 Units pro Reaktion zugegen. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 10 ml Beladungspuffer gestoppt und auf 95 Grad 3 Minuten lang erhitzt, bevor sie der Gelelektrophorese an einem denaturierenden Gel aus 6 % Polyacrylamid/8 M Harnstoff unterzogen wurden. G-Track-Sequenzierung wurde wie beschrieben durchgeführt und stellte ein bequemes Verfahren bereit, um die klonierte Bibliothek auf Liganden unterschiedlicher Sequenz rasch zu screenen. Zusammenfassend enthielt die G-Track-Sequenzierungsreaktion 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 60 mM NaCl, 6 mM Magnesiumacetat und 1 mM DTT mit 0,4 mM dNTP, 0,2 mM Didesoxy-GTP und 4 Units DNA-Polymerase. Die Reaktion wurde bei 48 Grad 20 Minuten lang durchgeführt und wurde durch Zugabe von 10 µl Beladungspuffer gestoppt und auf 95 Grad 3 Minuten lang erhitzt, bevor sie der Gelelektrophorese an einem denaturierenden Gel aus 6 % Polyacrylamid/8 M Harnstoff unterzogen wurde.

BEISPIEL 6. BINDUNGSANALYSE; BIOTESTERGEBNISSE UND SEQUENZEN EINER ssDNA-BIBLIOTHEK

[0123] Die Bindungsanalyse der 40D7-DNA-Bibliothek für TGF-B1 ist in [Fig. 1](#) gezeigt. Es sind Bindungsdaten gezeigt, die aus den Umläufen 19 (Dreiecke) und 0 (Kreise) erlangt wurden. Das Experiment wurde durch Inkubieren von Nucleinsäure (weniger als 1 nM) und der bezeichneten Konzentration von TGF-b1 in Bindungspuffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-Acetat, pH 8,2, 0,001 % BSA) 15 Minuten lang bei 37 Grad in einem Volumen von 0,1 ml durchgeführt. Die Proben wurden durch Nitrocellulose filtriert, unmittelbar gefolgt von 3 ml TE-Puffer (10 mM Tris-Acetat, pH 8,0, 0,1 mM EDTA). Der prozentuelle Anteil an gebundener Radiomarkierung wurde aus der Menge der am Nitrocellulosefilter zurückgehaltenen Radiomarkierung und der gesamten zur Bindungsreaktion zugegebenen Radiomarkierung berechnet. Die Ergebnisse zeigen, dass die scheinbare Kd der 40D7-Bibliothek 1 nM beträgt, wogegen der Anfangspool eine scheinbare Kd von 30 nM aufweist. Daher zeigt die 40D7-Bibliothek eine ungefähr dreifache Erhöhung der Bindung.

[0124] Ein PAI-Luciferase-Test zum Nachweis von TGF-b1-Aktivität in Gegenwart der in Beispiel 5 erzeugten Nucleinsäurebibliotheken wurde wie in Abe et al., Analytical Biochem. 216, 276-284 (1994), beschrieben durchgeführt. Nerz-Lungenepithelzellen, die das PAI-Luciferase-Reportergen enthielten, wurden mit TGF-b1 (10 pM) und Oligonucleotiden aus den DNA-Bibliotheken oder Anti-TGF-B-Antikörper (60 µg/ml) inkubiert. Die Nerz-Lungenepithelzellen wurden 18 Stunden lang inkubiert, und Oligonucleotide wurden mit TGF-b1 vor dem Test vorinkubiert und nach 8 Stunden wieder zugegeben. Die Zugabe von Oligonucleotiden alleine (100 nM) zur Zellkultur beeinflusste den Test nicht (Daten nicht gezeigt). Die Identität der Oligonucleotidbibliotheken sowie ihre Wirkung auf die Luciferase-Aktivität sind in [Fig. 2](#) angegeben. Die ssDNA-Bibliothek 40N7 hemmte die Aktivität von TGF-B1 vollständig, während die Kontrolle (eine gleiche Konzentration randomisierter Nucleinsäure) eine geringfügige Stimulierung der TGF-B1-Aktivität zeigte.

[0125] Auf Basis der Ergebnisse von Bindungsanalyse und PAI-Luciferase-Test wurden DNA-Liganden aus der 40N7-Bibliothek wie in Beispiel 5 beschrieben sequenziert. Die Sequenzen sind in Tabelle 6 gezeigt (Seq.-ID Nr. 55-89). Da die DNA-40N7-Bibliothek eine Hemmung im PAI-Luciferase-Biotest zeigte, ist der Vorschlag begründet, dass die jeweiligen Klone aus der Bibliothek TGFβ1 binden.

BEISPIEL 7. EXPERIMENTELLE VERFAHREN

[0126] Dieses Beispiel stellt die allgemeinen Verfahren bereit, die in den Beispielen 8-15 zur Evolution von Nucleinsäureliganden für PDGF befolgt wurden und enthalten sind.

A. Materialien.

[0127] Rekombinantes menschliches PDGF-AA (Mr = 29.000), PDGF-AB (Mr = 27.000) und PDGF-BB (Mr = 25.000) wurden von R&D Systems (Minneapolis, MN) in lyophilisierter Form und frei von Trägerprotein erwor-

ben. Alle drei Isoformen wurden in *E. coli* aus synthetischen Genen auf Basis der Sequenzen für die lange Form der reifen menschlichen PDGF-A-Kette (Betsholtz et al., *Nature* 320, 695-699 (1986)) und der natürlich vorkommenden reifen Form der menschlichen PDGF-B-Kette (Johnsson et al., *EMBO J.* 3, 921-928 (1984)) hergestellt. Randomisierte DNA-Bibliotheken, PCR-Primer und DNA-Liganden und 5'-Iod-2'-desoxyuridin-substituierte DNA-Liganden wurden durch NeXstar Pharmaceuticals, Inc. (Boulder, CO) oder durch Operon Technologies (Alameda, CA) unter Anwendung des standardmäßigen Festphasen-Phosphoramidit-Verfahrens synthetisiert (Sinha et al., *Nucleic Acids Res.* 12, 4539-4557 (1984)).

B. Einzelsträngiger DNA-(ssDNA-)Selex

[0128] Essentielle Eigenschaften des SELEX-Verfahrens sind in den SELEX-Patentanmeldungen ausführlich beschrieben worden (siehe auch Tuerk und Gold, *Science* 249, 505 (1990); Jellinek et al., *Biochemistry* 33, 10450 (1994); Jellinek et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 11227 (1993)), die hierin durch Verweis aufgenommen sind. Die anfängliche ssDNA-Bibliothek, die eine zusammenhängende randomisierte Region von vierzig Nukleotiden enthält, flankiert von Primer-Anellierungsregionen (Tabelle 7; Seq.-ID Nr. 90) unveränderlicher Sequenz, wurde mit dem Festphasen-Phosphoramidit-Verfahren unter Verwendung eines äquimolaren Gemischs der vier Phosphoramidite zur Erzeugung der randomisierten Positionen synthetisiert. Die ssDNA-Bibliothek wurde mittels Elektrophorese an einem Gel mit 8 % Polyacrylamid/7 M Harnstoff gereinigt. Die der DNA voller Länge entsprechende Bande wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht, aus dem Gel herausgeschnitten, mittels Crush-and-Soak-Verfahren eluiert, mittels Ethanol präzipitiert und mittels Zentrifugation pelletiert. Das Pellet wurde unter Vakuum getrocknet und in phosphatgepufferter Salzlösung resuspendiert, die mit 1 mM MgCl₂-Puffer ergänzt war (PBSM = 10,1 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl und 2,7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, pH 7,4). Vor der Inkubation mit dem Protein wurde die ssDNA bei 90 °C 2 Minuten lang in PBSM erhitzt und auf Eis gekühlt. Die erste Selektion wurde eingeleitet durch Inkubieren von etwa 500 pmol (3 × 10¹⁴ Moleküle) 5'-³²P-endmarkierter Zufalls-ssDNA mit PDGF-AB in Bindungspuffer (PBSM, enthaltend 0,01 % menschliches Serumalbumin (HSA)). Das Gemisch wurde bei 4 °C über Nacht inkubiert, gefolgt von einer kurzen (15-minütigen) Inkubation bei 37 °C. Die an PDGF-AB gebundene DNA wurde von ungebundener DNA durch Elektrophorese an einem Gel aus 8 % Polyacrylamid (1:30 Bis-Acrylamid:Acrylamid) bei 4 °C und bei 5 V/cm mit 2 mM EDTA enthaltendem 89 mM Tris-Borat (pH 8,3) als Laufpuffer getrennt. Die dem PDGF-ssDNA-Komplex entsprechende Bande, die mit etwa der halben elektrophoretischen Mobilität der freien ssDNA lief, wurde mittels Autoradiographie sichtbar gemacht, aus dem Gel herausgeschnitten und mittels Crush-and-soak-Verfahren eluiert. In anschließenden Affinitätsselektionen wurde die ssDNA mit PDGF-AB 15 Minuten lang bei 37 °C in Bindungspuffer inkubiert und die PDGF-gebundene ssDNA von ungebundener DNA durch Nitrocellulosefiltration wie früher beschrieben getrennt (Green et al., *Chemistry and Biology* 2, 683-695 (1995)). Alle affinitätsselektierten ssDNA-Pools wurden mittels PCR amplifiziert, bei der die DNA 12-20 Thermocycling-Umläufen (30 s bei 93 °C, 10 s bei 52 °C, 60 s bei 72 °C) in 10 mM Tris-Cl (pH 8,4) unterzogen wurde, das 50 mM KCl, 7,5 mM MgCl₂, 0,05 mg/ml Rinderserumalbumin, 1 mM Desoxynucleosidtriphosphate, 5 µM Primer (Tabelle 7) und 0,1 Units/µl Taq-Polymerase enthielt. Der 5'-Primer wurde mit Proteinkinase und [γ -³²P]ATP 5'-endmarkiert, und der 3'-PCR-Primer wurde am 5'-Ende unter Verwendung von Biotin-Phosphoramidit (Glen Research, Sterling, VA) biotinyliert. Nach der PCR-Amplifikation wurde Streptavidin (Pierce, Rockford, IL) zu dem ungereinigten Reaktionsgemisch in einem 10fachen molaren Überschuss gegenüber dem biotinylierten Primer zugegeben und 15 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die dsDNA wurde durch Zugabe eines gleichen Volumens Stopplösung (90 % Formamid, 1 % Natriumdodecylsulfat, 0,025 % Bromphenolblau und Xyloolcyanol) und 20-minütiges Inkubieren bei Raumtemperatur denaturiert. Der radiomarkierte Strang wurde vom Streptavidin-gebundenen biotinylierten Strang durch Elektrophorese an Gelen aus 12 % Polyacrylamid/7 M Harnstoff getrennt. Der schneller wandernde radiomarkierte (nicht-biotinylierte) ssDNA-Strang wurde aus dem Gel geschnitten und wie oben beschrieben gewonnen. Die Menge an ssDNA wurde aus der Absorption bei 260 nm unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten von 33 µg/ml/Absorptionseinheit abgeschätzt (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Auflage, 3. Bd., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989)).

C. Klonierung und Sequenzierung

[0129] Der amplifizierte affinitätsangereicherte Pool aus dem SELEX-Umlauf 12 wurde an einem 12%igen Polyacrylamidgel gereinigt und zwischen HindIII- und PstI-Stellen in den JM109-Stamm von *E. coli* kloniert (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Auflage, 3. Bd., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989)). Einzelne Klone wurden verwendet, um Plasmide durch alkalische Lyse herzustellen. Die Plasmide wurden an der Insertregion unter Verwendung des Vorwärts-Sequenzierungsprimers und Sequenase 2.0 (Amersham, Arlington Heights, IL) nach dem Protokoll des Herstellers sequenziert.

D. Ermittlung der scheinbaren Gleichgewichtsdissoziationskonstanten und der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten

[0130] Die Bindung von ssDNA-Liganden bei niedrigen Konzentrationen an verschiedene PDGF-Konzentrationen wurde durch das Nitrocellulosefilterverfahren wie beschrieben bestimmt (Green et al., Chemistry and Biology 2, 683-695 (1995)). Die Konzentrationen von PDGF-Stammlösungen (in PBS) wurden aus den Absorptionswerten bei 280 nm unter Verwendung der folgenden e_{280} -Werte bestimmt, die aus den Aminosäuresequenzen berechnet wurden (S.C. Gill und P.H. von Hippel, Anal. Biochem. 182, 319-326 (1989)): $19.500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für PDGF-AA, $15.700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für PDGF-AB und $11.800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für PDGF-BB. ssDNA für alle Bindungsexperimente wurde mittels Elektrophorese an 8 % (> 80 Nucleotide) oder 12 % (< 40 Nucleotide) Polyacrylamid/7 M Harnstoff enthaltenden Gelen gereinigt. Alle ssDNA-Liganden wurden auf 90 °C in Bindungspuffer bei hoher Verdünnung ($\sim 1 \text{ nM}$) 2 Minuten lang erhitzt und auf Eis gekühlt, bevor sie weiter in die Proteinlösung verdünnt wurden. Die Bindungsgemische wurden typischerweise 15 Minuten lang bei 37 °C vor Trennung auf Nitrocellulosefiltern inkubiert.

[0131] Die Bindung von DNA-Liganden (L) an PDGF-AA (P) wird mit dem bimolekularen Bindungsmodell hinreichend beschrieben, für das der Anteil gebundener DNA im Gleichgewicht (q) durch Gl. 1 bestimmt wird:

$$q = \left\{ f/2[L]_t \right\} \{ [P]_t + [L]_t + K_d - [([P]_t + [L]_t + K_d)^2 - 4[P]_t [L]_t]^{1/2} \} \quad (1)$$

wobei $[P]_t$ und $[R]_t$ Gesamtprotein- und Gesamt-DNA-Konzentrationen sind, K_d die Gleichgewichtsdissoziationskonstante ist und f die Effizienz der Rückhaltung von Protein-DNA-Komplexen an Nitrocellulosefiltern ist (Irvine et al., J. Mol. Biol. 222, 739-761 (1991); Jellinek et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 11227-11231 (1993)).

[0132] Die Bindung von DNA-Liganden an PDGF-AB und PDGF-BB ist biphasisch und kann durch ein Modell beschrieben werden, bei dem der DNA-Ligand aus zwei nicht gegenseitig umwandelbaren Komponenten (L_1 und L_2) besteht, die an das Protein mit verschiedenen Affinitäten binden, die durch entsprechende Dissoziationskonstanten, K_{d1} und K_{d2} , beschrieben werden (Jellinek et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 11227-11231 (1993)). In diesem Fall ist die explizite Lösung für den Anteil gebundener DNA (q) durch Gl. 2 gegeben,

$$q = f \left(\frac{\chi_1 K_{d1}}{1 + K_{d1} [P]} + \frac{\chi_2 K_{d2}}{1 + K_{d2} [P]} \right) [P] \quad (2)$$

mit

$$[P]_t = \frac{[P]_t}{1 + \frac{\chi_1 K_{d1} [L]_t}{1 + K_{d1} [P]} + \frac{\chi_2 K_{d2} [L]_t}{1 + K_{d2} [P]}}$$

wobei χ_1 und χ_2 ($= 1 - \chi_1$) die Molbrüche von L_1 und L_2 sind. Die K_d -Werte für die Bindung von DNA-Liganden an PDGF wurden durch Anpassen der Datenpunkte an Gl. 1 (für PDGF-AA) oder Gl. 2 (für PDGF-AB und PDGF-BB) unter Verwendung des nichtlinearen Verfahrens der kleinsten Quadrate berechnet.

[0133] Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (K_{off}) wurden ermittelt, indem die Menge an ^{32}P -5'-endmarkierten minimalen Liganden (0,17 nM), gebunden an PDGF-AB (1 nM), als Funktion der Zeit gemessen wurde, gefolgt von der Zugabe eines 500fachen Überschusses unmarkierter Liganden unter Anwendung der Nitrocellulosebindung als Trennverfahren. Die k_{off} -Werte wurden durch Anpassen der Datenpunkte an die Geschwindigkeitsgleichung erster Ordnung (Gl. 3). bestimmt.

$$(q - q_\infty)/(q_0 - q_\infty) = \exp(-k_{off} t) \quad (3)$$

wobei q, q_0 und q_∞ die Anteile von an PDGF-AB gebundener DNA zu einer beliebigen Zeit (t), $t = 0$ bzw. $t = \infty$ darstellen.

E. Ermittlungen von Minimal-Liganden

[0134] Um eine Population von 5'-Ende-markierten, vom 3'-Ende her fortlaufend trunkierten DNA-Liganden zu erzeugen, wurde ein Primer, der zum 3'-unveränderbaren Sequenzregion eines DNA-Ligandentemplats (trunkierter Primer 5N2, Tabelle 7; Seq.-ID Nr. 92) komplementär war, am 5'-Ende mit [γ -³²P]-ATP und T4-Polynukleotidkinase radiomarkiert, an das Templat anelliert und mit Sequenase (Amersham, Arlington Heights, IL) und einem Gemisch aller vier dNTPs und ddNTPs extendiert. Nach Inkubation in Bindungspuffer 15 Minuten lang bei 37 °C wurden die Fragmente dieser Population, die eine hochaffine Bindung an PDGF-AB beibehielten, von jenen mit schwächerer Affinität durch Nitrocellulosefiltertrennung getrennt. Die elektrophoretische Auflösung der Fragmente an Gelen mit 8 % Polyacrylamid/7 M Harnstoff vor und nach der Affinitätsselektion ermöglicht die Ermittlung der 3'-Begrenzung. Um eine Population von 3'-Ende-markierten, vom 5'-Ende her fortlaufend trunkierten DNA-Liganden zu erzeugen, wurden die DNA-Liganden am 3'-Ende mit [α -³²P]-Cordycepin-5'-triphosphat (New England Nuclear, Boston, MA) und T4-RNA-Ligase (Promega, Madison, WI) radioaktiv markiert, am 5'-Ende mit ATP und T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert und mit Lambda-Exonuclease (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) partiell verdaut. Partieller Verdau von 10 pmol 3'-markiertem Liganden wurde in einem Volumen von 100 µl mit 7 mM Glycin-KOH (pH 9,4), 2,5 mM MgCl₂, 1 µg/ml BSA, 15 µg tRNA und 4 Units Lambda-Exonuclease 15 Minuten lang bei 37 °C durchgeführt. Die 5'-Begrenzung wurde auf analoge Weise zu jener ermittelt, die für die 3'-Begrenzung beschrieben wurde.

F. Schmelztemperatur-(Tm)-Messungen

[0135] Schmelzprofile für die minimalen DNA-Liganden wurden an einem Cary-Spektrophotometer, Modell 1E, erlangt. Oligonukleotide (320-400 nM) wurden in PBS, PBSM oder PBS mit 1 mM EDTA auf 95 °C erhitzt und vor der Schmelzprofilermittlung auf Raumtemperatur abgekühlt. Schmelzprofile wurden durch Erwärmen der Proben mit einer Geschwindigkeit von 1 °C/min von 15 bis 95 °C und Aufzeichnen der Absorption alle 0,1 °C erzeugt. Die erste Ableitung der Datenpunkte wurde unter Verwendung des Grafikprogramms Kaleida-Graph (Synergy Software, Reading, PA) berechnet. Die Werte der ersten Ableitung wurden unter Verwendung einer 55-Punkte-Glättungsfunktion geglättet, indem jeder Punkt mit 27 Datenpunkten an beiden Seiten gemittelt wurde. Das Maximum der geglätteten Kurven erster Ableitung wurde verwendet, um die T_m-Werte abzuschätzen.

G. Vernetzung von 5-Iod-2'-desoxyuridin-substituierten DNA-Liganden mit PDGF-AB

[0136] DNA-Liganden, die einzelne oder mehrere Substitutionen von Thymidin mit 5'-Iod-2'-desoxyuridin enthielten, wurden unter Anwendung des Festphasen-Phosphoramidit-Verfahrens synthetisiert. Um auf die Fähigkeit zur Vernetzung zu testen, wurden Spurenmengen 5'-³²P-endmarkierter Liganden mit PDGF-AB (100 nM) in Bindungspuffer bei 37 °C 15 Minuten lang vor der Bestrahlung inkubiert. Das Bindungsgemisch wurde in eine Küvette mit 1 cm Weglänge übertragen, die bei 37 °C temperiert war und bei 308 nm 25-400 s lang bei 20 Hz unter Verwendung eines geladenen XeCl-Excimer-Lasers (Lumonics, Modell EX748) bestrahlt. Die Küvette wurden 24 cm jenseits des Brennpunkts einer konvergenten Linse positioniert, wobei die Energie am Brennpunkt 175 mJoule/Puls betrug. Nach der Bestrahlung wurden Aliquoten mit einem gleichen Volumen 0,1 % SDS enthaltendem Formamid-Beladungspuffer vermischt und bei 95 °C 5 Minuten lang vor Trennung des vernetzten PDGF/Ligand-Komplexes vom freien Liganden an Gelen mit 8 % Polyacrylamid/7 M Harnstoff inkubiert.

[0137] Um die Proteinstelle der Vernetzung für den Liganden 20t-I4 zu identifizieren, wurden Bindung und Bestrahlung in einem größeren Maßstab durchgeführt. PDGF-AB und 5'-³²P-endmarkierter Ligand wurden bei jeweils 1 µM in PBSM in zwei 1-ml-Reaktionsgefäßern wie oben beschrieben inkubiert und bestrahlt (300 s). Die Reaktionsgemische wurden vereinigt, mit Ethanol präzipitiert und in 0,3 ml Tris-HCl-Puffer (100 mM, pH 8,5) resuspendiert. Der vernetzte PDGF-AB/Ligand-Komplex wurde mit 0,17 µg/ml modifiziertem Trypsin (Boehringer Mannheim) 20 Stunden lang bei 37 °C verdaut. Das Verdauungsgemisch wurde mit Phenol/Chloroform, Chloroform extrahiert und dann mit Ethanol präzipitiert. Das Pellet wurde in Wasser und einem gleichen Volumen Formamid-Beladungspuffer mit 5 Vol.-% β-Mercaptoethanol (kein SDS) resuspendiert, bei 95 °C 5 Minuten lang inkubiert und an einem Gel von 40 cm mit 8 % Polyacrylamid/7 M Harnstoff aufgetrennt. Vernetztes Tryptisches-Peptid/Ligand, das als zwei nahe beieinander liegende Banden ungefähr 1,5 cm über der Bande des freien Liganden wanderte, wurde aus dem Gel herausgeschnitten und mittels Crush-and-soak-Verfahren eluiert und mit Ethanol präzipitiert. Das getrocknete vernetzte Peptid (etwa 160 pmol auf Basis der spezifischen Aktivität) wurde mittels Edman-Abbau sequenziert (Midwest Analytical, Inc., St. Louis, MO).

H. Rezeptorbindungsstest

[0138] Die Bindung von ^{125}I -PDGF-AA und ^{125}I -PDGF-BB an Schweine-Aortaendothel-(PAE-)Zellen, die mit PDGF- α - oder - β -Rezeptoren transfiziert worden waren, wurde wie beschrieben durchgeführt (Heldin et al., EMBO J. 7, 1387-1394 (1988)). Verschiedene Konzentrationen von DNA-Liganden wurden der Zellkultur ($1,5 \text{ cm}^2$) in 0,2 ml phosphatgepufferter Salzlösung zugegeben, die mit 1 mg Rinderserumalbumin pro ml ergänzt war, zusammen mit ^{125}I -PDGF-AA (2 ng, 100.000 cpm) oder ^{125}I -PDGF-BB (2 ng, 100.000 cpm). Nach Inkubation bei 4 °C 90 Minuten lang wurden die Zellkulturen gewaschen und die zellgebundene Radioaktivität in einem γ -Zähler bestimmt (Heldin et al., EMBO J. 7, 1387-1394 (1988)).

I. [3H]Thymidin-Inkorporationstest

[0139] Die Inkorporation von $[^3\text{H}]$ Thymidin in PAE-Zellen, die den PDGF- β -Rezeptor exprimieren, als Reaktion auf 20 ng/ml PDGF-BB oder 10 % fötales Kälberserum und in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von DNA-Liganden wurde wie beschrieben durchgeführt (Mori et al., J. Biol. Chem. 266, 21158-21164 (1991)). Nach Inkubation 24 Stunden lang bei 37 °C wurde die in DNA inkorporierte $[^3\text{H}]$ -Radioaktivität unter Verwendung eines β -Zählers bestimmt.

BEISPIEL 8. ssDNA-LIGANDEN VON PDGF

[0140] Hochaffine DNA-Liganden für PDGF-AB wurden durch das SELEX-Verfahren aus einer Bibliothek von $\sim 3 \times 10^{14}$ Molekülen (500 pmol) einzelsträngiger DNA identifiziert, die an vierzig zusammenhängenden Positionen randomisiert war (Tabelle 7; Seq.-ID Nr. 90). Die PDGF-gebundene DNA wurde von ungebundener DNA durch Polyacrylamidgelektrophorese im ersten Umlauf und durch Nitrocellulosefilterbindung in den nachfolgenden Umläufen getrennt. Nach 12 SELEX-Umläufen band der affinitätsangereicherte Pool an PDGF-AB mit einer scheinbaren Dissoziationskonstante (K_d) von $\sim 50 \text{ pM}$ (Daten nicht gezeigt). Dies stellte eine Verbesserung der Affinität um das ca. 700fache im Vergleich zur anfänglichen randomisierten DNA-Bibliothek dar. Dieser affinitätsangereicherte Pool wurde verwendet, um eine Klonierungsbibliothek zu erzeugen, aus der 39 Isolate sequenziert wurden. Zweiunddreißig dieser Liganden wiesen einzigartige Sequenzen auf (Tabelle 8; Seq.-ID Nr. 93-124). Liganden, die der Ermittlung der Minimalsequenz unterzogen wurden, sind mit einem Sternchen (*) neben der Nummer des Klons markiert. Die Klonnummern, von denen sich erwies, dass sie eine Bindung mit hoher Affinität als Minimalliganden beibehielten, sind kursiv dargestellt. Alle in Tabelle 8 gezeigten Liganden wurden auf ihre Fähigkeit hin gescreent, an PDGF-AB unter Anwendung des Nitrocellulosefilterbindungsverfahrens zu binden. Um die besten Liganden aus dieser Gruppe zu ermitteln, bestimmten die Erfinder ihre relativen Affinitäten für PDGF-AB durch Messen des Anteils 5'- ^{32}P -endmarkierter Liganden, die an PDGF-AB über einen Bereich von Proteinkonzentrationen banden. Für die Liganden, die an PDGF-AB mit hoher Affinität banden, wurde die Affinität gegen PDGF-BB und PDGF-AA ebenfalls untersucht: In allen Fällen war die Affinität von Liganden für PDGF-AB und PDGF-BB vergleichbar, während die Affinität für PDGF-AA beträchtlich niedriger war (Daten nicht gezeigt).

[0141] Einundzwanzig der zweiunddreißig einzigartigen Liganden können zu einer in Tabelle 9 gezeigten Sequenzfamilie gruppiert werden. Die Sequenzen der anfänglich randomisierten Region (Großbuchstaben) sind gemäß dem Konsensus-Dreiweg-Helix-Verbindungsmodell angeglichen. Nucleotide in der invarianten Sequenzregion (Kleinbuchstaben) sind nur gezeigt, wo sie an der vorhergesagten Sekundärstruktur beteiligt sind. Mehrere Liganden wurden „abgeschaltet“ (Gleichheitszeichen), um ihre Beziehung zum Konsensusmotiv durch zirkuläre Permutation zu zeigen. Jene Nucleotide, von denen vorhergesagt wurde, dass sie an der Basenpaarung teilnehmen, sind mit unterstrichenen invertierten Pfeilen bezeichnet, wobei die Pfeilspitzen zur Helixverbindung zeigen. Die Sequenzen werden in zwei Gruppen, A und B, unterteilt, und zwar auf Basis des ersten einzelsträngigen Nucleotids (vom 5'-Ende her) an der Helixverbindung (A oder G, zwischen Helices II und III). Fehlpaarungen in den Helixregionen sind mit Punkten unter den entsprechenden Buchstaben gezeigt (G-T- und T-G-Basenpaare waren erlaubt). An Stellen, wo einzelne Nucleotidausbuchungen auftreten, ist das fehlgepaarte Nucleotid über dem Rest der Sequenz zwischen seinen Nachbarn gezeigt.

[0142] Diese Klassifikation basiert teilweise auf Sequenzhomologie zwischen diesen Liganden, jedoch zum größeren Teil auf Basis eines gemeinsamen Sekundärstrukturmotivs: einer Dreiweg-Helixverbindung mit einer Dreinucleotidschleife am Verzweigungspunkt (Fig. 3). Diese Liganden wurden in zwei Gruppen unterteilt: Für Liganden in Gruppe A weist die Schleife am Verzweigungspunkt eine invariante Sequenz AGC auf, und in Gruppe B ist diese Sequenz G(T/G)(C/T). Das vorgeschlagene Konsensus-Sekundärstrukturmodell wird durch Basenpaarungs-Kovariation an nicht-konservierten Nucleotiden in den Helices unterstützt (Tabelle 10). Da die Dreiweg-Verbindungen in kontinuierlichen DNA-Strängen kodiert werden, enden zwei der Helices in Schleifen

am von der Verbindungsstelle entfernten Ende. Diese Schleifen sind hinsichtlich Länge sowie Sequenz höchst variabel. Darüber hinaus treten die Schleifen durch zirkuläre Permutation des Konsensusmotivs in allen drei Helices auf, obgleich sie in Helices II und III am häufigsten sind. Zusammen legen diese Beobachtungen nahe, dass die von der Helixverbindungsstelle entfernten Regionen für die hochaffine Bindung an PDGF-AB nicht von Bedeutung sind. Die höchst konservierten Nucleotide finden sich in der Tat nahe der Helixverbindungsstelle (Tabelle 9, [Fig. 3](#)).

BEISPIEL 9. ANALYSE DER BEGRENZUNGEN

[0143] Die für hochaffine Bindung notwendige Minimalsequenz wurde für die sechs besten Liganden für PDGF-AB ermittelt. Im Allgemeinen können die Informationen über die 3'- und 5'-Minimalsequenzbegrenzungen durch partielles Fragmentieren des Nucleinsäureliganden und anschließendes Selektieren auf diejenigen Fragmente erlangt werden, die hohe Affinität für das Target beibehalten. Bei RNA-Liganden können die Fragmente bequem durch milde alkalische Hydrolyse erzeugt werden (Tuerk et al., J. Mol. Biol. 213, 749-761 (1990); Jellinek et al., Biochemistry 33, 10450-10456 (1994); Jellinek et al., Biochemistry 34, 11363-11372 (1995); Green et al., J. Mol. Biol. 247, 60-68 (1995)). Da DNA gegen Lauge resistenter ist, wird für DNA ein alternatives Verfahren der Erzeugung von Fragmenten benötigt. Um die 3'-Begrenzung zu ermitteln, wurde eine am 3'-Ende fortlaufend trunkierte Population von Ligandenfragmenten erzeugt, indem der am 5'-Ende markierte Primer an die invariante 3'-Sequenz eines DNA-Liganden unter Anwendung des Didesoxyverfahrens anellierte. Diese Population wurde mittels Nitrocellulosefiltration affinitätsselektiert, und die kürzesten Fragmente (vom 3'-Ende her trunkiert), die eine hochaffine Bindung für PDGF-AB beibehalten, wurden mittels Polyacrylamidgelektrophorese identifiziert. Die 5'-Begrenzung wurde auf analoge Weise mit der Ausnahme ermittelt, dass eine Population von am 3'-Ende markierten, am 5'-Ende fortlaufend trunkierten Ligandenfragmenten durch partiellen Verdau mit Lambda-Exonuclease erzeugt wurde. Der Minimalligand ist dann als die Sequenz zwischen den beiden Begrenzungen definiert. Es ist wichtig zu beachten, dass, obgleich die aus diesen Experimenten stammenden Informationen zweckdienlich sind, die vorgeschlagenen Begrenzungen keinesfalls absolut sind, da die Begrenzungen Terminus für Terminus untersucht werden. Die nicht trunkierten (radiomarkierten) Termini können die Bindung erhöhen, vermindern oder keine Wirkung auf die Bindung aufweisen (Jellinek et al., Biochemistry 33, 10450-10456 (1994)).

[0144] Von den sechs Minimalliganden, für die Begrenzungen experimentell ermittelt wurden, banden zwei (20t (Seq.-ID Nr. 172) und 41t (Seq.-ID Nr. 174); trunkierte Versionen der Liganden 20 und 41) mit Affinitäten, die mit ihren Analoga voller Länge vergleichbar waren (innerhalb eines Faktors von 2), und vier wiesen beträchtlich niedrigere Affinitäten auf. Die beiden Minimalliganden, die eine hochaffine Bindung an PDGF beibehielten, 20t und 41t, enthalten das vorhergesagte Dreiweg-Helixverbindungssekundärstrukturmotiv ([Fig. 4](#)). Die Sequenz des dritten Minimalliganden, der an PDGF-AB mit hoher Affinität bindet, 36t (Seq.-ID Nr. 173), wurde aus der Kenntnis des Konsensusmotivs hergeleitet ([Fig. 4](#)). In nachfolgenden Experimenten fanden die Erfinder, dass die einzelsträngige Region am 5'-Ende von Ligand 20t für die hochaffine Bindung unbedeutend ist. Darüber hinaus können die Trinucleotidschleifen an Helices II und III im Liganden 36t (GCA und CCA) durch Pentaethylenglykol-Spacer ersetzt werden (siehe unten). Diese Experimente stellen weitere Belege für die Bedeutung der Helixverbindungsregion bei der hochaffinen Bindung an PDGF-AB bereit.

[0145] Die Bindung der Minimalliganden 20t, 36t und 41t an variierende Konzentrationen von PDGF-AA, PDGF-AB und PDGF-BB ist in den [Fig. 5A](#), [Fig. 5B](#) und [Fig. 5C](#) gezeigt. Im Einklang mit den Bindungseigenschaften ihrer Analoga voller Länge binden die Minimalliganden an PDGF-AB und PDGF-BB mit wesentlich höherer Affinität als an PDGF-AA ([Fig. 5A](#), [Fig. 5B](#) und [Fig. 5C](#), Tabelle 11). In der Tat ist ihre Affinität für PDGF-AA mir der von Zufalls-DNA vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Die Bindung an PDGF-AA wird mit einer monophasischen Bindungsgleichung hinreichend beschrieben, während die Bindung an PDGF-AB und PDGF-BB in besonderem Maße biphasisch ist. In früheren SELEX-Experimenten erwies sich die biphasische Bindung als Konsequenz der Existenz von trennbaren Nucleinsäurespezies, die an ihr Target-Protein mit unterschiedlichen Affinitäten binden (Jellinek et al., Biochemistry 34, 11363-11372 (1995), sowie nicht publizierte Ergebnisse). Die Identität der Fraktionen hoher und niedriger Affinität ist derzeit nicht bekannt. Da diese DNA-Liganden, die hier beschrieben werden, chemisch synthetisiert wurden, ist es möglich, dass die Fraktion, die an PDGF-AB und PDGF-BB mit niedrigerer Affinität bindet, chemisch unvollkommene DNA darstellt. Alternativ dazu können die hoch- und niedrigaffinen Spezies stabile Konformationsisomere darstellen, die an die PDGF-B-Kette mit unterschiedlichen Affinitäten binden. Auf alle Fälle ist die Bindungskomponente mit der höheren Affinität in allen Fällen die am häufigsten vorkommende Ligandspezies ([Fig. 5B](#) und [Fig. 5C](#)). Zum Vergleich bindet ein 39-mer-DNA-Ligand, der an menschliches Thrombin mit einer K_d von 0,5 nM bindet (Ligand T39 (Seq.-ID Nr. 177): 5'-CAGTCGTGGTAGGGCAGGTTGGGTGACTTCGTGGAA[3'T], wobei [3'T] ein 3'-3'-verbundenes Thymidinnucleotid darstellt, das zur Verminderung von 3'-Exonucleaseabbau angefügt

wurde) und eine vorhergesagte Bäumchenstruktur aufweist, an PDGF-AB mit einer K_d von 0,23 μM (Daten nicht gezeigt).

BEISPIEL 10. KINETISCHE STABILITÄT VON PDGF-NUCLEINSÄURELIGANDENKOMPLEXEN

[0146] Um die kinetische Stabilität der PDGF-AB/DNA-Komplexe zu beurteilen, wurden die Dissoziationsgeschwindigkeiten bei 37 °C für die Komplexe der Minimalliganden 20t, 36t und 41t (Seq.-ID Nr. 172-174) mit PDGF-AB bestimmt, indem die Menge von an PDGF-AB (1 nM) gebundenen radioaktiv markierten Liganden (0,17 nM) als Funktion der Zeit nach Zugabe eines großen Überschusses unmarkierter Liganden gemessen wurde ([Fig. 6](#)). Bei diesen Protein- und DNA-Ligandenkonzentrationen bindet nur der hochaffine Anteil der DNA-Liganden an PDGF-AB. Die folgenden Werte für die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten wurden bestimmt, indem die in [Fig. 6](#) gezeigten Datenpunkte an die Geschwindigkeitsgleichung erster Ordnung angepasst wurden: $4,5 +/− 0,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 2,6 \text{ min}$) für Ligand 20t, $3,0 +/− 0,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 3,8 \text{ min}$) für Ligand 36t und $1,7 +/− 0,1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 6,7 \text{ min}$) für Ligand 41t. Die berechneten Assoziationsgeschwindigkeiten für die Dissoziationskonstanten und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten ($k_{on} = k_{off}/K_d$) sind $3,1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für 20t, $3,1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für 36t und $1,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für 41t.

BEISPIEL 11. THERMISCHE SCHMELZEIGENSCHAFTEN

[0147] Um die Fähigkeit der Minimalliganden 20t, 36t und 41t zu untersuchen, gefaltete Strukturen anzunehmen, wurden ihre Schmelztemperaturen (T_m -Werte) aus der UV-Absorption versus Temperaturprofile in PBSM- und PBSE-Puffern bestimmt. Bei den in diesen Experimenten verwendeten Oligonucleotidkonzentrationen (320-440 nM) wurden nur die monomeren Spezies als einzelne Banden an nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen beobachtet (Daten nicht gezeigt). Das thermische Schmelzen der Liganden 20t und 41t wird durch ein Zweizustands-(gefaltetes und ungefaltetes) Modell mit linear abfallenden Basislinien (Petersheim und Turner, Biochem. 22, 256-263 (1983)) mit T_m -Werten von $43,8 +/− 0,4 \text{ }^\circ\text{C}$ bzw. $49,2 +/− 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ in PBSM-Puffer gut beschrieben. In PBSE-Puffer wurden ähnliche T_m -Werte erlangt: $44,8 +/− 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ für Ligand 20t und $48,0 +/− 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ für Ligand 41t. Ligand 36t zeigte ein komplexeres thermisches Schmelzprofil, bei dem zwei ausgeprägte Übergänge beobachtet wurden. In diesem Fall wurden die Daten durch ein Dreizustandsmodell gut beschrieben, bei dem der vollständig gefaltete und die ungefalteten Zustände über ein partiell ungefaltetes Zwischenprodukt verbunden sind. Unter Verwendung dieses Modells erlangten die Erfinder zwei T_m -Werte für Ligand 36t: $47,0 +/− 0,9 \text{ }^\circ\text{C}$ und $67,1 +/− 3,8 \text{ }^\circ\text{C}$ in PBSM-Puffer und $44,2 +/− 1,7 \text{ }^\circ\text{C}$ und $64,3 +/− 4,1 \text{ }^\circ\text{C}$ in PBSE-Puffer.

BEISPIEL 12. PHOTOVERNETZUNG VON NUCLEINSÄURELIGANDEN UND PDGF

[0148] Um die Stellen an den DNA-Liganden und PDGF zu ermitteln, die in enger Verbindung stehen, wurde eine Serie von Photovernetzungsexperimenten mit 5'-Iod-2'-desoxyuridin-(IdU)-substituierten DNA-Liganden 20t, 36t und 41t (Seq.-ID Nr. 172-174) durchgeführt. Nach monochromatischer Anregung bei 308 nm nehmen 5-Iod- und 5-Brom-substituierte Pyrimidinnukleotide nach Zwischensystemkreuzung vom Übergang vom anfänglichen n zu π^* einen reaktiven Tripletzustand ein. Die angeregte Tripletzustand-Spezies reagiert dann mit elektronenreichen Aminosäureresten (wie z.B. Trp, Tyr und His), die sich in ihrer unmittelbaren Nachbarschaft befinden, um eine kovalente Vernetzung zu liefern. Dieses Verfahren ist ausgiebig bei Untersuchungen von Nucleinsäure-Protein-Wechselwirkungen verwendet worden, da es die Bestrahlung mit Licht bei > 300 nm ermöglicht, was die Photoschädigung minimiert (Willis et al., Nucleic Acids Res. 22, 4947-4952 (1994); W.T. Stump und K.B. Hall, RNA 1, 55-63 (1995); Willis et al., Science 262, 1255-1257 (1993); Jensen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 12220-12224 (1995)). Analoga der Liganden 20t, 36t und 41t wurden synthetisiert, bei denen alle Thymidinreste durch IdU-Reste unter Anwendung des Festphasen-Phosphoramiditverfahrens ersetzt waren. Die Affinität dieser IdU-substituierten Liganden für PDGF-AB war im Vergleich zu den unsubstituierten Liganden etwas verstärkt, und auf Basis des Auftretens von Banden mit langsamerelektrophoretischer Mobilität an Gelen mit 8 % Polyacrylamid/7 M Harnstoff vernetzten alle drei 5'-Ende-markierten IdU-substituierten Liganden an PDGF-AB nach Bestrahlung bei 308 nm (Daten nicht gezeigt). Die höchste Vernetzungseffizienz wurde mit dem IdU-substituierten Liganden 20t beobachtet. Um die spezifische(n) IdU-Position(en) zu identifizieren, die für die beobachtete Vernetzung verantwortlich ist/sind, wurden sieben einzeln oder mehrfach IdU-substituierte Analoga von 20t auf ihre Fähigkeit zur Photovernetzung an PDGF-AB getestet: Liganden 20t-I1 bis 20t-I7 (5'-TGGGAGGGCGCGT¹T¹CT¹T¹CGT²GGT³T⁴ACT⁵T⁶T⁶AGT⁷CCCG-3' (Seq.-ID Nr. 178-184), wobei die Zahlen IdU-Substitutionen an gekennzeichneten Thymidinnukleotiden für die sieben Liganden bezeichnen). Von diesen sieben Liganden wurde eine effiziente Vernetzung an PDGF-AB nur mit Ligand 20t-I4 beobachtet. Die photoreaktive IdU-Position entspricht dem 3'-proximalen Thymidin in der Schleife an der Helixverbindung ([Fig. 4](#)).

[0149] Um den/die vernetzte(n) Aminosäurerest(e) an PDGF-AB zu identifizieren, wurde ein Gemisch von 5'-Ende-markiertem 20t-I4 und PDGF-AB 15 Minuten lang bei 37 °C inkubiert, gefolgt von Bestrahlung bei 308 nm. Das Reaktionsgemisch wurde dann mit modifiziertem Trypsin verdaut und die vernetzten Fragmente an einem Gel mit 8 % Polyacrylamid/7 M Harnstoff aufgelöst. Edman-Abbau des aus jener Bande gewonnenen Peptidfragments, die der DNA-Bande am nächsten wanderte, offenbarte die Aminosäuresequenz KKPIXKK (Seq.-ID Nr. 185), wobei X eine modifizierte Aminosäure bezeichnet, die mit den 20 derivatisierten Aminosäurestandards nicht identifiziert werden konnte. Diese Peptidsequenz, worin X Phenylalanin ist, entspricht den Aminosäuren 80-86 in der PDGF-B-Kette (Johnsson et al., EMBO J. 3, 921-928 (1984)), die in der Kristallstruktur von PDGF-BB einen Abschnitt der lösungsmittellexponierten Schleife III umfasst (Oefner et al., EMBO J. 11, 3921-3926 (1992)). In der PDGF-A-Kette tritt diese Peptidsequenz nicht auf (Betsholtz et al., Nature 320, 695-699 (1986)). Zusammen begründen diese Daten einen Punktkontakt zwischen einem spezifischen Thymidinrest im Liganden 20t und Phenylalanin 84 der PDGF-B-Kette.

BEISPIEL 13. HEMMUNG VON PDGF DURCH NUCLEINSÄURELIGANDEN

[0150] Um zu ermitteln, ob die DNA-Liganden für PDGF fähig waren, die Wirkungen von PDGF-Isoformen an kultivierten Zellen zu hemmen, wurden die Wirkungen auf die Bindung von ^{125}I -markierten PDGF-Isoformen an PDGF- α - und - β -Rezeptoren bestimmt, die in Schweine-Aortaendothel-(PAE-)Zellen durch Transfektion stabil exprimiert wurden. Die Liganden 20t, 36t und 41t (Seq.-ID Nr. 172-174) hemmten alle effizient die Bindung von ^{125}I -PDGF-BB an PDGF- α -Rezeptoren ([Fig. 7](#)) oder PDGF- β -Rezeptoren (Daten nicht gezeigt) mit halbmaximalen Wirkungen um 1 nM DNA-Ligand. Der gegen Thrombin gerichtete und als Kontrolle enthaltene DNA-Ligand T39 zeigte keine Wirkung. Keiner der Liganden war fähig, die Bindung von ^{125}I -PDGF-AA an den PDGF- α -Rezeptor zu hemmen ([Fig. 7](#)), was mit der beobachteten Spezifität der Liganden 20t, 36t und 41t für PDGF-BB und PDGF-AB im Einklang steht.

[0151] Die Fähigkeit der DNA-Liganden, die mitogenen Wirkungen von PDGF-BB auf PDGF- β -Rezeptoren exprimierende PAE-Zellen zu hemmen, wurde untersucht. Wie in [Fig. 8](#) gezeigt ist, wurde die stimulierende Wirkung von PDGF-BB auf den Einbau von [^3H]-Thymidin durch die Liganden 20t, 36t und 41t neutralisiert. Ligand 36t zeigte eine halbmaximale Hemmung bei der Konzentration von 2,5 nM; Ligand 41t war etwas effizienter und 20t etwas weniger effizient. Der Kontroll-Ligand T39 hatte keine Wirkung. Darüber hinaus hemmte keiner der Liganden die stimulierenden Wirkungen von fötalem Kälberserum auf den Einbau von [^3H]Thymidin in diese Zellen, was beweist, dass die hemmenden Wirkungen für PDGF spezifisch sind.

BEISPIEL 14. NUCLEOTIDSUBSTITUTIONEN IM POST-SELEX-VERFAHREN

[0152] Die Stabilität von Nucleinsäuren gegen Nucleasen ist ein wichtiger Gesichtspunkt im Bestreben, auf Nucleinsäure basierende Therapeutika zu entwickeln. Experimente haben gezeigt, dass zahlreiche und in manchen Fällen die meisten der aus SELEX stammenden Liganden mit modifizierten Nucleotiden substituiert werden können, die dem Nucleaseverdau widerstehen, ohne die hochaffine Bindung zu beeinträchtigen (Green et al., Chemistry and Biology 2, 683-695 (1995); Green et al., J. Mol. Biol. 247, 60-68 (1995)). Experimente dieses Typs mit den hierin beschriebenen DNA-Liganden legen nahe, dass Substitutionen mit modifizierten Nucleotiden an vielen Positionen toleriert werden ([Fig. 9](#), Seq.-ID Nr. 175-176). Im Speziellen haben die Erfinder die Substitution von 2'-Desoxyribonucleotiden im Liganden 36t durch 2'-O-Methyl-2'-desoxy- und 2'-Fluor-2'-desoxyribonucleotide untersucht, indem die PDGF-AB-Bindungseigenschaften des einfach oder mehrfach substituierten Liganden 36t untersucht wurden. Das in [Fig. 9](#) angegebene Substitutionsmuster ist mit hochaffiner Bindung an PDGF-AB vereinbar. Darüber hinaus toleriert dieser Ligand die Substitution der Trinucleotidschleifen an den Enden der Helices II und III durch Pentaethylenglykol-Spacer (Glen Research, Sterling, VA) ([Fig. 9](#)). Diese DNA-Liganden stellen daher Leitverbindungen für eine neue Klasse von hochaffinen, spezifischen Antagonisten von PDGF-AB und PDGF-BB dar.

BEISPIEL 15. EXPERIMENTELLES VERFAHREN ZUR EVOLUTION VON 2'-FLUOR-2'-DESOXYPYRIMIDIN-RNA-LIGANDEN FÜR PDGF UND ERLANGTE RNA-SEQUENZEN

A. 2'-Fluor-2'-desoxypyrimidin-RNA-SELEX

[0153] SELEX mit 2'-Fluor-2'-desoxypyrimidin-RNA mit PDGF-AB als Target wurde im Wesentlichen wie vorher beschrieben (siehe oben und Jellinek et al., siehe oben (1993, 1994)) unter Verwendung des in Tabelle 12 (Seq.-ID Nr. 125-127) gezeigten Primertemplatsatzes durchgeführt. Zusammenfassend wurde die 2'-Fluor-2'-desoxypyrimidin-RNA für Affinitätsselektionen durch In-vitro-Transkription aus synthetischen DNA-Templaten unter Verwendung von T7-RNA-Polymerase hergestellt (Milligan et al., Nucl. Acids Res. 15, 8783 (1987)).

Es wurden die vorher für die In-vitro-Transkription ausführlich beschriebenen Bedingungen (Jellinek et al., siehe oben (1994)) mit der Ausnahme verwendet, dass eine höhere Konzentration (3 mM) der 2'-Fluor-2'-desoxy-pyrimidin-nucleosidtriphosphate (2'-F-UTP und 2'-F-CTP) im Vergleich zu ATP und GTP (1 mM) verwendet wurde. Affinitätsselektionen wurden durchgeführt, indem PDGF-AB mit 2'-Fluor-2'-desoxypyrimidin-RNA zumindest 15 Minuten lang bei 37 °C in 0,01 % menschliches Serumalbumin enthaltendem PBS inkubiert wurde. Die Trennung von freier RNA von proteingebundener RNA wurde durch Nitrocellulosefiltration wie beschrieben durchgeführt (Jellinek et al. (1993, 1994), siehe oben). Die reverse Transkription der affinitätsselektierten RNA und Amplifikation mittels PCR wurden wie früher beschrieben durchgeführt (Jellinek et al., siehe oben (1994)). Es wurden neunzehn SELEX-Umläufe durchgeführt, die typischerweise zwischen 1 und 12 % der Eingangs-RNA selektierten. Für die ersten acht Selektionsumläufe wurde Suramin (3-15 µM) in den Selektionspuffer aufgenommen, um den Selektionsdruck zu erhöhen. Der affinitätsangereicherte Pool (Umlauf 19) wurde wie beschrieben (Schneider et al. (1992), siehe oben) kloniert und sequenziert. Es sind sechsundvierzig Sequenzen identifiziert worden, und die Sequenzen sind in Tabelle 13 gezeigt (Seq.-ID Nr. 128-170). Die Liganden einzigartiger Sequenz wurden auf ihre Fähigkeit hin gescreent, PDGF-AB mit hoher Affinität zu binden. Während Zufalls-2'-Fluorpyrimidin-RNA (Tabelle 12) an PDGF mit einer Dissoziationskonstante (Kd) von 35 +/- 7 nM band, banden viele der affinitätsselektierten Liganden an PDGF-AB mit ~100fach höheren Affinitäten. Unter den einzigartigen Liganden zeigten die Klone 9 ($K_d = 91 \pm 16 \text{ pM}$), 11 ($K_d = 120 \pm 21 \text{ pM}$), 16 ($K_d = 116 \pm 34 \text{ pM}$), 23 ($K_d = 173 \pm 38 \text{ pM}$), 25 ($K_d = 80 \pm 22 \text{ pM}$), 37 ($K_d = 97 \pm 29 \text{ pM}$), 38 ($K_d = 74 \pm 39 \text{ pM}$) und 40 ($K_d = 91 \pm 32 \text{ pM}$) die höchste Affinität für PDGF-AB (die Bindung aller dieser Liganden an PDGF-AB ist biphasisch, und die K_d für die Bindungskomponenten höherer Affinität ist angegeben).

BEISPIEL 16. EXPERIMENTELLE VERFAHREN

[0154] Dieses Beispiel stellt die allgemeinen Verfahren bereit, die in den Beispielen 17-19 für die Evolution von Nucleinsäureliganden für hKGF befolgt wurden und enthalten sind.

A. Materialien und Verfahren

[0155] Rekombinanter menschlicher Keratinozytenwachstumsfaktor (hKGF) und menschlicher Epidermiswachstumsfaktor (hEGF) wurden von Upstate Biotechnology Inc. (Lake Placid, NY) bezogen. haFGF, hbFGF, PDGF-AB, TGF β 1 und neutralisierender monoklonaler Anti-KGF-Antikörper wurden von R&D Systems (Minneapolis, MN) bezogen. Rekombinantes Ratten-KGF wurde von QED Advanced Research Technologies (San Diego, CA) bezogen. Menschliches Thrombin wurde von Enzyme Research Laboratories (South Bend, IN) bezogen. T4-DNA-Ligase, HpaII-Methylase und Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs (Beverly, MA) bezogen. Das Klonierungsset pCR-Script Amp SK(+) wurde von Stratagene (La Jolla, CA) bezogen. Reverse Transkriptase AMV wurde von Life Sciences (St. Petersburg, FL) bezogen. Taq-DNA-Polymerase wurde von Perkin Elmer (Foster City, CA) bezogen. Ultraraine Nucleotidtriphosphate wurden von Pharmacia (Piscataway, NJ) bezogen. $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP, $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP und 5'- ^{32}P -Cytidin-3',5'-Bis(phosphat)(5'- ^{32}P -pCp) wurden von DuPont NEN Research Products (Boston, MA) bezogen. ^{125}I -markiertes KGF wurde wie früher beschrieben hergestellt (Bottaro et al., J. Biol. Chem. 265, 12767-12770 (1990)). PC-3-Prostatakarzinomzellen wurden von ATCC erlangt (Katalognummer CRL1435). Balb/MK-Zellen und mit dem menschlichen KGF-Rezeptor transfizierte NIH3T3-Zellen (NIH3T3/KGFR) waren eine großzügige Spende von S. Aaronson, Mt. Sinai Medical Center, NY, und sind anderweitig beschrieben worden (Miki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 246-250 (1992); Miki et al., Science 251, 72-75 (1991); Weissman et al., Cell 32, 599-606 (1983)). T7-RNA-Polymerase, 2'-NH₂ und 2'-F-modifiziertes CTP und UTP wurden von NeXstar Pharmaceuticals, Inc. (Boulder, CO) bezogen. DNA-Oligonucleotide wurden von Operon Technologies, Inc. (Alameda, CA) bezogen. Nitrocellulose/Celloseacetat-Mischmatrix-HA-Filter mit 0,45 µm wurden von Millipore (Bedford, MA) bezogen. Calcium und Magnesium enthaltende phosphatgepufferte Salzlösung nach Dulbecco (DPBS) wurde von Life Technologies (Gaithersburg, MD) bezogen. Chemikalien waren zumindest analysenrein und wurden von handelsüblichen Quellen bezogen.

B. SELEX

[0156] Das SELEX-Verfahren ist im US-Patent Nr. 5.270.163 (siehe auch Tuerk und Gold, Science 249, 505-510 (1990)) ausführlich beschrieben worden. Ein einzelsträngiger DNA-(ssDNA-)Pool wurde verwendet, um das doppelsträngige (dsDNA-)Templat zur Erzeugung des anfänglichen Zufallssequenz-RNA-Pools durch Transkription zu erzeugen. Das DNA-Templat enthielt 40 von konstanten 5'- und 3'-Regionen flankierte Zufallsnukleotide für Primeranellierungsstellen für PCR- und cDNA-Synthese (Tabelle 14, Seq.-ID Nr. 186-188). Der 5'-Primer enthält die T7-Promotorsequenz für In-vitro-Transkriptionen. Das Templat wurde im Anschluss an eine anfängliche Denaturierung bei 93 °C 3,5 Minuten lang durch 15 Zyklen Denaturierung bei 93 °C 30 Se-

kunden lang, 1 Minute Anellieren bei 60 °C und 1 Minute Elongation bei 72 °C in 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9, 0,1 % Triton X-100, 3 mM MgCl₂, jeweils 0,5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 0,1 Units/µl Taq-DNA-Polymerase und jeweils 2,5 nM 3G7- und 5G7-Primer (Tabellen 14; Seq.-ID Nr. 187-188) amplifiziert. SELEX-Experimente für hKGF wurden mit einem Zufallssequenzpool von RNA gestartet, in dem alle Pyrimidine 2'-NH₂-modifiziert oder 2'-F-modifiziert waren. Transkriptionsreaktionen wurden mit ungefähr 5 µM DNA-Templat, 5 Units/µl T7-RNA-Polymerase, 40 mM Tris-HCl (pH 8), 12 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 mM Spermidin, 0,002 % Triton X-100, 4 % PEG 8000, jeweils 2-4 mM 2'OH-ATP, 2'OH-GTP, 2'NH₂- oder 2'F-CTP, 2'NH₂- oder 2'F-UTP und 0,25 µM α³²P-2'OH-ATP (800 Ci/mmol) gestartet. Die Transkripte voller Länge wurden vor Verwendung gelgereinigt. Um Bindungsreaktionen anzusetzen, wurden die RNA-Moleküle mit rekombinantem hKGF in phosphatgepufferter Salzlösung nach Dulbecco (DPBS) mit Calcium und Magnesium (Life Technologies, Gaithersburg, MD, Katalognummer 21300-025) inkubiert, die 0,01 % Serumalbumin enthielt. Nach Inkubation bei Raumtemperatur (im Bereich von 10 Minuten bis 10 Stunden) wurden die Protein-RNA-Komplexe von ungebundener RNA durch Filtration durch Nitrocellulose getrennt. An Nitrocellulosefilter gebundene RNA wurde durch Phenol/Harnstoff-Extraktion gewonnen. Die getrennte RNA wurde zu cDNA revers-transkribiert, und zwar mittels reverser Transkriptase AMV bei 48 °C 60 Minuten lang in 50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 60 mM NaCl, 6 mM Mg(OAc)₂, 10 mM DTT, 50 pmol DNA-3'-Primer (Tabelle 14), jeweils 0,4 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP und 1 Unit/µl AMV-RT. Die cDNA wurde PCR-amplifiziert und verwendet, um den nächsten SELEX-Zyklus zu starten.

C. Nitrocellulosefiltertrennung

[0157] Um die Protein-RNA-Komplexe zu trennen, wurden die Bindungsreaktionen durch Nitrocellulose/Celuloseacetat-Mischmatrix, 0,45 µm Porendurchmesser, filtriert (Filterscheiben, Millipore, Co., Bedford, MA). Zur Filtration wurden die Filter auf eine Vakuumvorrichtung gegeben und mittels Durchsaugen von 5 ml DPBS befeuchtet. Die Bindungsreaktionen wurden durch die Filter gesaugt, und nach einem Waschvorgang mit 5 ml wurden die Filter in einem Szintillationszähler (Beckmann) gezählt. Höhere Waschvolumina mit DPBS oder 0,5 M Harnstoff wurden als Maßnahme angewendet, um die Selektionsstringenz wie in Tabelle 15 gezeigt zu erhöhen. Gelgereinigte, intern mit α³²P-ATP markierte Transkripte wurden mit verschiedenen Konzentrationen hKGF in DPBS bei 37 °C 10 Minuten lang inkubiert.

[0158] Oligonukleotid-Protein-Gemische wurden durch vorher angefeuchtete HA-Filter einer Porengröße von 0,45 µm filtriert, gefolgt von einem Waschvorgang von 5 ml DPBS. Die am Filter zurückgehaltene Radioaktivität wurde gezählt und hinsichtlich Hintergrundbindung in Abwesenheit von Protein korrigiert. Das nicht-lineare Verfahren kleinstes Quadrat wurde verwendet, um die Daten an monophasische oder biphasische Bindungskurven anzupassen und die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_d zu erhalten (Jellinek et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 11227-11231 (1993)), und zwar unter Verwendung des Softwarepaketes Kaleidograph (Synergy Software, Reading, PA). Biphasische Bindung kann als die Bindung von zwei Affinitätsspezies beschrieben werden, die sich nicht im Gleichgewicht befinden.

D. Klonierung und Sequenzierung

[0159] Die aus den Filtern des Umlaufs 8 gewonnene RNA wurde revers transkribiert und PCR-amplifiziert. Im Anschluss an die Säulenreinigung mit QIA-Quick-Spin-Säulen (Qiagen, Inc., Chatsworth, CA) und Ethanolpräzipitation wurde die amplifizierte DNA mit HpaII-Methylase (New England Biolabs, Beverly, MA) methyliert. Die methyierte DNA wurde in die SrfI-Restriktionsstelle des Plasmids pCR-Script Direct SK(+) unter Verwendung des Klonierungssets pCR-Script Amp SK(+) (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA) kloniert. Ungefähr 80 Klone wurden mit dem Sequenase-Sequenzierset (United States Biochemical Corporation, Cleveland, OH) sequenziert. Sequenzanalyse und die Vorhersage der Sekundärstruktur wurden unter Verwendung früher beschriebener Computersoftware durchgeführt (Feng und Doolittle, J. Mol. Evol. 25, 351-360 (1987); Jaeger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 7706-7710 (1989); Jaeger et al., Methods Enzymol. 183, 281-306 (1990); Zucker, Science 244, 48-52 (1989)).

E. Ermittlung von zur Bindung notwendigen Minimalsequenzen

[0160] Am 5'-Ende mit γ³²P-ATP unter Verwendung von T4-Polynukleotidkinase oder am 3'-Ende mit 5'-³²P-pCp und T4-RNA-Ligase endmarkierte Oligonukleotidliganden wurden verwendet, um 3'- bzw. 5'-Begrenzungen festzustellen (Fitzwater et al., Methods Enzymol. 267, 275-301 (1996)). Nach partieller alkalischer Hydrolyse wurde das radiomarkierte Oligonukleotid mit 0,1, 0,6 und 3,0 nM hKGF inkubiert und das proteingebundene Oligonukleotid durch Nitrocellulosefiltration isoliert. Die an der Nitrocellulose zurückgehaltenen Oligonukleotidtrunkate wurden an einem hoch auflösenden, denaturierenden Polyacrylamidgel analysiert. Eine

Alkalische-Hydrolyse-Leiter und eine Leiter radioaktiv markierter, mit G-Resten terminierter Liganden, die durch partiellen RNase-T1-Verdau erzeugt wurden, wurden als Marker zur Kartierung der 3'- und 5'-Begrenzungen verwendet.

F. Thermische Denaturierungsprofile

[0161] Oligonukleotid-Schmelzprofile wurden mit einem Spektrophotometer (Cary, Modell 1E) erhalten. Die Oligonukleotide wurden in PBS (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor, NY) oder 10 mM Phosphatpuffer auf 95 °C erhitzt und vor der Aufnahme des Schmelzprofils auf Raumtemperatur abgekühlt. Während der Aufnahme wurden die Proben bei einer Rate von 1 °C min⁻¹ von 20 bis 95 °C erwärmt.

BEISPIEL 17. RNA-LIGANDEN FÜR hKGF

A. SELEX

[0162] Um RNA-Liganden für hKGF zu erzeugen, wurden zwei parallele SELEX-Experimente veranlasst, eines mit 2'-NH₂- und das andere mit 2'-F-Pyrimidin-modifizierten RNA-Molekülen, die an 40 zusammenhängenden Positionen modifiziert waren. Die SELEX-Bedingungen und Ergebnisse für jeden Umlauf sind in Tabelle 15 zusammengefasst. Der Anfangspool enthielt 5×10^{14} (500 pmol) und $2,5 \times 10^{14}$ (250 pmol) 2'-NH₂- bzw. 2'-F-Pyrimidin-modifizierte RNA-Moleküle und band an hKGF mit einer ungefähren K_D von 30 nM. Nach 8 SELEX-Umläufen banden die evolvierten Pools mit einer K_D von 0,6 nM. Keine weitere Verbesserung der K_D wurde in den anschließenden beiden Umläufen beobachtet. Die RNA-Pools aus dem 8. Umlauf wurden wie beschrieben revers transkribiert, PCR-amplifiziert und kloniert.

B. RNA-Sequenzen

[0163] Im 2'-NH₂-SELEX waren 29 von 31 Klonen einzigartig. Im 2'-F-SELEX waren alle 43 sequenzierten Klone einzigartig. Eine einzigartige Sequenz ist als eine definiert, die sich von allen anderen um drei oder mehr Nukleotide unterscheidet. Tabelle 16 zählt die Sequenzen (Seq.-ID Nr. 189-262) aller sequenzierten Klone im standardmäßigen Einbuchstabencode auf (Cornish-Bowden, Nucleic Acid Res. 13, 3021-3030 (1985)). Die computerunterstützte globale und lokale Angleichung offenbarte keinerlei ausgeprägte Homologien unter den Klone, und es waren keine offensichtlichen Familien ersichtlich. Die 2'-NH₂-Klone sind im Allgemeinen reich an Purin, während die 2'-F-Klone reich an Pyrimidin sind. Wenn die Angleichungsparameter gelockert wurden, gruppierte der Feng/Doolittle-Algorithmus die 2'-NH₂-Klone in eine Familie und die 2'-F-Klone in eine andere. Die visuelle Prüfung der Sequenzen wies auf zwei oder drei mögliche Familien für die 2'-NH₂- bzw. 2'-F-Liganden hin. Unter Verwendung der konservierten vorhergesagten Sekundärstruktur konnten 38 2'F-Liganden zwei Klassen zugeordnet werden ([Fig. 12A](#) und [Fig. 12B](#)). Gleichermaßen konnten 15 2'NH₂-Liganden zwei Klassen zugeordnet werden ([Fig. 12C](#) und [Fig. 12D](#)). Die beiden vorgeschlagenen Klassen für die 2'F-Liganden können zu Pseudoknotenstrukturen gefaltet werden (Wyatt et al., The RNA World 465-496 (1993); E. ten Dam, Biochemistry 21, 1665-1676 (1992)). Diese Strukturen sind sehr nahe verwandt, und tatsächlich könnten sie zirkuläre Permutationen einer gemeinsamen Struktur sein. Schleife 3 (L3) der Pseudoknoten der Klasse 1 stellt die konservierte Sequenz 5'RRYuy dar, während Schleife 1 (L1) der Liganden der Klasse 2 die Sequenz 5'AaYY darstellt. Einige der 2'F-Liganden enthalten zwei oder drei Kopien der RRYY-Sequenz ([Fig. 12A](#) und [Fig. 12B](#)). Eine weitere Eigenschaft dieser Strukturen ist die ungleiche Verteilung von Purinen und Pyrimidinen im Stamm 1 (S1). Einer der Strände dieses Stamms enthält fast ausschließlich Purine, während der andere Strang Pyrimidine enthält.

[0164] Klasse 1 der 2'NH₂-Liganden umfasst 8 Elemente, die zu Bäumchenstrukturen mit internen symmetrischen oder asymmetrischen Schleifen gefaltet werden können. Der Stamm enthält drei aufeinander folgende GC-Basenpaare. Die terminalen Schleifen sind lang und präsentieren die konservierte Sequenz 5'GG-AA(N)₁₋₁₄YAA(N)₁₋₁-RCRR (Seq.-ID Nr. 263). Beide Seiten der internen symmetrischen Schleifen dieser Liganden der Klasse 1 enthalten die Sequenz 5'AA. Klasse 2 umfasst 7 Liganden, die zu Hanteln mit Schleifen variabler Größe gefaltet werden können. Eine der Schleifen enthält die konservierte Sequenz 5'YGAY, während die andere Schleife die konservierte Sequenz 5'GGAA(N)₀₋₄YGA (Seq.-ID Nr. 264) enthält. Klone 2N und 54N sind zirkuläre Permutationen der verbleibenden 5 Klone.

C. Affinitäten

[0165] Die Dissoziationskonstanten der hKGF-Liganden wurden durch Nitrocellulosefilterbindung bestimmt

und sind in Tabelle 17 aufgezählt. Acht von 41 2'-F-Liganden banden biphasisch. Die verbleibenden der 2'-F- und alle der 2'-NH₂-Liganden banden monophasisch. Unter Proteinüberschuss weist eine biphasische Bindung darauf hin, dass der Ligand in Form von zwei Affinitätspezies (vermutlich Isokonformere) existiert, die sich nicht im Gleichgewicht befinden. Der beste 2'-F-modifizierte Ligand, K14F, bindet biphasisch mit der hoch- und niedrigaffinen Dissoziationskonstante bei etwa 0,3-3 pM bzw. 2-10 nM. Es besteht eine gewisse beobachtete Variabilität bei den K_D-Bestimmungen für die verschiedenen Klone und die Zufalls-RNA. Trotz der experimentellen Variabilität bei den K_D-Bestimmungen weisen die hochaffinen Spezies von K14F eine 1.000-5.000fach bessere Affinität als die Zufalls-RNA auf. Unter den monophasischen 2'-F-modifizierten Liganden hatte K38F die beste KD von ungefähr 0,3 nM. Die besten 2'-NH₂-modifizierten Liganden banden mit einer KD von 0,4 nM, was eine ungefähr 75fache Verbesserung gegenüber der Zufalls-RNA darstellt.

D. Ermittlung von zur Bindung notwendigen Minimalsequenzen

[0166] Zwei 2'F-Liganden (6F und 14F) (Seq.-ID Nr. 223 und 231) wurden weiter untersucht, um die zur Bindung notwendigen Minimalsequenzen zu ermitteln. Sequenz-Begrenzungen wurden durch Ermöglichen einer Alkalischen-Hydrolyse-Leiter ermittelt, die am 3'- oder 5'-Ende markiert war, um an hKGF zu binden. Die Teilstücke wurden mittels Nitrocellulosefiltration affinitätsgereinigt und an hochauflösenden denaturierenden Gelen analysiert. Begrenzungen wurden eindeutig nur an den 3'-Enden für beide Liganden beobachtet ([Fig. 13](#)) und stehen im Einklang mit der für Klasse 1 vorgeschlagenen Faltung, wie in [Fig. 12A](#) und [Fig. 12B](#) gezeigt ist. Trunkierte Template wurden dann verwendet, um die Begrenzungen zu bestätigen ([Fig. 13](#)). Drei Trunkate wurden für 6F getestet, da eine Strecke von 7 aufeinander folgenden Pyrimidinen keine präzise Kartierung der Begrenzung ermöglichte. Von diesen drei Trunkaten verlor eines seine KGF-Bindungsaktivität, wie in [Fig. 13](#) gezeigt ist. Ein einzelnes, 14F3'T genanntes 14F-Trunkat wurde getestet. Dieses Trunkat war um zwei Basen länger als die festgestellte Begrenzung, um Stamm 2 (S2) der vorgeschlagenen Pseudoknotenstruktur zu verlängern. Der trunkierte 14F3'T-Ligand behielt Bindungsaktivität mit einer Affinität bei, die dem Liganden voller Länge ähnlich war. Wie der Ligand voller Länge band 14F3'T KGF biphasisch, wobei die hochaffinen Spezies ungefähr 20 % der Moleküle darstellten und K_d-Werte von ungefähr 0,3 bis 3 pM zeigten. Diese Spezies hoher Affinität zeigten, wenn sie von niedrigaffineren Spezies auf Basis differenzieller Affinität für KGF teilweise abgetrennt wurden, Bindungskurven mit Mittelpunkten bei 0,3-3 pM und Maximumplateaus von ungefähr 70 % (Daten nicht gezeigt). [Fig. 13](#) zeigt die vorhergesagte Faltung der kürzesten aktiven Trunkate für 6F und 14F, die 53 bzw. 49 Basen lang sind. Beide vorgeschlagenen Pseudoknotenstrukturen enthalten relativ lange Stämme. Die beiden vorgeschlagenen Stämme von 6F werden durch eine einzelne Base getrennt, die einen Nicht-H-Typ-Pseudoknoten bildet. Die vorgeschlagene 6F-Struktur ähnelt der Lösungsstruktur eines ähnlichen Pseudoknotenmotivs aus einem Rasterverschiebungselement, das sich in der MMTV-RNA findet (Shen et al., J. Mol. Biol. 247, 963-978 (1995)). Die beiden Stämme (S1 und S2) von 14F könnten als zwei koaxial gestapelte Helices von 16 Basenpaaren Gesamtlänge gezeichnet werden (H-Typ-Pseudoknoten). Eine ähnliche Pseudoknotenstruktur ist auf Basis von NMR-Daten bereits vorgeschlagen worden (Du et al., Biochemistry 35, 4187-4198 (1996)). Angesichts der geringen Länge von L1 ist es möglich, dass Ligand 14F einen Nicht-H-Typ-Pseudoknoten bildet, wobei das letzte GU-Basenpaar von S1 nicht ausgebildet wird, was eine flexiblere Helixregion und ein längeres L1 ermöglicht. Temperaturschmelzkurven von 14F und 14F3'T legen eine bemerkenswerte Thermostabilität für diesen Liganden nahe (Daten nicht gezeigt). Diese Schmelzkurven scheinen in 150 mM Salz konzentrationsunabhängig und biphasisch zu sein. Biphasische Schmelzkurven sind früher mit tRNA beobachtet worden (Hilbers et al., Biochemistry 15, 1874-1882 (1976)) und sind der tertiären Faltung des RNA-Moleküls zugeschrieben worden. Multiphasische Temperaturübergänge sind für RNA-Pseudoknoten ebenfalls vorgeschlagen worden (Du et al., Biochemistry 35, 4187-4198 (1996)). Die beobachteten biphasischen Kurven umfassen eine niedrige T_m bei ungefähr 55 °C und eine hohe T_m von mehr als 85-90 °C. In 10 mM Salz wird die niedrige T_m von 14F nicht beobachtet, während sich die hohe T_m hinunter auf 75-78 °C verschiebt. Das Schmelzprofil für 14F scheint flacher als 14F3'T zu sein, obwohl die T_m-Werte dieselben sind. Die Daten legen nahe, dass die beobachtete Thermostabilität ausschließlich dem minimalen 49-mer zuschreiben ist.

[0167] Im Bemühen, kürzere KGF-Liganden zu identifizieren, die eine hohe Bindung beibehalten, wurden die Bindungsaktivitäten verschiedener Deletionen des kürzesten Trunkats von Ligand 14F, nämlich 14F3'T, getestet. Deletionen wurden in allen der Strukturelementen der vorgeschlagenen Pseudoknotenstruktur getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 23 (Seq.-ID Nr. 272-304) zusammengefasst. RNA-Transkripte, die 2'F-Pyrimidine und 2'OH-Purine enthielten, wurden durch In-vitro-Transkription unter Verwendung synthetischer DNA-Template erhalten. Die Aktivität jedes Liganden ist gezeigt, indem die hoch-(H-) und niedrig-(L-)affine Komponente der 14F3'T-Bindungskurve mit + (aktiv) oder - (nicht aktiv) bewertet wurde. Trunkate T35 und T36 stellen zwei komplementäre Hälften des 14F3'T-Moleküls dar und wurden zusätzlich als äquimolares Gemisch getestet. Die Strukturelemente der vorgeschlagenen Pseudoknotenstruktur sind durch (|) getrennt und sind gekenn-

zeichnet durch die Symbole S1 (Stamm 1), S2 (Stamm 2), L1 (Schleife 1), L2 (Schleife 2) und L3 (Schleife 3). Die vorgeschlagene Pseudoknotenstruktur für 14F3'T ist ein Pseudoknoten des Nicht-H-Typs, dem L2 (Schleife 2) fehlt. Die komplementären Sequenzen, die S1 (S1 und S1') und S2 (S2 und S2') bilden, sind durch einfache bzw. doppelte Unterstreichungen markiert. In den tabellierten Sequenzen wurden deletierte Basen durch Punkte (.) ersetzt. Jeglicher Deletionsversuch in den Stämmen S1 und S2 der vorgeschlagenen Pseudoknotenstruktur resultierte in einem Verlust der hoch-(H-) sowie niedrig-(L-)affinen Komponente der Bindungskurve, wie sie mit dem 14F3'T-Liganden beobachtet wurde. Deletionen in Schleife 3 (L3) wurden jedoch toleriert, so lange eine der Kopien der RRYY-Box intakt blieb. Der kürzeste Ligand, der Aktivität beibehält, ist T22, das ein 43mer ist. Beim Versuch, kürzere Liganden durch weiteres Trunkieren von L3 zu erlangen, wurde eine mutierte Version von T22 (T22mu genannt) verwendet, bei dem das letzte GC-Basenpaar von S1 durch eine Mutation von G auf U an Position 6 eliminiert war. Die Begründung für diese Mutation war die Erhöhung der Flexibilität der doppelsträngigen Region dieses Liganden durch Ermöglichen einer ungepaarten Base zwischen S1 und S2. Obgleich diese Mutation die Bindung von T22 nicht beeinflusste, erlaubte sie keine weiteren aktiven Trunkationen von L3.

E. Spezifität von RNA-Liganden für hKGF

[0168] Die Spezifität des K14F-Liganden wurde getestet, indem seine K_D gegen Ratten-hKGF und die Heparin-bindenden menschlichen Wachstumsfaktoren, aFGF, bFGF und PDGF bestimmt wurden (Tabelle 18). Die Ergebnisse legen nahe, dass K14F alle getesteten Targets wie Zufalls-RNA mit Ausnahme von hKGF bindet und zwischen hKGF und anderen ähnlichen Proteine um einen Faktor von 400-40.000 unterscheiden kann.

[0169] Die Spezifität des Liganden 14F3'T wurde durch Bestimmen seiner K_d gegen eine Anzahl von Heparin-bindenden Proteinen getestet. Die in Tabelle 22 zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass Ligand 14F3'T KGF von allen anderen getesteten Heparin-bindenden Proteinen um einen Faktor von $1,2 \times 10^4$ - 3×10^{10} unterscheiden kann. Ligand 14F3'T bindet nur an KGF mit hoher Affinität, obgleich es alle anderen getesteten Heparin-bindenden Proteine wie Zufalls-RNA bindet. Die Bindung von 14F3'T an das Ratten-KGF, das mit menschlichem KGF zu 91 % identisch ist, erfolgt mit einer ungefähr 5- bis 10fach verminderten Affinität. Eine ähnliche Spezifität wurde während der Hemmung der KGF-induzierten DNA-Synthese von Balb/MK-Zellen beobachtet. Ligand 14F3'T hemmt die Ratten-KGF-induzierte DNA-Synthese mit einer K_i von 1,8 nM, die 20- bis 50fach höher als die mit dem menschlichen KGF beobachtete K_i ist. Ligand 14F3'T hemmt die DNA-Synthese von Balb/MK-Zellen nur dann, wenn sie das Resultat der KGF-, nicht jedoch EGF-Stimulation ist (Daten nicht dargestellt).

BEISPIEL 18. HEMMUNG DER hKGF-BINDUNG AN ZELLOBERFLÄCHENREZEPTOREN

A. Rezeptorbindungsstest

[0170] Um die Fähigkeit der hKGF-Liganden zu testen, die Bindung von hKGF an seinen Zelloberflächenrezeptor kompetitiv zu hemmen, wurden zwei Zelllinien verwendet. Die erste Zelllinie, PC-3, ist ein Isolat aus einem Prostata-Adenokarzinom vom Grad IV (ATCC CRL 1435). Die zweite Zelllinie wird als NIH3T3/FGFR-2 bezeichnet und ist eine rekombinante NIH/3T3-Zelllinie, die den menschlichen hKGF-Rezeptor mit ungefähr $0,5\text{--}1 \times 10^6$ hochaffinen KGF-Bindungsstellen pro Zelle trägt (Miki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 246-250 (1992)).

[0171] PC-3-Zellen wurden in 24-Well-Platten mit ungefähr 10^5 Zellen pro Well ausplattiert. Nach dem Wachstum 48-36 Stunden lang wurden die Zellen 24 Stunden lang hinsichtlich Serum ausgehungert, zwei Mal mit 500 μl kaltem DPBS gewaschen und dann mit 500 μl Bindungspuffer (BB1; DPBS, 0,5 mM MgCl₂, 0,2 % BSA, 0,02 % Natriumazid) inkubiert, der verschiedene Konzentrationen von ¹²⁵I-markiertem KGF im Bereich von 0 bis 0,8 nM enthielt. Nach einer Inkubation von 3-3,5 Stunden bei 4 °C wurden die Bindungsgemische abgesaugt und die gut anhaftenden Zellen zwei Mal mit 1 ml BB1 und einmal mit 1 ml mit 0,5 M NaCl ergänztem BB1 gewaschen. Das verbleibende gebundene markierte hKGF wurde in 600 μl 0,5 % SDS/0,1 M NaOH solumibilisiert und in einem Gammazähler (Beckmann) gezählt. Nichtspezifische Bindung wurde in Gegenwart eines 100fachen molaren Überschusses von unmarkiertem hKGF bestimmt. Für Konkurrenztests wurde das markierte hKGF mit 0,3 nM konstant gehalten, und es wurden verschiedene Konzentrationen an Konkurrenz-molekülen im Bereich von 0-1.000 nM in die Bindungsreaktionen aufgenommen. Die Bindungskurven wurden der folgenden Gleichung angepasst:

$$[\text{gebundener Tracer}] = ([\text{gesamter Tracer}] \cdot [\text{Rezeptor}]) / (K_D + [\text{gesamter Tracer}])$$

wobei [gesamter Tracer] und [gebundener Tracer] festgesetzt waren und die K_D und [Rezeptor] mittels Regressionsanalyse unter Verwendung der Software Kaleidagraph (Synergy Software, Reading, PA) bestimmt wurden.

[0172] NIH3T3/KGFR-2-Zellen wurden in 24-Well-Platten mit ungefähr 10^5 Zellen pro Well ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen hinsichtlich Serum 1-5 Stunden lang ausgehungert, zwei Mal mit 500 μ l Bindungspuffer (BB2; serumfreies MEM-Wachstumsmedium, 0,1 % BSA, 25 mM HEPES, pH 7,4) gewaschen und dann mit 250 μ l BB2 inkubiert, das 1 μ g/ml Heparin (aus Rinderlunge, SIGMA, St. Louis, MO), 125 I-markiertes hKGF mit 0,03 mM und verschiedene Konzentrationen von Konkurrenzmolekülen (300 nM-0 nM) enthielt. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Bindungsgemische abgesaugt und die Wells zwei Mal mit 250 μ l kaltem DPBS und einmal mit 250 μ l kaltem, mit 0,5 M NaCl ergänztem DPBS gewaschen. Das gebundene markierte hKGF wurde in 500 μ l 0,5 % SDS solubilisiert und in einem Szintillationszähler (Beckmann) gezählt.

[0173] Die Inhibitorkonstanten (K_i) für die RNA-Liganden wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse der Daten bestimmt.

[0174] Auf der Suche nach KGF-Rezeptoren an der Oberfläche von PC-3-Zellen wurden verschiedene Konzentrationen von 125 I-hKGF im Bereich von 0,002 bis 0,8 nM in Gegenwart und Abwesenheit eines 100fachen molaren Überschusses an unmarkiertem hKGF verwendet und die Sättigungsbinding des Tracers an der Oberfläche von PC-3-Zellen festgestellt. **Fig. 10** zeigt die grafische Darstellung der Konzentration an gebundenem Tracer als Funktion der Gesamtkonzentration von Tracer sowie die Scatchard-Analyse derselben Daten. Die Analyse der Daten legt nahe, dass ungefähr 5.000 spezifische hKGF-Bindungsstellen pro Zelle mit einer K_D von 100-200 pM vorliegen. Diese K_D ist in guter Übereinstimmung mit der berichteten K_D für hKGF von 200 pM (Miki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 246-250 (1992)).

[0175] Es zeigte sich, dass PC-3-Plasmamembranextrakte die elektrophoretische Mobilität (Gel-Retention) von radioaktiv markiertem hKGF nach nativer Gelelektrophorese verändert (**Fig. 11**). Für die Gel-Retentionsanalyse wurden ungefähr 3×10^7 PC-3-Zellen vorsichtig zentrifugiert und mit PBS gewaschen und dann durch Vermischen mit einem gleichen Volumen Lysepuffer lysiert, der 40 mM Hepes, pH 7,4, 150 mM NaCl, 20 % Glycerin, 2 % Triton X-100, 0,1 % Natriumazid, 3 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 2 μ M Aprotinin, 2 μ M Leupeptin, 2 mM PMSF und 400 μ l Natriumorthovanadat enthielt. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis wurde der Extrakt bei 11.000 g bei 4 °C 30 Minuten lang zentrifugiert, um Zelltrümmer und Kerne zu entfernen, und der Überstand wurde aliquotiert und bei -70 °C gelagert. Für die Gelanalyse wurden Bindungsreaktionen von 25 μ l angesetzt, und zwar in DPBS, 0,01 % HSA, 2 mM MgCl₂, enthaltend 3 μ l eines 10fach verdünnten PC-3-Membranextrakts in 0,01 % HSA und verschiedene Konzentrationen an 125 I-markiertem hKGF. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde 6×-Beladungsfarbstoff zugesetzt, so dass eine 1×-Konzentration erzielt wurde, und die Proben auf ein 5%iges oder 10%iges natives TBE-Polyacrylamidgel geladen. Das Gel wurde einem Vorlauf bei Raumtemperatur bei 100 Volt unterzogen. Nach der Beladung wurde das Gel bei 200 Volt 5 Minuten lang und dann bei 100 Volt 30-60 Minuten lang bei Raumtemperatur laufen gelassen. Die radioaktiven Banden wurden dann mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Gel-Retention von radiomarkiertem hKGF wurde in Gegenwart eines 100fachen molaren Überschusses an unmarkiertem hKGF nicht beobachtet (**Fig. 11**), was eine spezifische Wechselwirkung zwischen einer in PC-3-Membranextrakten befindlichen Komponente und hKGF nachweist. Die geschätzte KD aus dem Gel-Retentionsexperiment beträgt ungefähr 8 nM.

[0176] Im Einklang mit den in der Literatur beschriebenen Konkurrenzexperimenten (Miki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 246-250) wurden Gel-Retention-Konkurrenzkurven unter Verwendung von unmarkiertem hKGF und bFGF sowie eines nicht verwandten kleinen basischen Proteins, nämlich Lysozym, erlangt. Tabelle 21 zählt die in diesem Experiment erhaltenen IC50-Werte auf. Im Einklang mit früheren Berichten zeigen die in Tabelle 21 präsentierten Daten, dass bFGF ungefähr um das 20fache schlechter als hKGF um Bindung mit dem in den PC-3-Plasmamembranextrakten vorhandenen hKGF-Rezeptor konkurriert. Die mittels Gel-Retention beobachtete Wechselwirkung scheint eine spezifische Wechselwirkung für FGF zu sein und ist nicht auf eine Ladungs-Ladungs-Wechselwirkung zurückzuführen, da Lysozym, ein anderes kleines positiv geladenes Molekül, mit ungefähr um das 100fache schlechterer Affinität als hKGF alleine um den PC-3-Membranextrakt:hKGF-Komplex konkurriert.

[0177] IC50-Werte für verschiedene RNA-Liganden, die mit dem PC-3-Test erlangt wurden, sind in Tabelle 19 gezeigt. Eine Untergruppe dieser Liganden wurde am NIH3T3/FGFR-2 getestet. Kompetitive Hemmkonstanten (K_i) wurden aus vollständigen Hemmkurven bestimmt und sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Beim Bestimmen der K_i -Werte wurde angenommen, dass 3T3-Zellen 500.000 Bindungsstellen pro Zelle aufweisen und

PC-3-Zellen 5.000 Bindungsstellen pro Zelle aufweisen.

[0178] Die Daten zeigen, dass mehrere hKGF-Liganden die Bindung von hKGF an seine Zelloberflächenrezeptoren kompetitiv hemmen können. Manche dieser Liganden, wie z.B. K14F, weisen potente kompetitive Aktivitäten mit Ki-Werten im unteren nM-Bereich auf.

[0179] Diese Arbeit beweist nicht nur, dass Nucleinsäurekonkurrenten für hKGF erlangt wurden, sondern identifiziert außerdem einen neuen Test zum Screening von hKGF-Konkurrenten, einschließlich kleinen Molekülen, Antikörpern und Peptiden. Dieser neue Test umfasst die Verwendung der Prostata-Karzinomzelllinie PC-3.

[0180] Die beiden Zelllinien PC3 und NIH3T3/FGFR-2 liefern leicht unterschiedliche Resultate (siehe Tabelle 20). KGF-Bindung an PC-3-Zellen ist empfindlicher gegen Hemmung durch mehrere Liganden und durch Heparin. Zufalls-RNA konkurriert jedoch nicht wirksam um KGF-Bindung an den PC-3-Zellen. Die KGF-Bindung an NIH3T3/FGFR-2 ist gegen Hemmung durch manche RNA-Liganden und Heparin resistent. Dies ist deshalb der Fall, weil der NIH3T3/KGFR-Test stringenter ist, da er in Gegenwart von 1 µg/ml Heparin durchgeführt wird. Die Zufallsoligonukleotid-Konkurrenzkurve mit dem NIH3T3/FGFR-2 ist mit $K_i > 10^{-4}$ M völlig flach. Die Liganden 6F und 14F zeigen die beste hemmende Aktivität mit K_i -Werten von 100-200 pM und 2-8 nM im PC-3- bzw. NIH3T3/FGFR-2-Test. Nur zwei 2'NH₂-Liganden, 14N und 29N, zeigen gute Aktivität mit den PC-3-Zellen (K_i -Wert von 1,4 nM). Von diesen beiden Liganden behält nur 14N seine hemmende Aktivität im NIH3T3/FGFR-2-Test bei und zeigt einen K_i -Wert von 100 nM. Die beobachtete Hemmung der KGF-mitogenen Aktivität durch diese Liganden liegt nicht an einer nicht-spezifischen Beeinträchtigung der proliferativen Fähigkeit der Zelllinien, da diese Liganden keine antiproliferative Aktivität an Zellen aufweisen, die durch EGF anstelle von KGF induziert wurden (Daten nicht gezeigt).

[0181] Diese Arbeit beweist nicht nur, dass Nucleinsäurekonkurrenten für hKGF erlangt wurden, sondern identifiziert außerdem einen neuen Test zum Screening von hKGF-Konkurrenten, einschließlich kleinen Molekülen, Antikörpern und Peptiden. Dieser neue Test umfasst die Verwendung der Prostata-Karzinomzelllinie PC-3.

BEISPIEL 19. HEMMUNG DER MITOGENEN AKTIVITÄT VON KGF

[0182] Eine der biologischen Wirkungen von KGF ist die Stimulation der Proliferation von Epithelzellen (Rubin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 802-806 (1989)). Diese proliferative Wirkung von KGF kann durch Stimulation des Einbaus von ³H-Thymidin in reagierende Zellen nach Exposition gegenüber KGF gemessen werden. Drei derartige Zelllinien sind bereits beschrieben worden (Rubin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 802-806 (1989)). Zwei Zelllinien wurden verwendet, um die antimitogene Wirkung verschiedener Liganden zu testen. Eine davon ist 4MBr-5 (ATCC Nr. CCL208), eine Affen-Epithel-Niedrigpassage-Zelllinie (Caputo et al., In Vitro 15, 222-223 (1979)), während die zweite Balb/MK ist, eine transformierte Ratten-Keratinozytenzelllinie (Weissman und Aaronson, Cell 32, 599-606 (1983)). In 30 ng/ml, hEGF und 10 % FCS enthaltendem F12K gezüchtete 4-MBr5-Zellen wurden trypsinisiert und in 10 mM HEPES, pH 7,4 und 10 % FCS enthaltendem M199 mit $1,4 \times 10^5$ Zellen/ml resuspendiert. Eine 96-Well-Mikrotiterplatte wurde mit 100 µl Zellsuspension beimpft, und es wurde KGF mit 10 ng/ml (0,5 nM) sowie K14F-Ligand in verschiedenen Konzentrationen im Bereich von 0-1.000 nM zugegeben. Jede Inkubationsreaktion wurde in zumindest dreifacher Ausführung angesetzt. Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 37 °C wurde 1 µCi/Well ³H-Thymidin zusammen mit 10 nM unmarkiertem Thymidin zugegeben. Die Zellen wurden weitere 24 Stunden lang inkubiert, der Überstand wurde abgesaugt, und die verbleibenden Zellen wurden durch Lyse in 20 µl 0,2 N NaOH geerntet. Das Ausmaß an ³H-Thymidin-Inkorporation wurde mittels TCA-Präzipitation und Filtration durch GFC-Filterscheiben (Whatman, Hillsboro, OR) bestimmt.

[0183] In EMEM mit niedrigem Ca⁺⁺-Gehalt und 10 % FCS (dialysiert und hitzeaktiviert) und 5 ng/ml rhEGF gezüchtete Balb/MK-Zellen wurden trypsinisiert und in EMEM mit niedrigem Ca⁺⁺-Gehalt und 1 % FCS (dialysiert und hitzeaktiviert) und 0,5 ng/ml rhEGF resuspendiert und auf Fibronectin-beschichtete 96-Well-Kulturplatten mit $4-6 \times 10^4$ Zellen pro Well in einem Gesamtvolumen von 100 µl ausplattiert. Nach Wachstum über Nacht wurde das Medium durch EMEM mit niedrigem Ca⁺⁺-Gehalt ohne FCS oder rhEGF ersetzt und hinsichtlich Serum ungefähr 30 Stunden lang ausgehungert. Menschliches rekombinantes KGF oder EGF wurde dann mit 16 bzw. 49 pM zusammen mit verschiedenen Konzentrationen an Konkurrenten im Bereich von 0-1.000 nM zugegeben. Nach Inkubation über Nacht wurde 0,2 µCi/Well ³H-Thymidin zugegeben und die Inkubation weitere 7-8 Stunden lang fortgesetzt. Das Ausmaß an ³H-Thymidin-Einbau wurde mittels TCA-Präzipitation und Filtration durch GFC-Filterscheiben bestimmt.

[0184] Die Hemmkonstanten (K_i) der Oligonucleotidliganden wurden durch eine nichtlineare Regressionsanalyse der Daten wie früher beschrieben bestimmt (Gill et al., J. Mol. Biol. 220, 307-324 (1991)).

[0185] Die beiden Tests lieferten leicht unterschiedliche Ergebnisse. Der 4MBr-5-Test wurde in Gegenwart von Fötalkälberserum durchgeführt, während der Balb/MK-Test nach Serumsaushungerung durchgeführt wurde. Der Balb/MK-Test ist empfindlicher und ein prototypischer Test für die KGF-induzierte mitogene Aktivität. Ähnlich zu den mit den PC-3-Zellen erlangten Ergebnissen zeigte der 4MBr-5-Test eine gute Aktivität für Ligand 14F (K_i -Wert von 9,8 nM, jedoch unvollständige Hemmung). Im selben Test zeigten die Zufallsoligonukleotide K_i -Werte von > 1 μ M, während ein monoklonaler neutralisierender Antikörper einen K_i -Wert von 2,9 nM zeigte. Es scheint, dass Ligand 14F genauso gut oder sogar besser als der monoklonale neutralisierende Antikörper ist. Die Konkurrenzkurven für den neutralisierenden monoklonalen Antikörper und Ligand 14N erreichen ihr Plateau bei ungefähr 20-40 %, was nahe legt, dass diese Antagonisten die KGF-mitogene Aktivität nicht vollständig aufheben. Im Gegensatz zum monoklonalen Antikörper blockiert Ligand 14F die KGF-mitogene Aktivität an den 4MBr-5-Zellen vollständig. Im Balb/MK-Test zeigte 14N K_i -Werte von ungefähr 10 nM (unvollständige Hemmung), während das Zufallsoligonukleotid K_i -Werte von ungefähr 300 nM zeigte. Die K_i -Werte für 6F und 14F sind 830 bzw. 92 pM. Ähnlich zum 4MBr-5-Test scheint 14F genauso gut, wenn nicht besser als der monoklonale neutralisierende Antikörper zu sein, der einen K_i -Wert von 980 pM zeigt. Die beste hemmende Aktivität wurde mit 14F3'T mit einem K_i -Wert von 34 pM beobachtet.

BEISPIEL 20.

[0186] Nucleinsäureliganden, die an basischen Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) binden, sind mittels SELEX-Verfahren wie im US-Patent Nr. 5.459.015 beschrieben (siehe auch US-Patent Nr. 5.270.163 und Turker und Gold, Science 249, 505-510 (1990)) hergeleitet worden. Ein 2' NH_2 -modifizierter, 21A genannter Nucleinsäureligand mit der Sequenz 5'-GGGAGACAAGAAUACGCCUCAAGUAGACUAAUGUGUGGAAGACAG-CGGGUGGUUCGACAGGAGGCUCACAAACAGGC (Seq.-ID Nr. 265) wurde durch Deletionsanalyse auf für hochaffine Bindung an bFGF erforderliche Minimalsequenzinformation untersucht. Diese Analyse führte zum trunkierten Liganden 21A-t (GGUGUGUGGAAGACAGCGGGUGGUuc (Seq.-ID Nr. 266)), worin die unterstrichenen G angefügte Guanine sind, um die Effizienz der Transkription zu verbessern, und Kleinbuchstaben aus der konstanten Region stammen.

[0187] Um die Stabilität des Liganden 21A-t gegen Abbau durch Nuklease zu erhöhen, wurden den 5'- und 3'-Enden kurze Thiophosphat-Kappen angefügt. Zusätzlich wurden neun Ribopurin-Positionen identifiziert, die mit 2'-Desoxy-2'-O-methylpurinen ohne Verlust an Bindungsaffinität für bFGF substituiert werden können, und zwar unter Anwendung der in Green et al., Chem. Biol. 2, 683-695, beschriebenen Verfahren, was im als NX-286 bezeichneten Liganden resultierte (5'-TsTsTsTs mGmGaU rGaUrG aUrGrG mArArG mAaCrA rGaCmG mGmGaU mGmGaU aUaC TsTsTsTsT-3' (Seq.-ID Nr. 267), wobei s Thiophosphat-Internucleosid-Bindung darstellt, aU und aC 2'-Desoxy-2'-aminouridin- bzw. 2'-Desoxy-2'-aminocytidinreste sind, mA und mG 2'-Desoxy-2'-O-methyladenosin- bzw. -guanosinreste sind, rA und rG Adenosin- und Guanosinreste sind und T 2'-Desoxythymidin ist). Der modifizierte Nucleinsäureligand weist eine mittels Gel-Retentionsanalyse gemessene K_d von 0,4 nM auf.

Tabelle 1

In SELEX-Experimenten, beschrieben in den Beispielen 1-4, eingesetzte Nucleinsäuresequenzen

* GAUC oder GAC, nur diese Basen
gauc oder gact 62,5 % spezifiziertes Base, 12,5 % die anderen drei Basen

Tabelle 2

In den Beispielen 1-4 beschriebene RNA-SELEX-Experimente: Templat, Pyrimidinnucleotide und Klonierungs-umlauf

<u>SELEX-Exp.</u>	<u>Templat*</u>	<u>2'-sub. UTP</u>	<u>2'-sub. CTP</u>	<u>Klonierungsumlauf</u>
lib1	64N6	OH	OH	20
lib2	64N6	OH	OH	6
lib3	40N6+64N6	F	F	4
lib4	40N6+64N6	NH ₂	NH ₂	5
lib5	64N6	NH ₂	NH ₂	13
lib6	64N6	F	F	13
lib7	64N6	F	NH ₂	14
lib8	D-123	OH	OH	6
lib9	64N6	NH2	F	5

* Die Sequenzen der Template sind in Tabelle 1 erläutert.

Tabelle 3
TGF β -Bindungsliganden

Tabelle 3 (Seite 2)

Klon	5'-Konstant	variabel [40 oder 64N]	3'-Konstant	Seq.-ID Nr.
	ggggagaacgcggaucc	[40 oder 64N]	aagccuuucgcucuagaucuccuuuauuggaggguua	
Gruppe B				
1ib4-12	UGAGAAGGACGUCGGGGUCAACGGGGUAGGGGGAGGGAGGAGAAAGGGCCGACCAUAGACGUAA			28
1ib3-44	UGAGAAGGACGUCGGGGU			29
1ib3-42	GGGGGAAA GUCCGUU	AUUGUU GUAGAUU GU GUCCAA		30
Gruppe C				
1ib1-20-3**	UGCUAGACCGAGGAUGCAAGGGACAUGCAUTAGGAAACCUAUGUUAAGAACCGGGUCGGCAG			32
1ib1-20-3H**	UGCUAGACCGAGGAUGCAAGGGACAUGCAUAGGGRACCUAUGUUAAGAACCGGGUCGGCAG			33
1ib6-30**	UGCUAGACCGAGGAUGCAAGGGACAUGCAUAGGAAACCUAUAAAAGAACCGGGUCGGCAG			34
Gruppe D				
1ib2-6-1*	UGUCUCCACCGCGAUACUGGGGUUCCUGGGGCCCUAUGCAGGAGGGGGUGGUUCGGAGA			35
1ib2-6-1-81*	UGUCUCCACCGCGAUACUGGGGUUCCUGGGGCCCUAUGCAGGAGGGGGUGGUUCGGAG			36
1ib8-23*	UGUCUCCACCGCGAUACUGGGGUUCCUGGGGCCCUAUGCAGGAGGGGGUGGUUCGGAGA			37
1ib9-10*	UGUCUCCACCGCGAUACUGGGGUUCCUGGGGCCCUAUGCAGGAGGGGGUGGUUCGGAGA			38
WAISEN				
Klon Nr.				
1ib3-45	GGAAGUCUGGUUCUUCGGGAGGUCCAUUGGCCUGGGCGA			39
1ib1-20-5**	ARGAGUUCUUCGGGCACTGGGAGACGGGGACAUUGGUUCCUGGGACACUGGGAA			40
1ib1-20-12**	GGUCAACCGGGCAUAAAAGGGACGGGUUCCGGGACGGGGACUGGACGGAG			41
1ib2-6-8**	AUACCEGGGUUGGAGGGAGGGACAUCCUGGGAAACGGACGGGUUCCUGGAGAUQACCUGGAGAUCCUGGAGA			42

Tabelle 3 (Seite 3)

Klon	Seq.-ID Nr.
Gruppe-A-Begrenzungsexperimente	
lib3-13-Begrenzungen	5' GCUUCCGAGUAGACAGGAGGGGGGAUGUGGGGUAC 3'
lib8-9-Begrenzungen	5' CUUCGGAGUAGACAGGAGGGGGGAUGUGGGGUACUC 3'
lib4-32-Begrenzungen	GCGAACCCCAGGCCAUAGCUUCGGAGUAGACAGGCCGGGGGAUGUGGGGUAC 3'
Gruppe-B-Begrenzungsexperimente	
lib4-12-Begrenzungen	5' UGAGAAGGGACGUCCCCGUCAACGGGGUGGGCAGCAGAAAGGGCCGGCACCA 3'
	31

Legende: Die konstante Region des Liganden ist in Kleinbuchstaben und die variable in Großbuchstaben angegeben. Sequenzen wurden angeglichen. Deletionen in Bezug auf die erste Sequenz in den einzelnen Gruppen sind durch Lücken dargestellt, Substitutionen sind fett gedruckt.

*2'NH₂-UTP, 2'F-CTP

**2'F-UTP, 2'F-CTP

***2'OH-UTP, 2'OH-CTP

Gruppe A und B binden mit entweder 2'NH₂- oder 2'F-Pyrimidinen.

Liganden binden mit entweder 2'NH₂- oder 2'F-Pyrimidinen, sofern nicht anders angegeben.

Tabelle 4

Dissoziations- und Inhibitionskonstanten

Gruppe	Ligand	B _{max}	K _d	I _C ₅₀
A	lib3-13	0,60 0,38 0,55	0,9 nM 0,7 nM 0,9 nM	9,7 nM 42 nM 18 nM 32 nM
	lib3-3	0,44	1,7 nM	NB
	lib4-32	0,50	0,8 nM	20 nM 157 nM
	lib5-5	0,37	2,4 nM	49 nM
	lib5-7	0,33	3,4 nM	17 nM
	lib8-9	0,4	1,7 nM	210 nM
	lib8-9*	0,35	2,8 nM	124 nM
	lib5-48	0,32	3,8 nM	nichthemmend
	lib2-6-4	0,20	3,1 nM	nichthemmend
	lib6-23	0,35	3,4 nM	nichthemmend
	lib7-21****	0,18	2,4 nM	nichthemmend
	lib7-43****	0,33	3,3 nM	nichthemmend
	lib4-12	0,15 0,08	0,4 nM 0,2 nM	109 nM 108 nM 69 nM
	lib3-44	0,18	1,3 nM	119 nM
	lib3-42	0,16	0,6 nM	22 nM
C	lib1-20-3**	0,67	30 nM	nichthemmend
	lib1-20-3-82**	0,46	6,1 nM	nichthemmend
	lib6-30**	0,35	8,8 nM	nichthemmend
D	lib2-6-1*	0,40	14,3 nM	112 nM 103 nM
	lib2-6-1-81*	0,39	10,7 nM	201 nM 298 nM
	lib8-23*	0,48	6,6 nM	nichthemmend
	lib9-10*	0,24	1,1 nM	nichthemmend
	Waisen	lib3-45 lib1-20-5** lib1-20-12*** lib1-6-8***	0,08 0,42 0,34 0,12	1,9 nM 46 nM 3,1 nM 4,7 nM
Kontrollen	lib5-9		kein Binder	nichthemmend
	Zufalls-64N6		kein Binder	nichthemmend

Liganden sind 2'-NH₂-Pyrimidine, sofern nicht anders angegeben* 2'-NH₂-UTP, 2'-F-CTP,

** 2'-F-Pyrimidine,

*** 2'-OH-Pyrimidine,

**** 2'-F-UTP, 2'-NH₂-CTP

Tabelle 5In den Beispielen 5 und 6^a eingesetzte DNA-Oligonucleotide

Beschreibung		Sequenz	Seq.-ID Nr.
40N7-Templat für RNA-SELEX		TCGGGGAGTCGCTG[40N]CCGCATCGTCCTCC	43
5N7	5'-Primer für PCR	TAATACGACTCACTATAGGGAGGACGATGCCG	44
3N7	3'-Primer für PCR	TCGGCGAGTCGTCTG	45
40D7	Ausgangsmaterial für DNA-SELEX	GGGAGGACGATGCCG[40N]CAGACGACTGCCGA	46
5D7	5'-Primer für PCR	GGGAGGACGATGCCG	47
3D7	3'-Primer für PCR	(Biotin) ₃ TCGGGGAGTCGTCTG	48
40N8	Templat für RNA-SELEX	GCTGTTGTGAGCCTCTGTCAA[40N]TTGAGCGTTATTCTTGTCTCCC	49
5N8	5'-Primer für PCR	TAATACGACTCACTATAGGGAGACAAGAAATAAACGCTCAA	50
3N8	3'-Primer für PCR	GCCTGTTGTGAGCCTCCCTGTCAA	51
40D8	Ausgangsmaterial für DNA-SELEX	GGGAGACAAGAATAAACGCTCAA[40N]TTGAGCAGGGCTCACAAACAGGCC	52
5D8	5'-Primer für PCR	GGGAGACAAGAATAAACGCTCAA	53
3D8	3'-Primer für PCR	(Biotin) ₃ GCCTGTTGTGAGCCTCCCTGTCAA	54

a. Die DNA-Oligonucleotide 40N7 und 40N8 wurden verwendet, um das doppelsträngige DNA-Templat für In-vitro-Transkription zu erzeugen. Die 3'-Primer 3N7 und 3N8 wurden ebenfalls zur Erzeugung von cDNA aus dem RNA-Repertoire verwendet. Die synthetisch hergestellten DNA-Oligonucleotide 40D7 und 40D8 wurden direkt als Ausgangsrepertoire für die zwei einzelsträngigen DNA-SELEX-Experimente herangezogen. Bei der PCR-Amplifikation der ausgewählten Repertoires wurde der passende 5'- oder 3'-Primer verwendet. Das Symbol 40N steht für eine 40 Nucleotide große randomisierte Region innerhalb des Oligonucleotids.

Tabelle 6

TGF β 1-40N7-DNA-Selex-Sequenz von fünfzig zufällig ausgewählten Klonen

5' GGGAGGACGATGCGG . . . 40N . . . CAGACGACTCGCCCGA 3'

	<u>Seq.-ID Nr.</u>
Gruppe A	
20 (11 Klone)	
4	55
5	56
8	57
13	58
16	59
40	60
48	61
	62
Gruppe B	
18	63
19	64
32	65
46	66
Gruppe C	
12 (3 Klone)	
1	67
3	68
10	69
23	70
34	71
	72
Gruppe D	
2	73
6	74
25 & 38	75
7	76
9	77
11	78
17	79
21	80
24	81
28 & 30	82
29	83
31	84
35	85
36	86
41	87
44 & 45	88
50	89

Fettdruck weist auf eine Diskrepanz in Bezug auf die häufigste Sequenz dieser Gruppe hin.

Tabelle 7

Ausgangs-DNA und PCR-Primer für das ssDNA-SELEX-Experiment

	Seq.-ID Nr.
Ausgangs-ssDNA: 5'-ATCCGCCTGATTAGCGATACT[-40N-]ACTTGAGCAAAATCACCTGCAGGGG-3'	90
PCR-Primer 3N2*: 5'-BBBCCCCTGCAGGTGATTTGCTCAAGT-3'	91
PCR-Primer 5N2**: 5'-CCGAAGCTTAATACGACTCACTATAGGG <u>ATCCGCCTGATTAGCGATACT</u> -3'	92

* B = Biotinphosphoramidit (z.B. Glen Research, Sterling, VA, USA)

** Für die Umläufe 10, 11 und 12 wurde der trunkierte PCR-Primer 5N2 (unterstrichen) zur Amplifikation des Templaets eingesetzt.

Tabelle 8

Einzigartige Sequenzen der hochaffinen ssDNA-Liganden für PDGF

5'-ATCCGCCTGATTAGCGATACT [40N] ACTTGAGCAAAATCACCTGCAGGGG-3'

Seq.-ID Nr.

*14	AGGCTTGACAAAGGGACCATGGCTTAGTGGTCTAGT	93
*41	CAGGGCACTGCAAGCAATTGTGGTCCAATGGGCTGAGT	94
6	CCAGGCAGTCATGGTCAATTGTGGTCCAATGGGCTGAGT	95
23	AGGTGATCCCTGCAAAGGCAGGATAACGTCTGAGCATIC	96
2	ATGTGATCCCTGCAAGAGGGAGGANACGTCTGAGCATIC	97
34	CACGTGATCCCATAAAGGGCTGCGCAAATAGCAGAGCATIC	98
8	GGTGGACTAGAGGGCAGCAAACGATCCTGGTTAGCGTCC	99
1	GGTGCACGAGGCTTACACAAACGTACACGTTCCCCGC	100
5	TGTCGGAGCAGGGCGTACGAAAACTTACAGTTCCCCCG	101
*40	AGTGGAACAGGGCACGGAGAGTCAAACTTGGTTCCCCC	102
47	GTGGGTAGGGATCGGTGGATGCCTCGTCACTTCTAGTCCC	103
18	GGGCGCCCTAAACAAAGGGTGGTCACTTCTAGTCCCAGGA	104
30	TCCGGGCTCGGGATTCTGTGGTCACTTCAGTCCCAGGATATA	105
*20	ATGGGAGGGCGCGTTCTCGTGGTTACTTTAGTCCC	106
35	<u>ACGGGAGGGCACGTTCTCGTGGTTACTTTAGTCCC</u>	107
13	GCTCGTAGGGGGCGATTCTTCGCCGTTACTTCCAGTCCT	108
16	GAGGCATGTTAACATGAGCATTCTCACGATCCTCAGCC	109
*36	CCACAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTGTG	110
50	GGGGCATGGCACATGAGCATTCTGATCCCGCAATCCTC	111
4	ACCGGGCTACTTCGTAGAGCATCTGATCCCGTGTGCG	112
44	AAAGGGCGAACGTAGGTGAGGCATCCATTGGATCCCTTC	113
24	ACGGGCTCTGTCACTGTGGCACTAGCAATAGTCCCAGTC	114
7	GGGCAGACCTCTGGACGAGCATCACCTATGTGATCCC	115
*26	AGAGGGGAAGTAGGCTGCCGTACTCGAGAGAGTCCC	116
19	AGGGGTGCGAACACATAATCCTCGCGGATTCCCATCGCT	117
48	GGGGGGCAATGGCGGTACCTCTGGTCCCTAAAGAG	118
46	GCGGCTCAAAGTCTGCTACCCGCAGCACATCTGTGGTC	119
25	TTGGGCGTGAATGTCCACGGGTACCTCCGGTCCAAAGAG	120
31	TCCGCAGTCCCTGGTAAAGGGCAGCCCTAACTGGTC	121
12	CAAGTCCCCACAAGACTGGGCTGTTCAAACCGCTAGTA	122
15	CAAGTAGGGCGCGACACACGTCCGGGCACCTAACGGTCCC	123
*38	AAAGTCGTGCAGGGTCCCTGGAAGCATCTCGATCCCAG	124

* Zeigt an, dass ein Begrenzungsexperiment durchgeführt wurde.

Kursivdruck zeigt die Klone an, von denen gefunden wurde, dass sie als Minimal-Liganden hohe Affinität beibehielten.

Tabelle 9

Seq.-ID Nr.:	Gruppe A	HELIIX I			HELIIX II			HELIIX III		
97	2	=AGGG-----AGGA-----TACG-----TCTG-AGC-ATCAC3'			5' ATGTGAT-GCCCTGCAG=					
112	4	ACCGGG-----CTAC-----TTC-----GTAG-AGC-ATC-----TCT-----GAT-GCCGGTGCCTCG								
115	7	TGGG-----CGACC-TTCT-----GGACG-AGC-ATC-----CTAT-----GTGAT-GCCG								
109	16	CTGAGG-----CATG-TTA-----CATG-AGC-ATCGT-----CTC-----ACGAT-CCTCTAGGCC								
110	36	CCACAGG-----CTACG-GCA-----CGTAG-AGC-ATCA-----CCA-----TGAT-CCTGTC								
124	38	AAAGTCGTGCAGGS-----TCC-----CCP-----GGA-AGC-ATC-----TCC-----GAT-GCCCTTC								
113	44	AAAGGG-----CGAAC-GTA-----GGTCG-AGGCAATCC-----ATT-----GGAT-GCCCTTC								
111	50	GGGG-----CATG-GCA-----CATG-AGC-ATC-----TCT-----GAT-GCCGCAATCC								
96	23	=AGG-----CAGGATANC-----GTCCCTG-AGC-ATCAC3'			5' AGGTGATCCTGCAA=					
90	34	=GGG-----CTGC-----CCMMAATA-----GCAG-AGC-ATCAC3'			5' CAGCTCATP-CCCMATAN=					
Seq.-ID Nr.:										B
108	13	GCTCGTAGGG-----GGCGGA-TTCTT-----TCCGC-GTT-ACT-----TCC-----AGT-CCTAC								
93	14	TAATACG-----CTT-----GACA-----AAG-GCC-ACCAT-----GGCTTAATGGT-CCTAGTA								
123	15	CTCAAGTAGGG-----CGAAC-ACAC-----GTCCG-GCC-ACC-----TAA-----GGT-CCCAGACTGAG								
104	18	CTGGG-----CGCCCTAACAA-----AGGCTG-GTC-ACT-----TCT-----AGT-CCCAAGGA								
106	20	ATGGGAGGG-----CTGTG-GTT-ACT-----TCT-----AGT-CCCAAGAG								
120	25	CTTGTGAG-----CAGG-GGT-ACC-----TCC-----GGT-CCCAAGAG								
105	30	TCCGGG-----CTCGG-GAT-----TCGTG-GTC-ACT-----TTC-----AGT-CCCGGATATA								
121	31	=AGGG-----CAG-----CCCTAA-----CTG-GTC-acttgatc3'			5' TCCGCCAAAGT-GCCCTGCTAA=					
107	35	ACCCGAGGG-----CAGG-----TTCTT-----CGTG-GTT-ACT-----TTT-----AGT-CCCG								
94	41	=CGG-----CTGAGTA3'			5' TactcAGG-GCC-ATCTGCTGCT-CCCAAT=					
103	47	GTGGGGGATCCGATCCGGG-----ATG-----CCCTC-GTC-ACT-----TCT-----AGT-CCCAact								

Tabelle 70

Häufigkeit von Basenpaaren in den Helixregionen des Consensus-Motivs aus Fig. 3

<u>Position^a</u>	<u>Basenpaar^b</u>						
	<u>AT</u>	<u>TA</u>	<u>GC</u>	<u>CG</u>	<u>TG</u>	<u>GT</u>	<u>Sonstige</u>
I-1	0	0	21	0	0	0	0
I-2	0	0	21	0	0	0	0
I-3	5	0	16	0	0	0	0
I-4	3	5	1	4	1	0	7
I-5	2	3	3	4	0	0	9
II-1	0	1	2	17	0	0	1
II-2	5	5	5	1	0	4	1
II-3	3	4	7	6	0	0	1
II-4	3	0	8	5	0	0	4
III-1	21	0	0	0	0	0	0
III-2	0	10	0	11	0	0	0
III-3	0	7	0	13	1	0	0

^a Helices sind mit römischen Zahlen bezeichnet, wie in [Fig. 3](#) dargestellt ist. Einzelne Basenpaare sind mit arabischen Zahlen nummeriert, beginnend mit Position 1 an der Helixverbindung und ansteigend mit wachsendem Abstand von der Verbindung.

^b Die Erfinder verwendeten in dieser Analyse neben den Watson-Crick-Basenpaaren auch die TG- und GT-Basenpaare. Die Gruppe enthielt insgesamt 21 Sequenzen.

Tabelle 11

Affinitäten der Minimal-DNA-Liganden für PDGF-AA, PDGF-AB und PDGF-BB

<u>Ligand</u>	<u>K_d, nM</u>		
	<u>PDGF-AA^a</u>	<u>PDGF-AB^b</u>	<u>PDGF-BB^b</u>
20t	47 ± 4	0,147 ± 0,011	0,127 ± 0,031
36t	72 ± 12	0,094 ± 0,011	0,093 ± 0,009
41t	49 ± 8	0,138 ± 0,009	0,129 ± 0,011

^a In [Fig. 5A](#) dargestellte Datenpunkte wurden an Gl. 1 (Beispiel 7) angepasst.

^b In [Fig. 5B](#) und [Fig. 5C](#) dargestellte Datenpunkte wurden an Gl. 2 angepasst. Die dargestellten Werte der Dissoziationskonstante (K_d) gelten für die Bindungskomponente mit höherer Affinität. Der Molbruch von DNA, die an PDGF-AB oder PDGF-BB als hochaffine Komponente bindet, liegt zwischen 0,58 und 0,88. Die K_d-Werte für die Wechselwirkung mit niedriger Affinität liegen zwischen 13 und 78 nM.

Tabelle 12

Ausgangs-RNA und PCR-Primer für das 2'-Fluorpyrimidin-RNA-SELEX-Experiment

Ausgangs-2'-Fluorpyrimidin-RNA:	SEQ.-ID NR.
Ausgangs-RNA:	125
5'-GGGAGACAAGAAUACGUCAA[-50 N-]UUC-	
GACAGGAGGCUCACAAACAGGC-3'	
PCR-Primer 1:	126
5'-TAATACGACTCACTATAAGGGAGACAAG-	
AATAACGCTCAA-3'	
PCR-Primer 2:	127
5'-GCCTGTTGTGAGCCTCCTGTCGAA-3'	

Tabelle 13

Sequenzen der hochaffinen 2'-Fluorpyrimidin-RNA-Liganden für PDGF-AB

Seq.-ID Nr.

1	CGGUGGCAUUUCUUCACUUCCUUCUGCUUUCUGCGUUGGGCNCGA	128
2	CCAACCUCUGUCGGCGUUGCUCUUUUGGACGGCACUCAGGCUCCA	129
3	UCGAUCGGUUGUGUGGCCGGACAGCCUUAACCAGGGCUGGGACCGAGGCC	130
4	-CUGAGUAGGGGAGGAAGGUUGAAUAGUUGGGCGCCUCAUUCGC	131
5	CAGCACUUUCGCUUUUCAUCAUUUUUUCUUUCCACUGUUGGGCGCGAA	132
6	UCAGUGCUGGCGUCAUGUCUCGAUGGGGAUUUUUCUUCAGCACUUUGCCA	133
7	UCUACUUUCCAUUUCUCUUUCUUCACAGAGCGGGUUUCCAGUGAACCA	134
8	CGAUAGUGACUACGAUGACGAAGGCCGCGGUUGGAUGCCCGCAUUGA	135
10	GUCGAUACUGGCGACUUGCUCUCAUUGGCCGAUUAACGAUUCGGUCAG	136
13	GUGCAAACUUAACCCGGGAACCGCGCGUUCGAUCGACUUUCCUUUCCA	137
15	AUUCCGCGUCCGAUAAAUCUGUGCUCGGAAACGGUAGCCAUAUGUGCA	138
16	CGAACGAGGGAGGGAGUGGCAAGGGGAUGGUUGGAUAGGCUCUACGCUCA	139
17	GCGAAACUGGCACUUGCUCUCAUUGGCCGAUUAACGAUUCGGUUCAU	140
18	CGAACGAGGGAGGGAGUCGCAAGGGGAUGGUUGGAUAGGCUCUACGCUAA	141
19	CGAGAAGUGACUACGAUGACGAAGGCCGCGGUUGAAUCCCUCAUUGA	142
20	-AAGCAACGAGACCUUGACGCCUGAUGUGACUGUGCUUGCACCCGAUUCUG	143
21	GUGAUUCUCAUUCUCAUUGCUUUCUACACAACUUUCCACUUUCAGCGUGA	144
22	AAGCAACGAGACUCGACGCCUGAUGUGACUGUGCUUGCACCCGAUUCU	145
23	UCGAUCGGUUGUGUGCCGGACAGCUUUGACCAUGAGCUGGGACCGAGGCC	146
24	NGACGNUGGACCUACUAAUCGACUGAUAAGAUCCCCGCCAGAUGGG	147
26	CACUGCGACUUGCAGAACGCCUUGUGUGGGCGUACCCCUUUGGCCUCG	148
27	GGUGGCAUUUCUCAUUUUCCUUCUGCUUUCUCCGCCGUUGGGCGCG	149
29	CCUGAGUAGGGGGAAAGUUGAAUCAGUUGUGGGCGCUCUACUCAUUCGCC	150
30	GUCGAAACUGGCACUUGCUCUCAUUGGCCGAUUAACGAUUCGGUUC	151
31	GCGAUACUGGCACUUGCUCUCAUUGGCCGAUUAACGAUUCGGCUCAG	152
32	ACGUGGGGCACAGGACCGAGAGUCCCUCCGCAAUAGCCGUACCCACC	153
33	CACAGCCUNANAGGGGGAAAGUUGAAUCAGUUGUGGGCGCUCUACUCAUUCGC	154
34	ANGGGNUAUGGUGACUUGCUCCAUUGGCCGAUUAACGAUUCGGUCAG	155
35	CCUGCGUAGGGNNGGAAGUUGAAUCAGUUGUGGGCGCUCUACUCAUUCGCC	156
39	CGAACGAGGGAGGGAGUGGCAAGGGGAUGGUUGGAUAGGCUCUACGCUCA	157
41	GUGCAAACUUAACCCGGGAACCGCGCGUUCGAUUCGUUUCCNUAUUCCA	158
42	CGAACGAGGGAGGGAGUGGCAAGGGACGGUNNAAGGCUCUACGCUCA	159
43	UCGGUGUGGCUCAGAAACUGACACCGCGUGAGCUCUUCGCACACAUUCUGC	160
44	UAUCGCUUUUCAUCAAUCCACUUUUUCACUCUNUAACUUGGGCGUGCA	161
45	GUGCAAACUUAACCCGGGAACCGCGCGUUCGAUCCUGCAUCCUUUUUCC	162
46	UCGNNUCGGUUGUGUGCCGGCAGCUUUGUCCAGCGUUGGGCCGAGGCC	163
47	AGUACCCAUUCUCAUCUUUUCCUUUCCUUUCAAGGCACAUUGAGGGU	164
49	CCUGAGUAGGGGGAAAGUUGAACCGAGUUGUGGGCGCUACUCAUUCNCCA	165
51	CCNNCCUNCUGUCGGCGCUUGUCUUUUGGACGGCAACCCAGGGCUC	166
52	CCAACCUNCUGUCGGCGCUUGUCUUUUGGACGGAGCAACUCAAGGCUCGU	167
53	CCAGCGCAGAUCCCCGGGUGAAGUGACUGCCGGCAACGGCCGCUCCA	168
54	UCCCCGUAAACAACUUUUCAUUUUCACUUUUCAUCCAACCAGUGAGCAGCA	169
55	UAUCGCUUUCAUCAAUCCACUCCUUCACUUCUUUAACUUGGGCGUGCA	170

Tabelle 14

Ausgangs RNAs:

40N7:

5'GGGAGGACGAUGCGG[-40N-]CAGACGACUCGCCCGA 3' (SEQ ID NO: 186)

SELEX-PCR-Primer:

5G7:

5'TAATACGACTCACTATAGGGAGGACGATGC GG 3' (SEQ ID NO: 187)
T7-Promotor

3G7:

5'TCGGGCGAGTCGTCTG 3' (SEQ ID NO: 188)

Tabelle 15
Bedingungen und Fortschritt von SELEX gegen hKGF

Umlauf	[RNA],M	[KGF],M	netto % gebund.	Signal/ Rauschen	PF ^a	Spin ^b	B-Wasch. ^c	U-Wasch. ^d (ml)	SPKD ^e , M	KD ^f , nM
1	1,00E-06	3,00E-07	4,4	11,8				4		5,61E-06
2	4,00E-06	3,00E-07	1,5	4,2				5		1,58E-05
3	1,00E-06	1,00E-07	5,9	20,6				5		8,52E-07
4	1,00E-06	1,00E-07	14,3	12,8				8		3,21E-06
5	3,00E-07	1,00E-08	2,5	4,5				8		7,64E-08
6	3,70E-08	3,70E-09	0,7	2,6				15		3,73E-07
7	4,10E-09	4,10E-10	1,1	8,2				20		2,46E-08
8	4,60E-10	4,60E-11	1,5	8,8				25		2,04E-09
9	5,10E-11	5,10E-12	0,7	5,9				25		8,76E-10
10	1,70E-11	1,70E-12	0,3	2,1				25		4,12E-10
<hr/>										
2'F-SELEX										
1	1,00E-06	3,00E-07	2,9	11,0				4		3,39E-06
2	4,00E-06	3,00E-07	2,2	9,9				5		9,28E-06
3	3,00E-06	3,00E-07	5,7	5,7				5		2,15E-06
4	2,50E-06	3,00E-07	3,9	11,7				8		4,98E-06
5	6,70E-07	3,00E-08	2,3	5,8				8		3,64E-06
6	1,20E-08	1,23E-09	0,3	1,8				15		1,59E-07
7	1,40E-09	1,40E-10	1,1	11,2				20		6,86E-09
8	1,50E-10	1,50E-11	0,4	4,8				25		5,36E-10
9	1,70E-11	1,70E-12	0,2	3,1				25		5,67E-10
10	1,70E-11	1,70E-12	0,3	3,0				25		1,42E-10
<hr/>										

^a Durch Nitrocellulose vorfiltrierte RNA zur Gegenauswahl von Nitrocellulose bindenden Molekülen

^b Kurzes Spinnen der Bindungsreaktion

^c Zum Waschen der eingefangenen Komplexe eingesetztes Puffervolumen

^d Volumen von 0,5 M Harnstoffwaschlösung nach dem Pufferwaschvorgang

^e Aus den Bindungsdaten der einzelnen Umläufe berechneter Einzelpunkt-K_D

^f Aus den Bindungskurven erhaltene K_D-Werte

Tabelle 16
Sequenzen von 2'NH₂- und 2'-F-KGF-Liganden

Klon	5'-konstant	zufällig	3'-Konstant	Seq.-ID Nr.
2'-NH₂-Liganden:				
IN	GGGAGGACCAUUCGGGAGAUAUAGGAAUACGGAAUUCGAAACAAAGUGGCUGGC		CAGACGGACUCGCCCGA	189
2N	GGGAGGACGAUGCGG GCGGGAAAGGUCCGAAGACGGGCAAAGAACGAAUUGCC		CAGACGGACUCGCCCGA	190
4N	GGGAGGACGAUGCGG GUGGUGGAAGAGGGUACCGGAAUUGCUAAAGAACGGCC		CAGACGGACUCGCCCGA	191
6N	GGGAGGACGAUGCGG GCGGGAGCAAUAGAACUCAAGUCAAGGGGUGGG		CAGACGGACUCGCCCGA	192
10N	GGGAGGACGAUGCGG TAGCUGCGUCAUAGCAAGAACUAGAAUAGAUGGGG		CAGACGGACUCGCCCGA	193
11N	GGGAGGACGAUGCGG GGGCGGAUUGGGAAUAGAACUACAAAGAACGGGACGU		CAGACGGACUCGCCCGA	194
14N	GGGAGGACGAUGCGG UCCACGGGAUUGGAAGGUACGGGAAUACAUAAAAGGCC		CAGACGGACUCGCCCGA	195
16N	GGGAGGACGAUGCGG AAGGUUCAACAAGUUAAGGUUCCACUUGAAUGUA		CAGACGGACUCGCCCGA	196
22N	GGGAGGACGAUGCGG AUUGGACGUAGAACAGGUAAUAGUGACACUGGG		CAGACGGACUCGCCCGA	197
24N	GGGAGGACGAUGCGG GUUGGAAGAUAGGGGGGUCCGGACGUAAUAGGG		CAGACGGACUCGCCCGA	198
25N	GGGAGGACGAUGCGG GAGGGAAUUGGGAAACAAUACGUAGGACGUAGGG		CAGACGGACUCGCCCGA	199
27N	GGGAGGACGAUGCGG UUGGCUUCAAAUAGACGGGGUGGACUCCGAGGU		CAGACGGACUCGCCCGA	200
28N	GGGAGGACGAUGCGG UUGGCUUCAAAUAGACGGGGUGGACUCCGAGGU		CAGACGGACUCGCCCGA	201
29N	GGGAGGACGAUGCGG GAGGGGACAAAGAUGGAGGAAGGGAAUUGCGUUGC		CAGACGGACUCGCCCGA	202
34N	GGGAGGACGAUGCGG GCGGGAAAGGCUAAGGAAUUGGAAUICAGUICAGGG		CAGACGGACUCGCCCGA	203
35N	GGGAGGACGAUGCGG GCUUAGGGAAAUUGGUUCUGAGGGGU		CAGACGGACUCGCCCGA	204
36N	GGGAGGACGAUGCGG GAAGGGAAACAGGUAAAGGUAAACGGGAAGUG		CAGACGGACUCGCCCGA	205
37N	GGGAGGACGAUGCGG AUUGGACGUAGAU		CAGACGGACUCGCCCGA	206
42N	GGGAGGACGAUGCGG GAGAGACGUAGACGGGAAUAGAACGGAAACACGGGC		CAGACGGACUCGCCCGA	207
43N	GGGAGGACGAUGCGG GAAGGGAAAGGUACAGUCAAGGGAAUAGGGUGGG		CAGACGGACUCGCCCGA	208
47N	GGGAGGACGAUGCGG GAAGGGGAAAGGGUCAAGGGAAACAGGGCUUCCGGGG		CAGACGGACUCGCCCGA	209
48N	GGGAGGACGAUGCGG GGCAAAAGGAAGIUGGAUUGGGAAUAGGGGG		CAGACGGACUCGCCCGA	210
54N	GGGAGGACGAUGCGG AGAACCAACAGAGCCCCUUGGGGGAAAGGAUUUC		CAGACGGACUCGCCCGA	211
55N	GGGAGGACGAUGCGG ACACACAAAGUGAAGGILUCAGACGGGAUUUCGGGG		CAGACGGACUCGCCCGA	212
57N	GGGAGGACGAUGCGG UCTUUGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG		CAGACGGACUCGCCCGA	213
59N	GGGAGGACGAUGCGG GGUGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG		CAGACGGACUCGCCCGA	214
60N	GGGAGGACGAUGCGG CCCCUUAGGUACGUAGGGGUUAGAG		CAGACGGACUCGCCCGA	215
65N	GGGAGGACGAUGCGG UUACGUGGAAAUAGGGGUAAACAGCUGGGAAACGUAGGG		CAGACGGACUCGCCCGA	216
69N	GGGAGGACGAUGCGG UUACGUGGAAAUAGGGGUAAACAGCUGGGAAACGUAGGG		CAGACGGACUCGCCCGA	217

Tabelle 16 (Seite 2)

Klon	5'-konstant	zufällig	3'-konstant	Seq.-ID Nr.
71N	GGGAGGACGAUGCGG AAACGGGUGGCCAAAGUGAGGGGUAGGAUGUACCAUGGGU GGGAGGACGAUGCGG GAGGGAAAUGAGACCGACAGAUUGACGGAAAGUACUGGG		CAGACGACUCGCCCGA CAGACGACUCGCCCGA	218 219
72N			CAGACGACUCGCCCGA CAGACGACUCGCCCGA	
			CAGACGACUCGCCCGA CAGACGACUCGCCCGA	220
			CAGACGACUCGCCCGA CAGACGACUCGCCCGA	221
			CAGACGACUCGCCCGA CAGACGACUCGCCCGA	222
			CAGACGACUCGCCCGA CAGACGACUCGCCCGA	223
			CAGACGACUCGCCCGA CAGACGACUCGCCCGA	224
			CAGACGACUCGCCCGA CAGACGACUCGCCCGA	225
			CAGACGACUCGCCCGA CAGACGACUCGCCCGA	226
			CAGACGACUCGCCCGA CAGACGACUCGCCCGA	227
			CAGACGACUCGCCCGA CAGACGACUCGCCCGA	228
			CAGACGACUCGCCCGA CAGACGACUCGCCCGA	229
			CAGACGACUCGCCCGA CAGACGACUCGCCCGA	230
			CAGACGACUCGCCCGA CAGACGACUCGCCCGA	231
			CAGACGACUCGCCCGA CAGACGACUCGCCCGA	232
			CAGACGACUCGCCCGA CAGACGACUCGCCCGA	233
			CAGACGACUCGCCCGA CAGACGACUCGCCCGA	234
			CAGACGACUCGCCCGA CAGACGACUCGCCCGA	235
			CAGACGACUCGCCCGA CAGACGACUCGCCCGA	236
			CAGACGACUCGCCCGA CAGACGACUCGCCCGA	237
			CAGACGACUCGCCCGA CAGACGACUCGCCCGA	238
			CAGACGACUCGCCCGA CAGACGACUCGCCCGA	239
			CAGACGACUCGCCCGA CAGACGACUCGCCCGA	240
			CAGACGACUCGCCCGA CAGACGACUCGCCCGA	241
			CAGACGACUCGCCCGA CAGACGACUCGCCCGA	242
			CAGACGACUCGCCCGA CAGACGACUCGCCCGA	243
			CAGACGACUCGCCCGA CAGACGACUCGCCCGA	244
			CAGACGACUCGCCCGA CAGACGACUCGCCCGA	245
			CAGACGACUCGCCCGA CAGACGACUCGCCCGA	246
			CAGACGACUCGCCCGA CAGACGACUCGCCCGA	247

Tabelle 16 (Seite 3)

Klon	5'-konstant	zufällig	3'-konstant	Seq.-ID Nr.
41F	GGGAGGGACGAUGCGG	GGACUUUUGCAUUGAUUUUCGACCUGUUCCCCGUGGC	CAGAGGACACUCCCGGA	248
42F	GGGAGGGACGAUGCGG	CGACACAAUAGCCUUUGGAUGGGCUCCCCGUGGCC	CAGAGGACACUCCCGGA	249
43F	GGGAGGGACGAUGCGG	UGUAGGUUUCCUGUAUGCCAUUCUUCUCCAUUGCCACGC	CAGAGGACACUCCCGGA	250
44F	GGGAGGGACGAUGCGG	UGCAGUGUUCUCCUUCGGUAACUAUUNNNNAUUCGUGCC	CAGAGGACACUCCCGGA	251
45F	GGGAGGGACGAUGCGG	GUCGUAAUUCAUUCUCCUUGGUUCGUUGGACCCUGGCC	CAGAGGACACUCCCGGA	252
49F	GGGAGGGACGAUGCGG	GGACUUUGACAQGAUUGAACUUCGGCUUUCGUGGCC	CAGAGGACACUCCCGGA	253
50F	GGGAGGGACGAUGCGG	UGAUCAAUCGGGCCUUACUCUUGGGCUACCGUGGCC	CAGAGGACACUCCCGGA	254
51F	GGGAGGGACGAUGCGG	CAGUCUCCUAGGUUUCALUCUCUGGAGCAUUCGGGUNC	CAGAGGACACUCCCGGA	255
53F	GGGAGGGACGAUGCGG	AUCAAAAGCACUCAUUCCCGGCUCGUUCGUUCGCC	CAGAGGACACUCCCGGA	256
54F	(GGAGGGACGAUGCGG	AGAUCUCCCAACUGCTGUUCUAAAUCUCUCCGGGUCCC	CAGAGGACACUCCCGGA	257
55F	GGGAGGGACGAUGCGG	UCCGUCAAACGGCAUAAAACUGGAAUACUCUCCGGCC	CAGAGGACACUCCCGGA	258
56F	GGGAGGGACGAUGCGG	GGACAAWAGCGGUGUICUIUCAUCUUNKAUCUCCGACRUCC	CAGAGGACACUCCCGGA	259
57F	GGGAGGGACGAUGCGG	UGACUAUCUGGUCCGAUCCAUCACCCGAGCCACCGGC	CAGAGGACACUCCCGGA	260
58F	GGGAGGGACGAUGCGG	GAACUAUGGCCGUGAUUACCAUCAGGGUCCUUGGCC	CAGAGGACACUCCCGGA	261
60F	GGGAGGGACGAUGCGG	UGACAUUGGAAUUCUACGGGGCCGAUCCUGCCAGCCGUUUA	CAGAGGACACUCCCGGA	262

Tabelle 17

K_d-Werte für hKGF-Liganden

Klon	K _d in nM		Klon	K _d in nM	
	1	2		1	2
1N	0,51		2F	1,77	
2N	0,77		3F	4,47	
4N	0,75		5F	2,53	
6N	0,71		6F	0,05 (37)	3,25
10N	1,10		7F	3,69	
11N	1,28		8F	2,63	
14N	0,44		9F	0,83	
16N	1,40		10F	0,47	
22N	5,70		11F	3,74	
24N	1,16		12F	1,38	
25N	0,87		13F	0,03 (28)	
27N	NB		14F	0,006-0,03 (25-44)	
28N	2,54		15F	0,07 (33)	
29N	0,43		16F	0,83 (49)	3,39
34N	0,80		19F	1,5	0,94-2,57
35N	2,32		20F	2,05	8,70
36N	8,27		21F	NB	44,8
37N	NB		22F	2,75	
42N	0,78		23F	2,52	
43N	0,79		24F	2,02	
47N	1,76		26F	0,23 (43)	2,55
48N	1,34		27F	1,52	
54N	5,35		28F	NB	
55N	1,25		29F	3,24	
57N	35,8		31F	1,0	
59N	22,0		35F	1,1	
60N	7,38		37F	0,46	
65N	26,56		38F	0,33	
69N	15,20		41F	1,44	
71N	3,52		42F	0,9	
72N	7,67		43F	1,13	
zufällig	30		44F	1,32	
			45F	4,7	
			49F	1,0	
			50F	0,12 (21)	2,10
			51F	1,27	
			53F	0,70	
			54F	1,23	
			55F	2,52	
			56F	0,07 (32)	3,00
			57F	1,20	
			58F	2,52	
			60F	2,10	
			zufällig	30	

Bei biphasigen Kurven gilt Kd1 für die hochaffine Komponente.

Zahlen in Klammern stehen für den Prozentsatz der hochaffinenen Komponente.

Tabelle 18

Bindungsspezifität für den 2'-F-Liganden K14F

Target	Verhältnis: $K_D\text{Target}/K_D\text{hKGF}$
menschliches hKGF	1
Ratten-hKGF	1,254
menschliches aFGF	38,650
menschliches bFGF	1,071
menschliches PDGF	432

Die Verhältnisse sind Mittel aus zumindest zwei Bestimmungen

Tabelle 19

 IC_{50} -Werte aus dem PC-3-Test

Konkurrent	IC_{50} , nM
hKGF	70
Heparin, 5,000	30
40N7F	>1000
K6F	4
K13F	30
K14F	10
K15F	20
K56F	1
K10F	30
K37F	20
K38F	0,6
K43F	80
40N7N	>1000
K1N	50
K2N	200
K4N	70
K6N	80
K14N	6
K29N	40
K42N	800
K43N	800

Tabelle 20

Ki-Werte von hKGF-Konkurrenten im PC3- und NIH3T3/FGFR-2-Konkurrenztest

Zelllinie	Konkurrent	Ki, nM	R
PC-3	hKGF	7,700	0,95519
	2'F zufällig	930,000	0,99713
	2'NH ₂ zufällig	673.000	0,85357
	Hep5000	6,500	0,99984
	K14F	0,200	0,97735
	K6F	0,160	0,95927
	K38F	0,220	0,99013
	K56F	0,160	0,95927
NIH3T3/FGFR-2	K14N	1,400	0,94698
	hKGF	0,034	0,9933
	2'F zufällig	>10.000.000	
	2'NH ₂ zufällig	>10.000.000	
	Hep5000	26,300	0,97856 teilw. komp.
	K14F	2,700	0,99047
	K6F	6,800	0,96202
	K38F	20,000	0,98659
	K56F	27,400	0,97582
	K14N	10,600	0,97856 teilw. komp.

Tabelle 21

Durch eine Gelretentionsanalyse erhaltene IC50-Werte

Konkurrent	IC50, nM
KGF	70
bFGF	1.500
Lysozym	10.000

Tabelle 22

Bindungsspezifität des Liganden K14F3'T

Protein	Zufalls-RNA		K14F3'T		^c DF
	^a K _d 1, nM	^b K _d 2, nM	K _d 1, nM	K _d 2, nM	
hKGF		20,1	0,0008	10,2	1
rKGF		45,3	0,0041	70,0	5
hbFGF	0,0375	10,3		10,0	1,2x10 ⁴
haFGF		16.000.000		24.000.000	3x10 ¹⁰
hPDGF-AB		22,0		50,0	6,2x10 ⁴
hTGF β 1		10,4		98,0	1,2x10 ⁵
hEGF		2.000		256	3,2x10 ⁵
Thrombin		7.200.000		22.700.000	2,8x10 ¹⁰

^a Hochaffine Dissoziationskonstante aus biphasigen Bindungskurven.

^b Niederaffine Dissoziationskonstante aus biphasigen Bindungskurven oder Affinitätsdissoziationskonstante aus monophasigen Bindungskurven.

^c Diskriminationsfaktor, definiert als Verhältnis zwischen dem Höchstaffinitäts-K_d von 14F3'T für das entsprechende Protein und dem Affinitäts-K_d für hKGF.

Tabelle 23

		S1 GGGAGG AC <u>GAUGGGGG</u> UCUCCC AUUCUAACUUUCU <u>CCAUUCGUAU</u>	L1 S2 L3 S1 S2 L1 T	S1 GGGAGG AC <u>GAUGGGGG</u> UCUCCC AUUCUAACUUUCU <u>CCAUUCGUAU</u>	L2 S2 L3 S1 S2 L1 T	Seq.-ID Nr. 272
T2		GGGAGG AC GAUGGGGG UCUCCC AUUCUAACUUUCU CCAUUCGUAU..				273
T3		GGGAGG AC ..UGGGGG UCUCCC AUUCUAACUUUCU CCAUUCGUAU..				274
T4		GGGAGG AC GAUGGGGG UCUCCC ...CUAAACUUUCU CCAUUCGUAU..				275
T5		GGGAGG AC GAUGGGGG UCUCCC AUUCUA...AUUCUA CCAUUCGUAU..				276
T6		GGGAGG AC GAUGGGGG UCUCCC AUUCUA...AUUCUA CCAUUCGUAU..				277
T7		GGGAGG AC GAUGGGGG UCUCCC AUUCUA...AACU..AACU CCAUUCGUAU..				278
T8	..	GAGG AC GAUGGGGG UCUCCC AUUCUAACUUUCU CCAUUCGUAU..				279
T10		GGGAGG AC GAUGGGGG UCUCCC AUUCUA...AUUCU..UUCU CCAUUCGUAU..				280
T11		GGGAGG AC GAUGGGGG UCUCCC AUUCUA...AUUCU..UUCU CCAUUCGUAU..				281
T12		GGGAGG AC GAUGGGGG UCUCCC AUUCUA...AUUCU..UUCU CCAUUCGUAU..				282
T13		GGGAGG AC GAUGGGGG UCUCCC AUUCUA...AUUCU..UUCU CCAUUCGUAU..				283
T14	..	GAGG AC GAUGGGGG UCUCCC AUUCUA...AUUCU..UUCU CCAUUCGUAU..				284
T15	..	GAGG AC GAUGGGGG UCUCCC AUUCUA...AUUCU..UUCU CCAUUCGUAU..				285
T16		GGGAGG C GAUGGGGG UCUCCC AUUCUA...AUUCU..UUCU CCAUUCGUAU..				286
T18		GGGAGG AC GAUGGGGG UCUCCC AUUCUA...AUUCU..UUCU CCAUUCGUAU..				287
T19		GGGAGG AC GAUGGGGG UCUCCC AUUCUA...AUUCU..UUCU CCAUUCGUAU..				288
T20		GGGAGG AC GAUGGGGG UCUCCC AUUCUA...AUUCU..UUCU CCAUUCGUAU..				289
T21		GGGAGG AC GAUGGGGG UCUCCC AUUCUA...AUUCU..UUCU CCAUUCGUAU..				290
T22		GGGAGG AC GAUGGGGG UCUCCC AUUCU..UUCU CCAUUCGUAU..				291
T29	GGG..	GGG.. AC GAUGGGGG C.CCC AUUCUA...UUCU CCAUUCGUAU..				292
T30	GGG..	GGG.. AC GAUGGGGG ...CCC AUUCUA...UUCU CCAUUCGUAU..				293
T31	...GG	...GG AC GAUGGGGG ...CCC AUUCUA...UUCU CCAUUCGUAU..				294
T32	...GG	...GG AC GAUGGGGG ...CCC AUUCUA...UUCU CCAUUCGUAU..				295

Tabelle 23 (Seite 2)

	S1	I.1	S2	S1'	-L3	S2'	L	H	
Seq.-ID Nr.	T33	...	GAU GCG GGG G	... CCC AAU UCU A UUC U	CCA UCG U AUC	296	297	
	T34	...	GAU GCG GGG G	UCU CCC AAU UCU A UUC U	CCA UCG U AUC	298	298	
	T35 GGG G	UCU CCC AAU UCU A UUC U	CCA UCG U AUC	299	299	
	T36	GGGAGG	AC GAUG .	UCU CCC AAU UC UUC U	CCA UCG U AUC	300	300	
	T37	GGGAGG	AC GAUG GGG G	UCU CCC AAU UC UUC U	CAA UCG U AUC	301	301	
	T39	GGGAGG	AC GAUG GGG G G	UCU CCC AAU UC UUC U	CAUC G U AUC	302	302	
	T40	GGGAGG	AC GAUG GGG G G .	UCU CCC AAU UC UUC U	CC. UCG U AUC	303	303	
	T41	GGGAGG	AC GAUG GGG G G .	UCU CCC AAU UC UUC U	C. UCG U AUC	304	304	
	T2 2m	GGGAGU	AC GAUG GGG G G .	UCU CCC AAU UC UUC U	CCA UCG U AUC			
	T35/36								äquimolare Mengen von T35 und T36

Molare Mengen von T35 und T36

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

- (i) ANMELDER: LARRY GOLD, NEBOJSA JANJIC, STEVEN RINGQUIST,
NIKOS PAGRATIS, PENELOPE J. TOOTHMAN
- (ii) TITEL DER ERFINDUNG: HOCHAFFINE OLIGONUCLEOTIDLIGANDEN FÜR DEN
TRANSFORMIERENDEN WACHSTUMSFAKTOR β
(TGF β), DEN AUS BLUTPLÄTTCHEN GEWONNENEN
WACHSTUMSFAKTOR (PDGF) UND DEN
MENSCHLICHEN KERATINOZYTENWACHSTUMS-
FAKTOR (hKGF)
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 304
- (iv) KORRESPONDENZADRESSE:
 - (A) ADRESSAT: Swanson & Bratschun, L.L.C.
 - (B) STRASSE: 8400 E. Prentice Avenue, Suite 200
 - (C) STADT: Englewood
 - (D) BUNDESSTAAT: Colorado
 - (E) LAND: USA
 - (F) POSTLEITZAHL: 80111
- (v) COMPUTERLESBARE FORM:
 - (A) ART DES MEDIUMS: Diskette, 3,5 Zoll, 1,44 Mb
 - (B) COMPUTER: IBM-kompatibel
 - (C) BETRIEBSSYSTEM: MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: WordPerfect 6.1
- (vi) AKTUUELLE ANMELDUNGSDATEN:
 - (A) ANMELDUNGSDATUM: US96/
 - (B) EINREICHDATUM:
 - (C) KLASSIFIZIERUNG:
- (vii) PRIORITÄTSANMELDUNGSDATEN:
 - (A) ANMELDUNGSDATUM: 08/458.423
 - (B) ANMELDUNGSDATUM: 2. Juni 1995
- (viii) PRIORITÄTSANMELDUNGSDATEN:
 - (A) ANMELDUNGSDATUM: 08/458.424
 - (B) ANMELDUNGSDATUM: 2. Juni 1995
- (ix) PRIORITÄTSANMELDUNGSDATEN:
 - (A) ANMELDUNGSDATUM: 08/465.594
 - (B) ANMELDUNGSDATUM: 5. Juni 1995
- (x) PRIORITÄTSANMELDUNGSDATEN:
 - (A) ANMELDUNGSDATUM: 08/465.591
 - (B) ANMELDUNGSDATUM: 5. Juni 1995
- (xi) PRIORITÄTSANMELDUNGSDATEN:
 - (A) ANMELDUNGSDATUM: 08/479.725
 - (B) ANMELDUNGSDATUM: 7. Juni 1995
- (xii) PRIORITÄTSANMELDUNGSDATEN:
 - (A) ANMELDUNGSDATUM: 08/479.783
 - (B) ANMELDUNGSDATUM: 7. Juni 1995
- (xiii) PRIORITÄTSANMELDUNGSDATEN:
 - (A) ANMELDUNGSDATUM: 08/618.693
 - (B) ANMELDUNGSDATUM: 20. März 1996
- (xiv) INFORMATIONEN ÜBER ANWALT/VERTRETER:
 - (A) NAME: Barry J. Swanson
 - (B) REGISTRATIONSNUMMER: 33.215
 - (C) KENNZAHL/ZEICHEN:
- (xv) TELEKOMMUNIKATIONSANGABEN:
 - (A) TELEFON: (303) 793-3333
 - (B) TELEFAX: (303) 793-3433

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 117 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 1:

GGGGGAGAAC GCGGAUCNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNAAGCUUCG CUCUAGAUCA CCCUUUAGUG AGGUUA	50 100 117
---	------------------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 93 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 2:

GGGGGAGAAC GCGGAUCNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNAAGCUUCG CUCUAGAUCA AGAUCUCCU UUAGUGAGGG UUA	50 93
--	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 3:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 123 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 3:

GGGGGAGAAC GCGGAUCUG UCUCACCGC CGAUACUGGG GUUCCUGGGG CCCCUCCAUG GAGGAGGGGG GAGGGGGUGG UUCGGAGAAA GCUUCGCUCU GAAUCUCCU UUAGUGAGGG UUA	50 100 123
--	------------------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 4:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 95 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 4:

GGGAGAACGC GGATCCNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN AAGCTTCGCT CTAGA	50 95
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 5:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 5:

GGGAGAACGC GGATCCNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNAAGC TTGCTCTAG A	50 71
--	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 6:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 95 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 6:

GGGGGAGAAC	GCGGATCTTG	TCTCCACCGC	CGATACTGGG	GTTCCCTGGGG	50
CCCCCTCCATG	GAGGAGGGGG	TGGTTCGGAG	AAAGCTTCGC	TCTAG	95

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 7:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 7:

TAATACGACT	CACTATAGGG	GGAGTCTGCG	GATCC	35
------------	------------	------------	-------	----

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 8:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 8:

TAATACGACT	CACTATAGGG	GGAGAACGCG	GATCC	35
------------	------------	------------	-------	----

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 9:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 9:

TAACCCTCAC	TAAAGGGAGA	TCTAGAGCGA	AGCTT	35
------------	------------	------------	-------	----

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 10:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 50 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 10:

GATTTAGGTG	ACACTATAGA	ATATGCATCA	CTAGTAAGCT	TTGCTCTAGA	50
------------	------------	------------	------------	------------	----

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 11:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 11:

GGATCCCGGA GCTCCCTATA GTGAGTCGTA TTA**33**

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 12:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 125 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 12:

GGGGGAGAAC GCGGAUCCGA GCAAUCCCAG GCGCAUAGCU UCCGAGUAGA	50
CAGGAGGGAG GGGUGGAUGU GGCGUCUACU CGGUGUCGUG AAGCUUCGCU	100
CUAGAUCCCC CUUUAGUGAG GGUUA	125

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 13:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 125 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 13:

GGGGGAGAAC GCGGAUCCGA GCAACCCCAG GCGCAUAGCU UCCGAGUAGA	50
CAGGAGGGAG GGGUGGAUGU GGCGUCUACU CGGUGUCGUG AAGCUUCGCU	100
CUAGAUCCCC CUUUAGUGAG GGUUA	125

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 14:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 125 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 14:

GGGGGAGAAC GCGGAUCCGA GCAACCCCAG GCGCAUAGCU UCCGAGUAGA	50
CAGGCAGGGAG GGGUGGAUGU GGCGUCUACU CGGAGUCGUG AAGCUUCGCU	100
CUAGAUCCCC CUUUAGUGAG GGUUA	125

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 15:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 116 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Amino- (2'-NH₂-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 15:

GGGGGAGAAC GCGGAUCCGG CAACCCAGG CGCAUAGCUU CCGAGUAGAC	50
AGGCAGGGAGG GGUGGAUGUG GCGUCACGAG GAAGCUUCGC UCUAGAUCUC	100
CCUUUAGUGA GGGUUA	116

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 16:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 123 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 16:

GGGGGAGAAC GCGGAUCCGC AAUCCCAGGC GCAUAGCUUC CGAGUAGACA	50
GGAGGGAGGG GUGGAUGUGG CGCUUACUCG GCGUCGUGAA GCUUCGCUCU	100
AGAUCUCCU UUAGUGAGGG UUA	123

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 17:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 117 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Amino- (2'-NH₂-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 17:

GGGGGAGAAC GCGGAUCCGA GCAAUCCCAG GCGCAUAGCU UCCGAGUAGA	50
CAGGAGGGAG GGGUGGAUGU GGCGUCUCGA GGAAGCUUCG CUCUAGAUCU	100
CCCUUUAGUG AGGGUUA	117

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 18:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 123 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Amino- (2'-NH₂-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 18:

GGGGGAGAAC GCGGAUCCGA GCAAGCCCCUG GCAUAGCUUC CGAGUAGACA	50
GGAGGGAGGG GUGGAUGUGG CGCUUACUCG GUGUCGUGAA GCUUCGCUCU	100
AGAUCUCCU UUAGUGAGGG UUA	123

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 19:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 115 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Amino- (2'-NH₂-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 19:

GGGGGAGAAC GCGGAUCCGG CAAUCCCAGG CGCAUAGCUU CCGAGUAGAC	50
AGGAGGGAGG GGUGGAUGUG GUGUACGAGG AAGCUUCGCU CUAGAUCUCC	100
CUUUAGUGAG GGUUA	115

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 20:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 116 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 20:

GGGGGAGAAC GCGGAUCCGA GCAAUCCCAG GCGCAUAGCU UCCGAGGUAGA	50
CAGGAGGGAG GGGUGGAUGU GGUGUCUCGA GAAGCUUCGC UCUAGAUUC	100
CCUUUAGUGA GGGUUA	116

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 21:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 98 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 21:

GGGGGAGAAC GCGGAUCCAA GCUUCGAGUA GACAGGAGGG AGGGGUGGAU	50
GUGGAGUCUC GAGAACGUUC GCUCUAGAUC UCCCCUUUAGU GAGGGUUA	98

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 22:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 113 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 22:

GGGGGAGAAC GCGGAUCCGA GCAAUCCUA GCAUAGCUUC GAGUAGACAG	50
GAGGGAGGGG UGGAUGUGGC GUCUCGAGAA GCUUCGCUCU AGAUCUCCU	100
UUAGUGAGGG UUA	113

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 23:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 116 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Us sind 2'-F-Uracil

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Cs sind 2'-NH₂-Cytosin

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 23:

GGGGGAGAAC GCGGAUCCGA GCAAUCCCGG GCGCAUAGCU UCCGAGGAGA	50
CAGGCAGGGAG GGGUGGAUGU GGUGUCUCGA GAAGCUUCGC UCUAGAUUC	100
CCUUUAGUGA GGGUUA	116

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 24:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 116 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
 (ix) MERKMALE:
 (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Us sind 2'-F-Uracil
 (ix) MERKMALE:
 (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Cs sind 2'-NH₂-Cytosin
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 24:

GGGGGAGAAC GCGGAUCCGA GCAAUCCAG GCGCAUAGCU UCCGAGUAGA	50
CAGGCAGGAG GGGUGGAUGU GGCGUCUCGA GAAGCUUCGC UCUAGAUCUC	100
CCUUUAGUGA GGGUUA	116

 (2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 25:
 (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 42 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
 (ix) MERKMALE:
 (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 25:

GCUUCCGAGU AGACAGGAGG GAGGGGUGGA UGUGGCGUCU AC	42
--	----

 (2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 26:
 (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 43 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 26:

CUUCCGAGUA GACAGGAGGG AGGGGUGGAU GUGGCGUCUA CUC	43
---	----

 (2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 27:
 (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 78 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
 (ix) MERKMALE:
 (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Amino- (2'-NH₂-) modifiziert
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 27:

GGGGGAGAAC GCGGAUCCGG CAACCCCAGG CGCAUAGCUU CCGAGUAGAC	50
AGGCAGGAGG GGUGGAUGUG GCGUCACG	78

 (2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 28:
 (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 117 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
 (ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Amino- (2'-NH₂-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 28:

GGGGGAGAAC	GCGGAUCCUG	AGAAGGACGU	CGGGGUCAAC	GGGGUGAGGU	50
GCAGCAGAAA	GGGCCGGCAC	CACAUGACGU	AAAAGCUUCG	CUCUAGAUCA	100
CCCUUUAGUG	AGGGUUA				117

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 29:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 108 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 29:

GGGGGAGAAC	GCGGAUCCUG	AGAAGGACGU	CGGGGUGAGG	UGCAGCAGAA	50
AGGGCCGGCA	CCACAUGACG	UAAAAGCUUC	GCUCUAGAUC	UCCCUUUAGU	100
GAGGGUUA					108

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 30:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 92 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 30:

GGGGGAGAAC	GCGGAUCCGG	UGGGAAAGUC	GGAUUAUGUG	UGUAGAUUUG	50
UGUGCGAAAG	CTUUCGCUCUA	GAUCUCCUU	UAGUGAGGGU	UA	92

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 31:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 69 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Amino- (2'-NH₂-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 31:

GGAGAACGCG	GAUCCUGAGA	AGGACGUCGG	GGUCAACGGG	GUGAGGUGCA	50
GCAGAAAGGG	CCGGCACCA				69

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 32:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 117 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 32:

GGGGGAGAAC GCGGAUCCUG CUAGACCGAG GAUGCAAAGG GACAUGCAUU	50
AGGGAAACCU AUGUAUAAGA ACGCGGUCGC AGAAGCUUCG CUCUAGAUU	100
CCCUUUAGUG AGGGUUA	117

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 33:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 83 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 33:

GGGGGAGAAC GCGGAUCCUG CUAGACCGAG GAUGCAAAGG GACAUGCAUU	50
AGGGAAACCU AUGUAUAAGA ACGCGGUCGC AGA	83

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 34:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 116 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 34:

GGGGGAGAAC GCGGAUCCUG CUAGACCGAG GAUGCAAAGG GACAUGCAUU	50
AGGGAAACCU AUUAUAAGAA CGCGGUCGCA GAAGCUUCGC UCUAGAUCUC	100
CCUUUAGUGA GGGUUA	116

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 35:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 117 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Cs sind 2'-F-Uracil

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Us sind 2'NH₂-Cytosin

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 35:

GGGGGAGAAC GCGGAUCCUG UCUCACCACGC CGAUACUGGG GUUCCUGGGG	50
CCCCUCCAUG CAGGAGGGGG GUGGUUCGGA GAAAGCUUCG CUCUAGAUU	100
CCCUUUAGUG AGGGUUA	117

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 36:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 81 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Cs sind 2'-F-Uracil

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Us sind 2'NH₂-Cytosin

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 36:

GGGGGAGAAC GCGGAUCCUG UCUCCACCGC CGAUACUGGG GUUCCUGGGG CCCCUCCAUG CAGGAGGGGG GUGGUUCGGA G	50 81
--	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 37:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 117 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMAL:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Cs sind 2'-F-Uracil

(ix) MERKMAL:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Us sind 2'NH₂-Cytosin

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 37:

GGGGGAGAAC GCGGAUCCUG UCUCCACCGC CGAUACUGGG GUUCCUGGGG CCGCUCCAUG CAGGAGGGGG GUGGUUCGGA GAAAGCUUCG_CUCUAGAUCU CCCUUUAGUG AGGGUUA	50 100 117
--	------------------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 38:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 115 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMAL:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Cs sind 2'-F-Uracil

(ix) MERKMAL:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Us sind 2'NH₂-Cytosin

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 38:

GGGGGAGAAC GCGGAUCCUG UCUCCACCGC CGAUACUGGG GUUCCUGGGG CCCUCCAUG CAGGAGGGGU GGUUCGGAGA AAGCUUCGCU CUAGAUCUCC CUUAGUGAG GGUUA	50 100 115
--	------------------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 39:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 92 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMAL:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 39:

GGGGGAGAAC GCGGAUCCGG AAGUCUGGUC UUUGGGAGU CCGCAUGGCC CUGGCGAAAG CUUCGCUCUA GAUCUCCUU UAGUGAGGGU UA	50 92
--	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 40:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 111 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 40:

GGGGGAGAAC CGCGAUCCAA GAAUGUUCGG CCGCACGAGG UGACAGUGGU	50
GCGGAUACGG ACCGAUUGGG UUUGCACAGC UUCGCUCUAG AUCUCCUUU	100
	111

AGUGAGGGUU A

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 41:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 117 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 41:

GGGGGAGAAC CGCGAUCCGG UCACCCGGGC AUUAACAAU GCCGACACUG	50
GGGUACCUUGG GACGGGUGGG ACUGGACGGA AGAAGCUUCG CUCUAGAUCU	100
CCCUUUAGUG AGGGUUA	117

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 42:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 119 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 42:

GGGGGAGAAC CGCGAUCCAU AACCGGCUGC AUGGGAGGGG CAUCCUGGG	50
AAGGACGGGU CGAGAUGACC UGAGCAGUUC CGGCAAGCUU CGCTUCUAGAU	100
CUCCCUUUAG UGAGGGUUA	119

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 43:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 43:

TCGGGCGAGT CGTCTGNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN	50
NNNNNNCCGC ATCGTCCTCC C	71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 44:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 44:

TAATACGACT CACTATAGGG AGGACGATGC GG	32
-------------------------------------	----

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 45:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 16 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 45:

TCGGGCGAGT CGTCTG

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 46:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 71 Basenpaare
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 46:

GGGAGGACGA TGC GGNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNN
NNNNNCAGAC GACTCGCCCG A

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 47:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 15 Basenpaare
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 47:

GGGAGGACGA TGC GG

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 48:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 19 Basenpaare
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA
(ix) MERKMAL:
(D) WEITERE INFORMATIONEN: N an Position
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 48:

NNNTCGGGCG AGTCGTCTG

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 49:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 87 Basenpaare
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 49:

GCT GTTG TG AGC CCT CTGT CGA ANNNNN NNNNNNNNNN NNN
NNNNNNNNNN NNNNTGAGC GTTT ATTCTT GTCTCCC

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 50:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 40 Basenpaare
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 50:

TAATACGACT CACTATAAGGG AGACAAGAAT AAACGCTCAA

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 51:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 51:

GCCTGTTGTG AGCCTCCTGT CGAA

24

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 52:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 87 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 52:

GGGAGACAAG AATAAACGCT CAANNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN
NNNNNNNNNN NNNTTCGACA GGAGGCTCAC AACAGGC

50

87

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 53:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 53:

GGGAGACAAG AATAAACGCT CAA

23

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 54:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA
- (ix) MERKMAL:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: N an den Positionen 1-3 ist Biotin
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 54:

NNNGCCTGTT GTGAGCCTCC TGTCGAA

27

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 55:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 55:

GGGAGGACGA TGCGGCCAGG GGGGTATGG GGGTGGTGCT ACTTACTTGC
GTCTTCAGAC GACTCGCCCC A

50

71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 56:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 56:

GGGAGGACGA TGCGGCCAGG GGGGGTATGG GGGTAGTGCT ACTTACTTGCGTCTTCAGAC GACTCGCCCG A	50 71
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 57:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 57:

GGGAGGACGA TGCGGCCAGG GGGGGTATGG GGGTAGTACT ACTTACTTACGTCTTCAGAC GACTCGCCCG A	50 71
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 58:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 70 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 58:

GGGAGGACGA TGCGGCCAGG GGGGGTATGG GGGTATACTA CTTACTTACGTCTTCAGACG ACTCGCCCG A	50 70
--	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 59:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 59:

GGGAGGACGA TGCGGCCAGG GGGGGTATGG GGGTAATACT ACTTACTTACATCTTCAGAC GACTCGCCCG A	50 71
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 60:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 60:

GGGAGGACGA TGCGGCCAGG GGGGGTATGG GGGTAATACT ACTTACTTACGTCTTCAGAC GACTCGCCCG A	50 71
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 61:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) MOLEKÜLTYP: DNA		
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 61:		
GGGAGGACGA TGCGGCCAGG GGGGGTATGG GGGTGGTGT ACTTACTTGC	50	
GTCTTCAGAC GACTCGCCCG A	71	
(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 62:		
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:		
(A) LÄNGE: 71 Basenpaare		
(B) TYP: Nucleinsäure		
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) MOLEKÜLTYP: DNA		
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 62:		
GGGAGGACGA TGCGGCCAGG GGGGGTATGG GGGTGGTGT CTCTACTTGC	50	
GTCTTCAGAC GACTCGCCCG A	71	
(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 63:		
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:		
(A) LÄNGE: 73 Basenpaare		
(B) TYP: Nucleinsäure		
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) MOLEKÜLTYP: DNA		
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 63:		
GGGAGGACGA TGCGGCCAGG GGGGGTATGG GGGTGGTGT CTCTTTCTTG	50	
CGTCTTCCAG ACGACTCGCC CGA	73	
(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 64:		
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:		
(A) LÄNGE: 72 Basenpaare		
(B) TYP: Nucleinsäure		
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) MOLEKÜLTYP: DNA		
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 64:		
GGGAGGACGA TGCGGCCAGG GGGGGTATGG GGGTGGTTCG TTTTTCTTTG	50	
CGGCTTCAGA CGACTCGCCC GA	72	
(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 65:		
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:		
(A) LÄNGE: 71 Basenpaare		
(B) TYP: Nucleinsäure		
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) MOLEKÜLTYP: DNA		
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 65:		
GGGAGGACGA TGCGGCCAGG GGGGGTGTGG GGGTGGTGT CTCTTTCTTG	50	
TCTTCCAGAC GACTCGCCCG A	71	
(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 66:		
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:		
(A) LÄNGE: 71 Basenpaare		
(B) TYP: Nucleinsäure		
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach		
(D) TOPOLOGIE: linear		

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 66:

GGGAGGACGA TGCGGCCAGG GGGGTATGG GGGTGGTTG GTATGTTGCG	50
TCCGTCAGAC GACTCGCCCC A	71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 67:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 67:

GGGAGGACGA TGCGGCCGGG GTGGGTATGG GGGTAATACT ACTTACTTAC	50
GTCTTCAGAC GACTCGCCCC A	71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 68:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 72 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 68:

GGGAGGACGA TGCGGCCGGG GGTGGTAGG GGGTAGTG C TACTTACTTA	50
CGTCTTCAGAC GACTCGCCCC GA	72

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 69:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 69:

GGGAGGACGA TGCGGCCAGG GTCGGTGTGG GGGTAGTACT ACTTACTTGC	50
GTCTTCAGAC GACTCGCCCC A	71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 70:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 70:

GGGAGGACGA TGCGGCCAGG GTGGGTATGG GGGTAGTGCT ACTTACTTGC	50
GTCTTCAGAC GACTCGCCCC A	71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 71:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 71:

GGGAGGACGA TGCGGCCGG GTGGGTATGG GGGTGGTGCT ACTTACTTGC GTCTTCAGAC GACTCGCCCG A	50 71
(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 72:	
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:	
(A) LÄNGE: 71 Basenpaare	
(B) TYP: Nucleinsäure	
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach	
(D) TOPOLOGIE: linear	
(ii) MOLEKÜLTYPE: DNA	
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 72:	
GGGAGGACGA TGCGGCCCTGG GTGGGTATGG GGGTGGTGCT ACTTACTTGC GTCTTCAGACG ACTCGCCCG A	50 71
(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 73:	
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:	
(A) LÄNGE: 72 Basenpaare	
(B) TYP: Nucleinsäure	
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach	
(D) TOPOLOGIE: linear	
(ii) MOLEKÜLTYPE: DNA	
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 73:	
GGGAGGACGA TGCGGCCACG GGTGGGTGTG GGGTAGTGTG TCTCACTTTA CATCACCAAGA CGACTCGCCCC GA	50 72
(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 74:	
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:	
(A) LÄNGE: 71 Basenpaare	
(B) TYP: Nucleinsäure	
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach	
(D) TOPOLOGIE: linear	
(ii) MOLEKÜLTYPE: DNA	
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 74:	
GGGAGGACGA TGCGGCCCGG GGTGGGTGTG GGGTAGTGTAC TTATATTTAC AGCCTCAGAC GACTCGCCCG A	50 71
(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 75:	
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:	
(A) LÄNGE: 71 Basenpaare	
(B) TYP: Nucleinsäure	
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach	
(D) TOPOLOGIE: linear	
(ii) MOLEKÜLTYPE: DNA	
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 75:	
GGGAGGACGA TGCGGCCAGG GTCGGTGTGG GGTGGTGTAC TTTTCCTGT CCTTCCAGAC GACTCGCCCG A	50 71
(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 76:	
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:	
(A) LÄNGE: 71 Basenpaare	
(B) TYP: Nucleinsäure	
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach	
(D) TOPOLOGIE: linear	
(ii) MOLEKÜLTYPE: DNA	
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 76:	
GGGAGGACGA TGCGGCCAGG GTCGGTATGG GGTAGTGTAC TTTTTAATGA TCTTCCAGAC GACTCGCCCG A	50 71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 77:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 72 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 77:

GGGAGGACGA TGCAGCCCGG GGGAGAGCGG TGGGTAGTGT TCTATAGTAT
TCGTGTCAGA CGACTCGCCC GA

50

72

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 78:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 78:

GGGAGGACGA TGCAGCCAGG GGGGGTATGT TTTTAATACT ACTTACTTAC
GTCTTCAGAC GACTCGCCCG A

50

71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 79:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 72 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 79:

GGGAGGACGA TGCAGCCAGG GAGGGTATGG GGGTGGTGTT TCTAGTTTG
CGCGTCAGA CGACTCGCCC GA

50

72

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 80:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 72 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 80:

GGGAGGACGA TGCAGCCAGG GTGGGCATGG GGGTGGTGTG GATTAATTCT
TCGTCCCAGA CGACTCGCCC GA

50

72

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 81:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 81:

GGGAGGACGA TGCAGCCAGG GTCGGTGTGG GGTGGTGTTC TTATTTACTC
GTGCCAGAC GACTCGCCCG A

50

71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 82:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 82:

GGGAGGGACGA TGCGGGGGGC GGCTTGGAAAG AGGTTGCCGG TTGGAGTATT	50
CGAGCCAGAC GACTCGCCCC A	71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 83:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 67 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 83:

GGGAGGGACGA TGCGGCCAGG TGTGGGTGG TTTGGGTTTT CTTTCGT CGC	50
CCAGACGACT CGCCCCGA	67

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 84:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 70 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 84:

GGGAGGGACGA TGCGGCCAGG GTGGGTATGG GGGTTTAATT AATTCTCGT	50
CCCACAGACG ACTCGCCCCGA	70

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 85:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 85:

GGGAGGGACGA TGCGGGGGGC GGCTTGGAAAG AGGTTGCCGG TTGGAGTATT	50
CGAGCCAGAC GACTCGCCCC A	71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 86:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 72 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 86:

GGGAGGGACGA TGCGGCCCGG GGTGGGTGTG GGGTGGTGTG AATTAATTCT	50
TCGTCCCAGA CGACTCGCCC GA	72

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 87:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare

- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 87:

GGGAGGACGA TCGGGCCCGG GGTGGGTGTG GGGTGGTGTA TTATATTGCG GCCCTCAGAC GACTCGCCCG A	50 71
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 88:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 70 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 88:

GGGAGGACGA TCGGGCCAGG GTCGGTGTGG GTGGGTACT TTTTCCTGTC CTTCCAGACG ACTCGCCGA	50 70
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 89:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 89:

GGGAGGACGA TGCGGGGGGC GGCTTGAAG AGGTTGCCGG TTGGAGTATT CGAGCCAGAC GACTCGCCCG A	50 71
--	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 90:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 86 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 90:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAc TNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NACTTGAGCA-AAATCACCTG CAGGGG	50 86
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 91:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: N an den Positionen 1-3 ist Biotin
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 91:

NNNCCCCTGC AGGTGATTG-GCTCAAGT	28
-------------------------------	----

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 92:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 49 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 92:

CCGAAGCTTA ATACGACTCA CTATAGGGAT CCGCCTGATT AGCGATACT

49

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 93:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 84 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 93:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TAGGCTTGAC AAAGGGCACC ATGGCTTAGT

50

GGTCCTAGTA CTTGAGCAAA ATCACCTGCA GGGG

84

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 94:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 85 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 94:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TCAGGGCACT GCAAGCAATT GTGGTCCCAA

50

TGGGCTGAGT ACTTGAGCAA AATCACCTGC AGGGG

85

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 95:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 86 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 95:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TCCAGGGAGT CATGGTCATT GTTTACAGTC

50

GTGGAGTAGG TACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG

86

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 96:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 85 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 96:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TAGGTGATCC CTGCAAAGGC AGGATAACGT

50

CCTGAGEATC ACTTGAGCAA AATCACCTGC AGGGG

85

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 97:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 83 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 97:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAAC TATGTGATCC CTGCAGAGGG AGGANACGTC TGAGCATCAC TTGAGCAAAA TCACCTGCAG GGG	50 83
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 98:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 86 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 98:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAAC TCACGTGATC CCATAAGGGC TGCGCAAAAT AGCAGAGCAT CACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG	50 86
--	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 99:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 86 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 99:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAAC TGGTGGACTA GAGGGCAGCA AACGATCCTT GGTAGCGTC CACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG	50 86
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 100:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 85 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 100:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAAC TGGTGCAGCG AGGCTTACAC AAACGTACAC GTTTCCCCGC ACTTGAGCAA AATCACCTGC AGGGG	50 85
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 101:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 86 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 101:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAAC TTGTCGGAGC AGGGCGTAC GAAAAACTTA CAGTTCCCCC GACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG	50 86
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 102:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 86 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 102:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAAC TAGTGGAAACA GGGCACGGAG AGTCAAACTT	50
TGGTTTCCCC CACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG	86

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 103:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 86 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 103:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAAC TGTGGGTAGG GATCGGTGGA TGCGCTCGTCA	50
CTTCTAGTCC CACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG	86

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 104:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 86 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 104:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAAC TGGGCGCCCT AAACAAAGGG TGGTCACCTC	50
TAGTCCCAGG AACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG	86

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 105:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 87 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 105:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAAC TTCCGGGCTC GGGATTCTGTG GTCACTTTCA	50
GTCCCGGATA TAACTTGAGC AAAATCACCT GCAGGGG	87

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 106:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 84 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 106:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAAC TATGGGAGGG CGCGTTCTTC GTGGTTACTT	50
TTAGTCCCAGA CTTGAGCAAA ATCACCTGCA GGGG	84

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 107:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 84 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 107:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAAC TACGGGAGGG CACGTTCTTC GTGGTTACTT	50
TTAGTCCCAGA CTTGAGCAAA ATCACCTGCA GGGG	84

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 108:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 86 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 108:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAAC TGCTCGTAGG GGGCGATTCTTTCGCCGTTA CTTCCAGTCC TACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG	50 86
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 109:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 86 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 109:

ATCCGCCTGA TTAGCGATACTGAGGCATGT TAACATGAGC ATCGTCTCAC GATCCTCAGC CACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG	50 86
--	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 110:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 86 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 110:

ATCCGCCTGA TTAGCGATACTCCACAGGCT ACAGGCACGTA GAGCATCAC ATGATCCTGT GACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG	50 86
--	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 111:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 86 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 111:

ATCCGCCTGA TTAGCGATACTGCGGGCATG GCACATGAGC ATCTCTGATC CCGCAATCCT CACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG	50 86
--	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 112:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 86 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 112:

ATCCGCCTGA TTAGCGATACTACCGGGCTA CTTCGTAGAG CATCTCTGAT CCCGGTGCTC GACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG	50 86
--	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 113:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 86 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLTYPE: DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 113:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TAAAGGGCGA ACGTAGGTG AGGCATCCAT TGGATCCCTT CACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG	50 86
--	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 114:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 86 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 114:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TACGGGCCT GTCACTGTGG CACTAGCAAT AGTCCCGTCG CACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG	50 86
--	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 115:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 85 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 115:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TGGGCAGACC TTCTGGACGA GCATCACCTA TGTGATCCCG ACTTGAGCAA AAATCACCTGC AGGGG	50 85
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 116:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 86 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 116:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TAGAGGGAA GTAGGCTGCC TGACTCGAGA GAGTCCTCCC GACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG	50 86
--	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 117:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 86 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 117:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TAGGGGTGCC AAACACATAA TCCTCGCGGA TTCCCATCGC TACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG	50 86
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 118:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 83 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 118:

ATCCGCCTGA TTAGCGATA C TG GGGGGGCA ATGGCGGTAC CTCTGGTCCC	50
CTAAATACAC TTGAGCAAAA TCACCTGCAG GGG	83

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 119:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 85 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 119:

ATCCGCCTGA TTAGCGATA C TG GGGCTCAA AGTCCTGCTA CCCGCAGCAC	50
ATCTGTGGTC ACTTGAGCAA AATCACCTGC AGGGG	85

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 120:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 86 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 120:

ATCCGCCTGA TTAGCGATA C TTTGGGCGTG AATGTCACAG GGTACCTCCG	50
GTCCCAAAGA GACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG	86

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 121:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 85 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 121:

ATCCGCCTGA TTAGCGATA C TTCCGCGCAA GTCCCTGGTA AAGGGCAGCC	50
CTAACTGGTC ACTTGAGCAA AATCACCTGC AGGGG	85

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 122:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 86 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 122:

ATCCGCCTGA TTAGCGATA C TCAAGTTCCC CACAAGACTG GGGCTGTTCA	50
AACCGCTAGT AACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG	86

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 123:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 86 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 123:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TCAAGTAGGG CGCGACACAC GTCCGGGCAC CTAAGGTCCC AACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG	50 86
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 124:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 86 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 124:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TAAAGTCGTG CAGGGTCCCC TGGAAGCATC TCCGATCCA GACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG	50 86
--	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 125:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 96 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLTYP: RNA
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 125:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AANNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNN NNUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC	50 96
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 126:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLTYP: RNA
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 126:

TAATACGACT CACTATAGGG AGACAAGAAT AACGCTCAA	39
--	----

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 127:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLTYP: RNA
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 127:

GCCGTGGTG AGCCTCTGT CGAA	24
--------------------------	----

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 128:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 93 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLTYP: RNA

- (ix) MERKMALE:
 (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 128:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACGGUGGCA UUUCUUCACU UCCUUCUCGC 50
 UUUCUCGCGU UGGGCNCGAU UCGACAGGAG GCUCACAACA GGC 93

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 129:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 91 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 129:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACCAACCUU CUGUCGGCGU UGCUUUUUGG 50
 ACGGCACUCA GGCUCCAUUC GACAGGAGGC UCACAACAGG C 91

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 130:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 95 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 130:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAUCGAUCGG UUGUGUGCCG GACAGCCUA 50
 ACCAGGGCUG-GGAAEGAGGC CUUCGACAGG AGGCUCACAA CAGGC 95

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 131:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 92 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 131:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACUGAGUAG GGGAGGAAGU UGAAUCAGUU 50
 GUGGCGCCUC UCAUUCGUU CGACAGGAGG CUCACAACAG GC 92

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 132:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 95 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 132:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACAGCACUU UCGCUUUUCA UCAUUUUUUC 50
 UUUCACUGU UGGGCGCGGA AUUCGACAGG AGGCUCACAA CAGGC 95

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 133:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 96 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 133:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAUCAGUGCU GGCGUCAUGU CUCGAUGGG	50
AUUUUUCUUC AGCACUUUGC CAUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC	96

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 134:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 96 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 134:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAUCUACUUU CCAUUUCUCU UUUCUUCUCA	50
CGAGCGGGUU UCCAGUGAAC CAUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC	96

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 135:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 94 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 135:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACGAUAGUG ACUACGAUGA CGAAGGCCGC	50
GGGUUGGAUG CCCGCAUUGA UUCGACAGGA GGCTCACAAC AGGC	94

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 136:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 93 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 136:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAGUCGAUAC UGGCGACUUG CUCCAUUGGC	50
CGAUUAACGA UUCGGUCAGU UCGACAGGAG GCUCACAACA GGC	93

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 137:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 95 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 137:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAGUGCAAAC UUAACCCGGG AACCGCGCGU UUCGAUCGAC UUUCCUUUCC AUUCGACAGG AGGCUCACAA CAGGC	50 95
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 138:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 96 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 138:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAAUUCGCG UUCCGAUAAA UCCUGUGCUC GGAAAUCGGU AGCCAUAGUG CAUUCGACAG GAGGCUCACAA ACAGGC	50 96
--	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 139:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 94 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 139:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACGAACGAG GAGGGAGUGG CAAGGGAUUGG UUGGAUAGGC UCUACGCUCA UUCGACAGGA GGCUCACAAAC AGGC	50 94
--	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 140:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 94 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 140:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAGCGAAACU GGCGACUUGC UCCAUUGGCC GAUAAUACGA UUCGGUUCAU UUCGACAGGA GGCUCACAAAC AGGC	50 94
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 141:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 95 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 141:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACGAACGAG GAGGGAGUGG CAAGGGAUUGG UUGGAUAGGC UCUACGCUCA AUUCGACAGG AGGCUCACAA CAGGC	50 95
--	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 142:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 94 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 142:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACGAGAAGU GACUACGAUG ACGAAGGCCG	50
CGGGUUGAAU CCCUCAUUGA UUCGACAGGA GGCUCACAAAC AGGC	94

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 143:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 95 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 143:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAAAGCAACG AGACCUGACG CCUGAUGUGA	50
CUGUGCUUGC ACCCGAUUCU GUUCGACAGG AGGCUCACAA CAGGC	95

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 144:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 96 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 144:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAGUGAUUCU CAUUCUCAAU GCUUUCUCAC	50
AACUUUUUCC ACUUCAGCGU GAUUCGACAG GAGGCUCACAA ACAGGC	96

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 145:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 94 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 145:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAAAGCAACG AGACUCGACG CCUGAUGUGA	50
CUGUGCUUGC ACCCGAUUCU UUCGACAGGA GGCUCACAAAC AGGC	94

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 146:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 96 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 146:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAUCGAUCGG UUGUGUGCCG GACAGCUUUG	50
ACCAUGAGCU GGGACCGAGG CCUUCGACAG GAGGCUCACCA ACAGGC	96

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 147:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 96 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 147:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AANGACGNLU GGACCUGACU AAUCGACUGA	50
UCAAAGAUCC CGCCCAGAUG GGUUCGACAG GAGGCUCACCA ACAGGC	96

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 148:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 94 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 148:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACACTUGCGA CUUGCAGAAG CCUUGUGUGG	50
CGGUACCCCC UUUGGCCUCG UUCGACAGGA GGCUCACAAAC AGGC	94

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 149:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 94 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 149:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAGGUGGCAU UUCUUCAUUU UCCUUCUCGC	50
UUUCUCCGCC GUUGGGCGCG UUCGACAGGA GGCUCACAAAC AGGC	94

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 150:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 96 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 150: . . .

GGGAGACAAG AAUAACGCUC ACCUGAGUA GGGGGGAAAG UUGAAUCAGU UGUGGCGCUC UACUCAUUCG CCUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC	50 96
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 151:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 94 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 151:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAGUCGAAAC UGGCGACUUG CUCCAUUGGC CGAUUAACG AUUCGGGUCA UUCGACAGGA GGCUCACAAAC AGGC	50 94
--	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 152:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 94 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 152:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAGCGAUACU GGCACUUGC UCCAUUGGCC GAUUAACGA UUCGGCUCAG UUCGACAGGA GGCUCACAAAC AGGC	50 94
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 153:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 96 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 153:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACAGUGGGG CACAGGACCG AGAGUCCCUC CGCAAUAGC CGCUACCCCA CCUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC	50 96
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 154:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 98 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 154:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACACAGCCU NANAGGGGG AAGUJGAAUC AGUUGUGGCG CUCUACUCAU UCGCUUCGAC AGGAGGCUCU CAACAGGC	50 98
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 155:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 94 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 155:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAANGGGNUA UGGUGACUUG CUCCAUUGGC	50
CGAUUAACG AUUCGGUCAG UUCGACAGGA GGCUCACAAC AGGC	94

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 156:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 96 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 156:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC ACCUGCGUA GGGNGGGAAG UUGAAUCAGU	50
UGUGGCGCUC UACUCAUUCG CCUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC	96

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 157:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 94 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 157:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACGAACGAG GAGGGAGUGG CAAGGGAUUG	50
UUGGAUAGGC UCUACGCUCA UUCGACAGGA GGCUCACAAC AGGC	94

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 158:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 97 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 158:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAGUGCAAAC UUAACCCGGG AACCGCGCGU	50
UUCGAUUCGC UUUCCNUAUU CCAUUCGACA GGAGGCUCAC AACAGGC	97

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 159:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 93 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 159:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACGAACGAG GAGGGAGUGG CAAGGGACGG	50
UNNAUAGGCU CUACGCUCAU UCGACAGGAG GCUCACAACA GGC	93

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 160:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 93 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 160:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAUCGGUGUG GCUCAGAAC UGACACGCGU	50
GAGCUUCGCA CACAUUCGU UCGACAGGAG GCUCACAACA GGC	93

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 161:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 95 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 161:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAUAUCGCUU UUCAUCAAUU CCACUUUUUC	50
ACUCUNAAC UUGGGCGUGC AUUCGACAGG AGGCUCACAA CAGGC	95

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 162:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 96 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 162:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAGUGCAAAC UUAACCCGGG AACCGCGCGU	50
UUCGAUCCUG CAUCCUUUUU CCUUCGACAG GAGGCUCACAA ACAGGC	96

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 163:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 93 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 163:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAUCGNUCGG UUGUGUGCCG GCAGCUUUGU	50
CCAGCGUUGG GCCGAGGCCU UCGACAGGAG GCUCACAACA GGC	93

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 164:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 95 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 164:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAAGUACCCA UCUCAUCUUU UCCUUUCCUU	50
UCUUCAAGGC ACAUUGAGGG UUUCGACAGG AGGCUCACAA CAGGC	95

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 165:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 97 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 165:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACCUUGAGUA GGGGGGGAAG UUGAACCAAGU	50
UGUGGCNGCC UACUCAUUCN CCAUUCGACA GGAGGCUCAC AACAGGC	97

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 166:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 94 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 166:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACCNCCUN CUGUCGGCGC UUGUCUUUUU	50
GGACGGCAA CCCAGGGCUC UUUCGACAGGA GGCUCACAA ACAGC	94

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 167:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 96 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 167:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACCAACCUN CUGUCGGCGC UUGUCUUUUU	50
GGACGAGCAA CUCAAGGCUC GUUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC	96

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 168:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 93 Basenpaare

- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: RNA
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 168:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACCAAGCGCA GAUCCGGGC UGAAGUGACU GCCGGCAAAG GCCGCUCCAU UCGACAGGAG GCUCACAACA GGC	50 93
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 169:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 96 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: RNA
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 169:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAUUCGGUA ACAACUUUUC AUUUUCACUU UUCAUCCAAC CAGUGAGCAG CAUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC	50 96
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 170:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 96 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: RNA
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-F-modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 170:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAUAUCGUU UCAUCAAAU CCACUCCUUC ACUUCUJUAA CUUGGGCGUG CAUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC	50 96
--	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 171:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: N an den Positionen 1 und 23 basenpaaren zueinander und können 1-4 Basenpaare lang sein.
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: N an den Positionen 5 und 10 kann jedes beliebige Basenpaar sein.
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: N an den Positionen 6 und 9 kann jedes beliebige Basenpaar sein.
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: N an den Positionen 7 und 8 kann jedes beliebige Basenpaar sein.
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 171:

NGGCNNNNNN GRKYAYYRRT CCN

23

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 172:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: DNA
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Nucleotid 38 ist ein T mit umgekehrter Orientierung
(3'-3'-gebunden)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 172:

TGGGAGGGCG CGTTCTTCGT GGTTACTTTT AGTCCCGT

38

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 173:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 40 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: DNA
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Nucleotid 40 ist ein T mit umgekehrter Orientierung
(3'-3'-gebunden)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 173:

CACAGGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCTGTGT

40

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 174:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 45 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: DNA
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Nucleotid 45 ist ein T mit umgekehrter Orientierung
(3'-3'-gebunden)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 174:

TACTCAGGGC ACTGCAAGCA ATTGTGGTCC CAATGGGCTG AGTAT

45

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 175:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: DNA
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: C an den Positionen 8, 11, 25 und 26 ist 2'-O-Methyl-2'-desoxycytidin.
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: G an den Positionen 9, 10, 17, 19 und 35 ist 2'-O-Methyl-2'-desoxyguanosin.
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: A an den Positionen 12, 24 und 27 ist 2'-O-Methyl-2'-desoxyadenosin.
- (ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: U an Position 34 ist 2'-O-Methyl-2'-desoxyuridin.

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: U an den Positionen 6 und 22 ist 2'-Fluor-2'-desoxyuridin.

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: C an den Positionen 23, 32 und 33 ist 2'-Fluor-2'-desoxycytidin.

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Nucleotid 36 ist ein T mit umgekehrter Orientierung (3'-3'-gebunden).

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 175:

CAGGUACGG CACGTAGAGC AUCACCATGA TCCUGT

36

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 176:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 32 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: C an Position 8 ist 2'-O-Methyl-2'-desoxycytidin.

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: G an den Positionen 9, 17 und 31 ist 2'-O-Methyl-2'-desoxyguanosin.

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: A an Position 22 ist 2'-O-Methyl-2'-desoxyadenin.

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: U an Position 30 ist 2'-O-Methyl-2'-desoxyuridin.

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: U an den Positionen 6 und 20 ist 2'-Fluor-2'-desoxyuridin.

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: C an den Positionen 21, 28 und 29 ist 2'-Fluor-2'-desoxycytidin.

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: N an den Positionen 10 und 23 ist ein Pentyethylen-glykolphosphoramidit-Spacer.

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Nucleotid 32 ist ein T mit umgekehrter Orientierung (3'-3'-gebunden).

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 176:

CAGGUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT

32

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 177:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 39 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Nucleotid 39 ist ein T mit umgekehrter Orientierung (3'-3'-gebunden)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 177:

CAGTCCGTGG TAGGGCAGGT TGGGGTGACT TCGTGGAAT

39

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 178:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: DNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: T an den Positionen 13, 14, 16 und 17 ist mit IdU substituiert.

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 178:

TGGGAGGGCG CGTTCTTCGT GGTTACTTTT AGTCCCG

37

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 179:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: DNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: T an Position 20 ist mit IdU substituiert.

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 179:

TGGGAGGGCG CGTTCTTCGT GGTTACTTTT AGTCCCG

37

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 180:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: DNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: T an Position 23 ist mit IdU substituiert.

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 180:

TGGGAGGGCG CGTTCTTCGT GGTTACTTTT AGTCCCG

37

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 181:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: DNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: T an Position 24 ist mit IdU substituiert.

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 181:

TGGGAGGGCG CGTTCTTCGT GGTTACTTTT AGTCCCG

37

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 182:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: DNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: T an Position 27 ist mit IdU substituiert.

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 182:

TGGGAGGGCG CGTTCTTCGT GGTTACTTTT AGTCCCG

37

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 183:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: DNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: T an den Positionen 28-30 ist mit IdU substituiert.

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 183:

TGGGAGGGCG CGTTCTTCGT GGTTACTTTT AGTCCCG

37

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 184:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: DNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: T an Position 33 ist mit IdU substituiert.

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 184:

TGGGAGGGCG CGTTCTTCGT GGTTACTTTT AGTCCCG

37

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 185:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: Peptid

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Xaa an Position 5 ist eine modifizierte Aminosäure,
die nicht identifiziert werden konnte.

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 185:

Lys Lys Pro Ile Xaa Lys Lys

5

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 186:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 186:

GGGAGGGACGA UGCAGNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN
NNNNNCAGAC GACUCGCCG A

50

71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 187:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 187:

TAATACGACT CACTATAGGG AGGACGATGC GG**32**

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 188:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 16 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 188:

TCGGGCGAGT CGTCTG**16**

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 189:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 71 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 189:

**GGGAGGACGA UGCAGGAAGG GACGAUAAAG AGGAAUCGAA CAACAAGUGG
CUUCCAGAC GACUCCCGCG A****50****71**

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 190:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 71 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 190:

**GGGAGGACGA UGCAGGCAGG AAGGUCCGAA GACCGCGAA AGGAACGAGA
UUGCCCAGAC GACUCCCGCG A****50****71**

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 191:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 70 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 191:

**GGGAGGACGA UGCAGGUGGU GAAGAGGUAC CGGAAUUGCU AAAGAUACCA
GCCAGACG ACUCCCGCG A****50****70**

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 192:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 192:

GGGAGGACGA UGCAGGGCAGG GAGCAAUGAA CUCAAGUCAA GCCGGUGCAC 50
GUGGGCAGAC GACUCGCCCG A 71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 193:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 193:

GGGAGGACGA UGCAGGUAGCU GCUGUCAUGC AAGACACUAG AAGAUUAAGA 50
UGGGGCAGAC GACUCGCCCG A 71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 194:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 74 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 194:

GGGAGGACGA UGCAGGGGCC GGAAUJUGAAC CGACGACUUC GGGUUAUGAG 50
CCCGACGUCA GACGACTUCGC CCGA 74

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 195:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 195:

GGGAGGACGA UGCAGGUCCAG GGAAUJUGAAGU GUCGGGUAG GAACAUAAAG 50
GCGGCCAGAC GACUCGCCCG A 71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 196:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 70 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 196:

GGGAGGACGA UCGGAAAGUU CUAACAAGUU AGUGGAAGGU UCCACUUGAA	50
UGUACAGACG ACUCGCCCGA	70

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 197:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 44 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 197:

GGGAGGACGA UCGGAAUGGA GCUGAAAUC A GACGACUCGC CCGA	44
---	----

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 198:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 71 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 198:

GGGAGGACGA UGCAGGGUGGG AAGAUGAGCC GGUCGGCAGU AAUGUGACAC	50
UGCAGGCAGAC GACUCGCCCG A ·	71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 199:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 70 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 199:

GGGAGGACGA UGCAGGGAGGG AAUGAGGAAA CAACUAGCAG AUAAACCGAGC	50
UGGCCAGACG ACUCGCCCGA	70

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 200:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 44 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 200:

GGGAGGACGA UCGGAAUGGA GCUGAAAUC A GACGACUCGC CCGA	44
---	----

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 201:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 201:

GGGAGGACGA UGC GG UUGCU CUACAA AUGAC GCGGUGACUC CGCAGUUCUU	50
GGACACAGAC GACUCGCCCG A	71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 202:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 202:

GGGAGGACGA UGC GGGAGGG GAGAAGAAUG CAGGAAACAG CGAAAUGCUG	50
GUGGCCAGAC GACUCGCCCG A	71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 203:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 203:

GGGAGGACGA UGC GGGCGGG AAGAGCUAAU GGAAGUGGAA UCAGUCACAG	50
UGC GGCAGAC GACUCGCCCG A	71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 204:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 57 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 204:

GGGAGGACGA UGC GGGCUUA GGGAAAUGGU UCUGAGGUGG UCAGACGACU	50
CGCCCGA	57

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 205:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 205:

GGGAGGACGA UGCAGGAAGG AACAGGAUA AGACAAGUCG AACAAAGCCG	50
AGGUGCAGAC GACUCGCCCG A	71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 206:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 44 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 206:

GGGAGGACGA UGCAGGAUGGA GCUGAAAUCG GACGACUCGC CCGA	44
---	----

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 207:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 71 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 207:

GGGAGGACGA UGCAGGGAGA CGUAGACGGG AACAUAGAAC GAACAUCAAC	50
GCAGGCCAGAC GACUCGCCCG A	71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 208:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 69 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 208:

GGGAGGACGA UGCAGGAAGU GGAAUAGAAC GUCAGAAAUG UAAGCGUGAG	50
GUGCAGACGA CUCGCCCGA	69

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 209:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 71 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 209:

GGGAGGACGA UGCAGGAAGG GUAGGAAGGU CAAGAGGAAA CAGCGCUUCG 50
 GGGUGCAGAC GACUCGCCCG A 71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 210:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 70 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 210:

GGGAGGACGA UGCAGGAAGG GUAGGAAGGU CAAGAGGAAA CAGCGCUUCG 50
 UGGCCAGACG ACUCGCCCGA 70

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 211:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 70 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 211:

GGGAGGACGA UGCAGGAAC CAACAGAGCC CCCUGGUGGU GGGGAAGGA 50
 UUCUCAGACG ACUCGCCCGA 70

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 212:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 70 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 212:

GGGAGGACGA UGCAGACACA CAAGUGAAGG UCAGACGCGA AUUACGUGGG 50
 UGGGCAGACG ACUCGCCCGA 70

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 213:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 82 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 213:

GGGAGGACGA UGCAGACACA CAAGUGAAGG UCAGACGCGA AUUACGUGGG 50
 ACUGGUAACG GCUGGCCAGA CGACUCGCC GA 82

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 214:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 71 Basenpaare

- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 214:

GGGAGGACGA UGCAGGGUGG GUGGUUACCU GUAAUUUAU	UGAUUCUGGC	50
UUUAGCAGAC GACUCGCCCG A		71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 215:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 53 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 215:

GGGAGGACGA UGCAGGCCCU UAGCUCAGUG GUUAGAGCAG ACGACUCGCC	50
CGA	53

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 216:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 74 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 216:

GGGAGGACGA UGCAGGUUACG UGGAAUAGGG UUAAACAGCU GGAAUAACG	50
UAGGUGGCCA GACGACTUCGC CGCA	74

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 217:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 217:

GGGAGGACGA UGCAGGGUAGG GAGUAGGACA GACAUAAACAG UGCAACCAUC	50
GUGGCCAGAC GACUCGCCCG A	71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 218:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 73 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 218:

GGGAGGACGA UGCAGAAACG GCGUGGCAAAG UAGUAGGGGG UAGGAUGUAC CAUGGGUCAG ACGACUCGCC CGA	50 73
--	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 219:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 219:

GGGAGGACGA UGCAGGGAGGG GAAAAUAGAGA CCGACAGAUU GACGGAAGUA CUGGGCAGAC GACUCGCCCG A	50 71
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 220:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 220:

GGGAGGACGA UGCAGGGCAUU CGUAAUACC UUGUUUUAUU CCUUUUCUAG CUGGCCAGAC GACUCGCCCG A	50 71
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 221:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 221:

GGGAGGACGA UGCAGGAUCGU AAUCGCCACU ACUACUUUCC GAACCCGCAC CUGGCCAGAC GACUCGCCCG A	50 71
--	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 222:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 70 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 222:

GGGAGGACGA UGCAGGGGUCC CGAGUCACGC UGUCCUGAUA ACCUUCUCUG UGCCCGAGACG ACUCGCCCGA	50 70
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 223:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 72 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 223:

GGGAGGGACGA UGCAGGAUCC UUUGUGGGCU CUUGUUGACC CCCUCGUUGU CCCCCCCCAGA CGACUCGCCCG GA	50 72
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 224:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 224:

GGGAGGGACGA UGCAGGCAGGU ACUCUUCGCC AGCUCCUCCA AGCGCGACCU GUGCCCAGAC GACUCGCCCG A	50 71
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 225:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 72 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 225:

GGGAGGGACGA UGCAGGUUCG AAUAGGGCCA UUUCUCACUA GCUAUCCUAC CCUGCCCCAGA CGACUCGCCCG GA	50 72
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 226:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 226:

GGGAGGGACGA UGCAGAUAAU GGCUAGAACU AGCUCGCAUC UUGGGUGUCCG GUGCCCAGAC GACUCGCCCG A	50 71
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 227:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: RNA
- (ix) MERKMAL:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 227:

GGGAGGCACGA UGGGGGACCA GAUGGCGGAU UUUUCAGCAA UCCUCCCCCG 50
CUGCCCAGAC GACUCGCCCG A 71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 228:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 70 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: RNA
 - (ix) MERKMAL:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 228:
- GGGAGGCACGA UGC GGUGAUG GCG ACCAGUC AAACCGGUGC UUUUACUCCC 50
CCGCCAGACG ACUCGCCCGA 70

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 229:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 72 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: RNA
- (ix) MERKMAL:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 229:

GGGAGGCACGA UGGGGAAUU AACAGGGCCA GAAUUCUCAU CUNNCUUCCC 50
GUGACCCAGA CGACUCGCCCG A 72

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 230:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 70 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: RNA
- (ix) MERKMAL:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 230:

GGGAGGCACGA UGC GGACCU UAG ACCUGUC CUCCAAGCGU GAGUUGCUGU 50
GGGCCAGACG ACUCGCCCGA 70

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 231:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 70 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: RNA
- (ix) MERKMAL:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 231:

GGGACGGACGA UGGGGUGGUUC UCCCCAUUCU AAACUUUCUC CAUCGUACU 500
GGGCCAGACG ACUCGCCCGA 700

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 232:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: RNA
 - (ix) MERKMAL:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 232:

GGGAGGGCGA UGGGGUCAUG GUGUCUUUCC ACAGCUCUUC CCAUGAUCGC
CCCCCCCCAC GACUUCGCCCG A 50
71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 233:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

 - (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 233:

(X) SEQUENZBESCHREIBUNG: GELAND 111
 GGGAGGACGA UGGGGAAUU CCCAGCGCUU GACUGAUACA AACNUUCCCG 50
 UGGCCCCAGAC GACUUCGGGG A 71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 234:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

 - (A) LÄNGE: 70 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 234:

GGGAGGAGCA UGGCGCAANN NNNNNCUCUC UCCUGGCGUU CCGCAACCCG 50
CCCCCGGAGC ACTGCCCCCGA 70

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 235:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 71 Basenpaare
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:
(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 235:

(x) SEQUENCE LISTING
 GGGAGGACGA UGGCGGAGUAU UCCAGGCCUGG AUUCAUAGUC AGUGCUCUCC 50
 GCGGGCGGAGA GAGUCCCCCGG A 71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ-ID NR. 236:

- #### (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: RNA
- (ix) MERKMAL:
- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 236:

GGGAGGGACGA UGC GGGUCCUA GCAGCGAUUC AUCCCCGUUC UCUCAGCGUU
GCC CCCCAGAC GACUCGCCCG A

50
71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 237:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: RNA
- (ix) MERKMAL:
- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 237:

GGGAGGGACGA UGC GGGCCUGA AGUACAGGCU CUAAACUCCA AGCGCGACCG
UCCGCCAGAC GACUCGCCCG A

50
71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 238:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 68 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: RNA
- (ix) MERKMAL:
- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 238:

GGGAGGGACGA UGC GGGCCUA CCACUUUUUC CCUCUACUGU UAUCCUGUCC
CCCAGACGAC UCGCCCGA

50
68

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 239:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 70 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: RNA
- (ix) MERKMAL:
- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 239:

GGGAGGGACGA UGC GGUGGGUC UCCCUAGAUC UACAGCACUU CCAUCGCAUU
GGGCCAGACG ACUCGCCCGA

50
70

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 240:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 69 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 240:

GGGAGGGACGA UGCAGGUCAAG CUAACAGUC UGGCAAUGGC CAUUAUGGCG	50
CCCCAGACGA CUCGCCCGA	69

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 241:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 72 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 241:

GGGAGGGACGA UGCAGGCAGUC UGGAAUCUUA UUGGAAUUUA GUCCUCAACU	50
GUGCCCGAGAC GACUCGCCCG A	72

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 242:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 71 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 242:

GGGAGGGACGA UGCAGGGAUUC UUUCGGCAAG UGAAAAAAUAU CCUUGCUUCC	50
CGAGCCAGAC GACUCGCCCG A	71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 243:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 71 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 243:

GGGAGGGACGA UGCAGGGACU UCAACUAAGU CCUCAUUUGC CUCGCUCUC	50
GUGCCCGAGAC GACUCGCCCG A	71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 244:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 74 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 244:

GGGAGGGACGA UGCAGAACGG AGAUGUCCCC UCAAMAUUUA CCGUCUCCGU	50
UUGCGCCCCA GACGACUCGC CCGA	74

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 245:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 70 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 245:

GGGAGGGACGA UGCAGCGAAA UUAGCUUCUU AUGACUCACG UUUCCUUGCC GCCCCAGACG ACUCGCCCGA	50 70
--	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 246:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 246:

GGGAGGGACGA UGCAGGGCCCG AUCUACUGCA UUACCGAAAC GAUUUCCCCA CUGUGCAGAC GACUCGCCCG A	50 71
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 247:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 247:

GGGAGGGACGA UGCAGGGACU GAUUUUUCCU UGNCAUGUA AUUUCCUGGC UGCCCCAGAC GACUCGCCCG A	50 71
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 248:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 248:

GGGAGGGACGA UGCAGGGACU UUGACAGGCA UUGAUUUUCGA CCUGUUCCCC GUGGCCAGAC GACUCGCCCG A	50 71
---	----------

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 249:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure

- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 249:

GGGAGGGACGA UGCAGCGACA CAAUAGCCUU UGAUCCCAUG AUGGCUCGCC	50
GUGCCCAGAC GACUCGCCCG A	71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 250:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 250:

GGGAGGGACGA UGCAGGUGUAG UUUCCUGUA UGCCAUUCUU UCCCAUGCCG	50
CACGCCAGAC GACUCGCCCG A	71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 251:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 251:

GGGAGGGACGA UGCAGGUCGAG UGUUCUCCUU CGGUAACUAU UNNNNAUUUC	50
GUGCCCAGAC GACUCGCCCG A	71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 252:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 252:

GGGAGGGACGA UGCAGGUCGU AUUCAUCUCC UUGUUCUGUU UCGUUGCACC	50
UGGCCAGAC GACUCGCCCG A	71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 253:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 253:
 GGGAGGACGA UGCAGGGACU UUGACAGGCA UUGAUUUCGA CGUGUCCCC
 GUGGCCAGAC GACUCGCCCG A 50
 71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 254:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 69 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 254:

GGGAGGACGA UGCAGGUGAUC AAUCGGCGCU UUACUCUUGC GCUCACCGUG
 CCCCAGACGA CUCGCCCGA 50
 69

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 255:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 255:

GGGAGGACGA UGCAGGACUC UCCCUAGGUU UCAUCUCUGC AGCAUUCCCG
 GGUNCCAGAC GACUCGCCCG A 50
 71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 256:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 256:

GGGAGGACGA UGCAGGAUCA AAGCACUCAU UCCCGUGCUC GCUCUCAUUGG
 UCCCCCAGAC GACUCGCCCG A 50
 71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 257:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 74 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 257:

GGGAGGACGA UGCAGGAAGAU CUCCCAACUG CUGUGGCUAU UAAUUCUCUC
 CGCGUCCCCA GACGACUCGC CCGA 50
 74

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 258:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 70 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 258:

GGGAGGACGA UGCAGGUCCGU CAUAACGGCC AUAAACUGCG AAUACUCCU	50
GGCCAGACG ACUCGCCCGA	70

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 259:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 73 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 259:

GGGAGGACGA UGCAGGGGACA AWYAGCGGUG UCUUUUCAUU UNKAUCCUCC	50
GACRUCAGAC ACGACUCGCC CGA	73

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 260:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 260:

GGGAGGACGA UGCAGGUGACU AUCUGGCUCG AUCCAAUCAC CCGAGCCCAC	50
CGCGCCAGAC GACUCGCCCG A	71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 261:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 261:

GGGAGGACGA UGCAGGGAACU AAUAGGCCGUG AUUAACCAAU GCAGGCCUCC	50
UGCGCCAGAC GACUCGCCCG A	71

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 262:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 73 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 262:

GGGAGGGACGA UGCUGGACCA UGGAAUUUUC UACGGGCCG AUCCUGGCCAG
 CCGUGUGCAG ACGACUCGCC CGA

50

73

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 263:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 13 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 263:

13

GGAANYAANR CRR

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 264:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 9 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 264:

9

GGAANYTGA

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 265:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 76 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Cs sind 2'-NH₂-2-Cytosin

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Us sind 2'NH₂-2-Uracil

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 265:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAGUAGACUA AUGUGUGGAA GACAGCGGGU
 GGUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC

50

76

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 266:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 26 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Cs sind 2'-NH₂-2-Cytosin

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Us sind 2'NH₂-2-Uracil

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 266:

GGUGUGUGGA AGACAGCGGG UGGUUC**26**

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 267:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Us und Cs sind 2'-Desoxy-2'-aminouridin- und 2'-Desoxy-2'-aminocytidinreste

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: A an den Positionen 14 und 17 ist 2'-Desoxy-2'-O-methyladenosin

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: G an den Positionen 5, 6, 22, 23, 24, 26 und 27 ist 2'-Desoxy-2'-O-methylguanosin

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: T an den Positionen 1-4 und 31-35 ist 2'-Desoxythymidin

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 267:

TTTGGGUGUG UGGAAGACAG CGGGUGGUUC TTTTT**35**

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 268:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 268:

GGGAGGSGSG GUYUCYYRRY UYYYSYS**27**

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 269:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 269:

RGGRRGRAYY RSBRSYYYYY BSYBSY**26**

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 270:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 270:

GGGAAGGAAY AARCRRGACC C

21

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 271:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 11 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-NH₂-modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 271:

GGAAYGAYGA Y

11

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 272:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 49 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 272:

GGGAGGGACGA UGC GGUGGGUC UCCCAAUUCU AAACUUUCUC CAUCGUAUC

49

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 273:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 47 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 273:

GGGAGGGACGA UGC GGUGGGUC UCCCAAUUCU AAACUUUCUC CAUCGUA

47

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 274:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 45 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 274:

GGGAGGGACUG CGGUGGGUCUC CCAAUUCUAA ACUUUCUCCA UCGUA

45

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 275:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 45 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 275:

GGGAGGGACGA UGC GGUGGUC UCCCCUAAAC UUU CUCCAUC GUAUC

45

- (2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 276:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 45 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 276:

GGGAGGGACGA UGC GGUGGUC UCC CAAUUCU AAUCUCCAUC GUAUC

45

- (2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 277:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 45 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 277:

GGGAGGGACGA UGC GGUGGUC UCC CAAUUCU AAACUCCAUC GUAUC

45

- (2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 278:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 42 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 278:

GGGAGGGACGA UGC GGUGGUC UCC CAAUUA CUCCAUC GUA UC

42

- (2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 279:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 47 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 279:

GAGGACGAUG CGGUGGGUCUC CCAAUUCUAA ACUUUCUCCA UCGUAUC

47

- (2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 280:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 42 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 280:

GGGAGGACGA UGGUGGGUC UCCCAAUUUU CUCUACGU AUC

42

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 281:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 41 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 281:

GGGAGGACGA UGGUGGGUC UCCCAAUUCU ACCAUACGU AU C

41

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 282:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 44 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 282:

GGAGGACGAU GCGGUGGGUCU CCCAAUUCUA UUCUCCAUCA CG UAUC

44

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 283:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 43 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 283:

GGAGGACGAU GCGGUGGGUCU CCAAUUCUAU UCUCUCCAUCA CGU AUC

43

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 284:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 43 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 284:

GAGGACGAUG CGGUGGGUCU CCAAUUCUAU UCUCUCCAUCA CGU AUC

43

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 285:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 41 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 285:

GAGGACGAUG CGGUGGGUCU AAUUCUAUUC UCCAUCGUAU C

41

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 286:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 44 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 286:

GGGAGGCGAU GCGGUGGGUCU CCCAAUUCUA UUCUCCAUCG UAUC

44

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 287:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 44 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 287:

GGGAGGACGA UGCGGUGGGUC UCCCAAUUCU ACUCCAUCG UAUC

44

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 288:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 43 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 288:

GGGAGGACGA UGCGGUGGGUC UCCCAAUUCU ACUCCAUCG AUC

43

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 289:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 42 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: RNA

(ix) MERKMAL:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 289:

GGGAGGACGA UGC GGUGGGUC UCCCAAUUCU AUCCAUCGUA UC

42

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 290:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 44 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 290:

GGGAGGACGA UGC GGUGGGUC UCCCAAUUCU UUCUCCAUCAU CG UAUC

44

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 291:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 43 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 291:

GGGAGGACGA UGC GGUGGGUC UCCCAAUUCU UCUC CAUCGU AUC

43

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 292:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 41 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 292:

GGGGACGAUG CGGUGGCCAA AAUUCUAUUC UCCAUCGUAU C

41

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 293:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: RNA

(ix) MERKMALE:

(D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 293:

GGGACGAUGC GGUGGCCAA UUCUAUUCUC CAUCGUUAUC

39

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 294:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach

- (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLTYP: RNA
 (ix) MERKMAL:
 (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 294:

GACGAUGCGG UGGCCCAAUU CUAUUCUCCA UCGUAUC

37

- (2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 295:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLTYP: RNA
 (ix) MERKMAL:
 (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 295:

GGACGAUGCG GUGGCCAAU UCUALUUCUCC AUCGUAUC

38

- (2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 296:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 34 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLTYP: RNA
 (ix) MERKMAL:
 (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 296:

GAUGCGGUGG CCCAAUUCUA UUCUCCAUCA UAUC

34

- (2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 297:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLTYP: RNA
 (ix) MERKMAL:
 (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 297:

GAUGCGGUGG UCUCCAAUU CUAUUCUCCA UCGUAUC

37

- (2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 298:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLTYP: RNA
 (ix) MERKMAL:
 (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 298:

GGUGGUUCUCC CAAUUCUAUU CUCCAUCAUC UA

32

- (2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 299:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 12 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
- (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 299:

GGGAGGACGA UG

12

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 300:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 42 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 300:

GGGAGGACGA UGC GGUGGUC UCCAAUUCU CUCAUCGUA UC

42

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 301:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 41 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 301:

GGGAGGACGA UGC GGUGUUCU CCCAAUUCUU CUCAUCGUAU C

41

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 302:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 41 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 302:

GGGAGGACGA UGC GGGGUUCU CCCAAUUCUU CUCCUCGUAU C

41

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 303:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYPE: RNA
- (ix) MERKMALE:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 303:

GGGAGGACGA UGC GGGUUCU CCAAUUCUUC UCUCGUAUC

39

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 304:

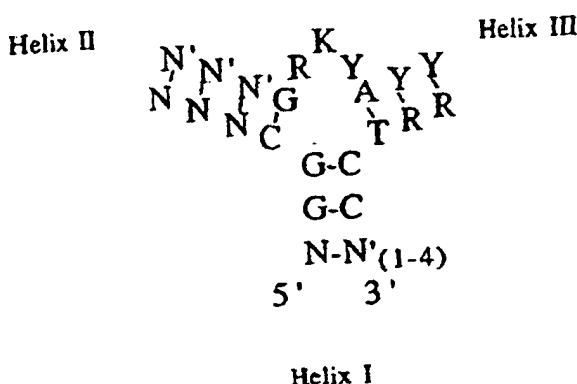
- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 43 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: RNA
- (ix) MERKMAL:
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Alle Pyrimidine sind 2'-Fluor- (2'-F-) modifiziert
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 304:

GGGAGGUACGA UGGCGGUGGUC UCCCAAUUCU UCUCCAUCGU AUC

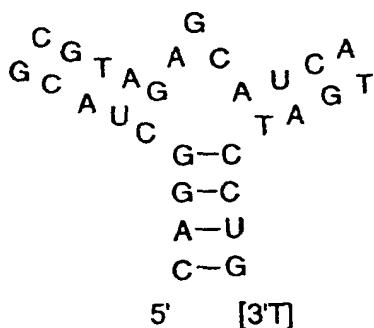
43

Patentansprüche

1. Nucleinsäureligand, der spezifisch an Blutplättchenaktivierungsfaktor (PDGF, "platelet-derived growth factor") bindet und ein Sekundärstrukturmotiv in Form einer Dreifachhelix-Verbindung mit einer Consensus-Sequenzstruktur gemäß A oder B aufweist, worin A



ist, worin N-N' ein beliebiges Basenpaar ist, R = A oder G ist, Y = C oder T ist und K = G oder T ist; und B



ist.

2. Nucleinsäureligand, der spezifisch an Blutplättchenaktivierungsfaktor (PDGF) bindet und die Sequenzen

- (i) $N_1G_2G_3C_4N_5N_6N_7$
- (ii) $N'_7N'_6N'_5G_4RKYA_8Y_9Y_{10}$
- (iii) $R_{10}R_9T_8C_3C_2N'_1$

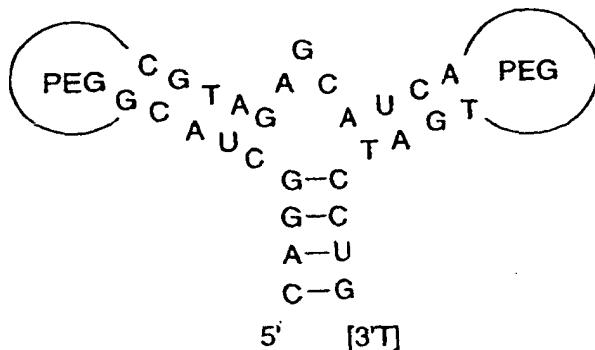
worin $N_1-N'_1$, $N_5-N'_5$, $N_6-N'_6$ und $N_7-N'_7$ jeweils ein beliebiges Basenpaar sind, R = A oder G ist, Y = C oder T ist, K = G oder T ist und G_2-C_2 , G_3-C_3 , C_4-G_4 , A_8-T_8 , Y_9-R_9 und $Y_{10}-R_{10}$ Basenpaare sind; oder

- (a) $C_1A_2G_3G_4C_5U_6A_7C_8G_9$
- (b) $C_{10}G_{11}T_{12}A_{13}G_{14}A_{15}G_{16}C_{17}A_{18}U_{19}C_{20}A_{21}$
- (c) $T_{22}G_{23}A_{24}T_{25}G_{26}C_{27}U_{28}G_{29}$

umfasst, worin C_1-G_{29} , A_2-U_{28} , G_3-C_{27} , G_4-C_{26} , C_5-G_{14} , U_6-A_{13} , A_7-T_{12} , C_8-G_{11} , G_9-C_{10} , $A_{18}-T_{25}$, $U_{19}-A_{24}$, $C_{20}-G_{23}$ und $A_{21}-T_{22}$ Basenpaare sind;

worin ein Sekundärstrukturmotiv in Form einer Dreifachhelix-Verbindung durch die Basenpaarung zwischen den Sequenzen (i), (ii) und (iii) oder (a), (b) und (c) gebildet ist.

3. Nucleinsäureligand nach einem der Ansprüche 1 oder 2, worin die Sequenz RKY AGC ist.
4. Nucleinsäureligand nach einem der Ansprüche 1 oder 2, worin die Sequenz RKY eine von GTC, GTT, GGC oder GGT ist.
5. Nucleinsäureligand nach Anspruch 1 oder Anspruch 3, worin die Dreifachhelix-Verbindung die Sequenzstruktur



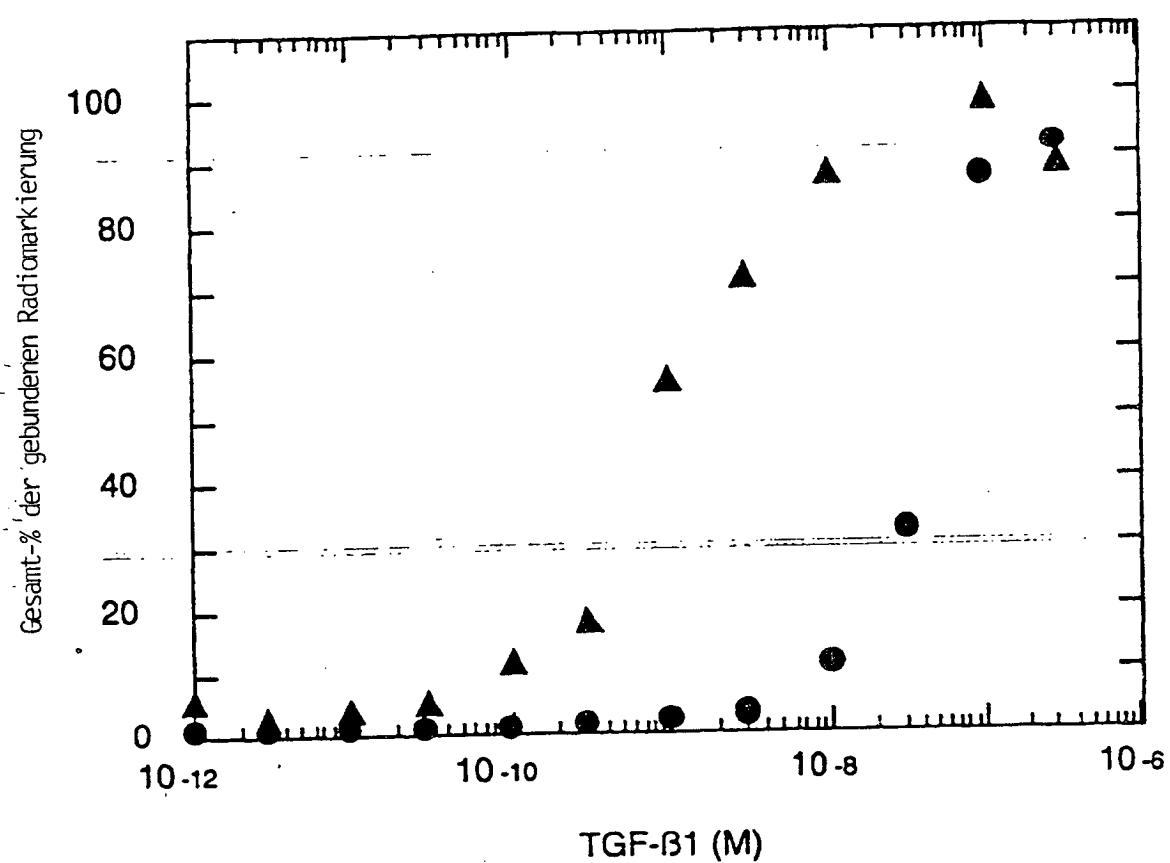
aufweist, worin PEG ein Pentaethylenglykol ist.

6. Nucleinsäureligand nach einem der Ansprüche 1 bis 5, worin der Ligand die Sequenz der Seq.-ID Nr. 175 oder eine Sequenz mit einem Primärsequenz-Homologiegrad mit Seq.-ID Nr. 175 von über 70 % aufweist.
7. Nucleinsäureligand nach einem der Ansprüche 1 bis 5, worin der Ligand die Sequenz der Seq.-ID Nr. 175 oder eine Sequenz mit einem Primärsequenz-Homologiegrad mit Seq.-ID Nr. 175 von über 80 % aufweist.
8. Nucleinsäureligand nach einem der Ansprüche 1 bis 5, worin der Ligand die Sequenz der Seq.-ID Nr. 176 oder eine Sequenz mit einem Primärsequenz-Homologiegrad mit Seq.-ID Nr. 176 von über 70 % aufweist.
9. Nucleinsäureligand nach einem der Ansprüche 1 bis 5, worin der Ligand die Sequenz der Seq.-ID Nr. 176 oder eine Sequenz mit einem Primärsequenz-Homologiegrad mit Seq.-ID Nr. 176 von über 80 % aufweist.
10. Nucleinsäureligand nach einem der Ansprüche 1 bis 4, worin der Ligand die Sequenz der Seq.-ID Nr. 171 oder eine Sequenz mit einem Primärsequenz-Homologiegrad mit Seq.-ID Nr. 171 von über 70 % aufweist.
11. Nucleinsäureligand nach einem der Ansprüche 1 bis 4, worin der Ligand die Sequenz der Seq.-ID Nr. 171 oder eine Sequenz mit einem Primärsequenz-Homologiegrad mit Seq.-ID Nr. 171 von über 80 % aufweist.
12. Nucleinsäureligand nach einem der Ansprüche 1 bis 5, worin der Ligand eine Bindungsaffinität für PDGF innerhalb einer oder zweier Größenordnungen der Bindungsaffinität für Seq.-ID Nr. 175 oder 176 aufweist.
13. Nucleinsäureligand nach Anspruch 1 oder 2, worin der Ligand die Sequenz der Seq.-ID Nr. 172, 173 oder 174 oder eine Sequenz mit einem Primärsequenz-Homologiegrad mit einer der Seq.-ID Nummern von über 70 % aufweist.
14. Nucleinsäureligand nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin der Ligand die Sequenz der Seq.-ID Nr. 172, 173 oder 174 oder eine Sequenz mit einem Primärsequenz-Homologiegrad mit einer der Seq.-ID-Nummern von über 80 % aufweist.
15. Nucleinsäureligand nach einem der vorangegangenen Ansprüche, der spezifisch an PDGF bindet und die Bindung von PDGF an einen PDGF-Rezeptor hemmt.
16. Nucleinsäureligand nach einem der vorangegangenen Ansprüche, der ein spezifischer Antagonist für PDGF-AB und/oder PDGF-BB ist.
17. Nucleinsäureligand nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin der Ligand modifizierte Nucleotide umfasst.

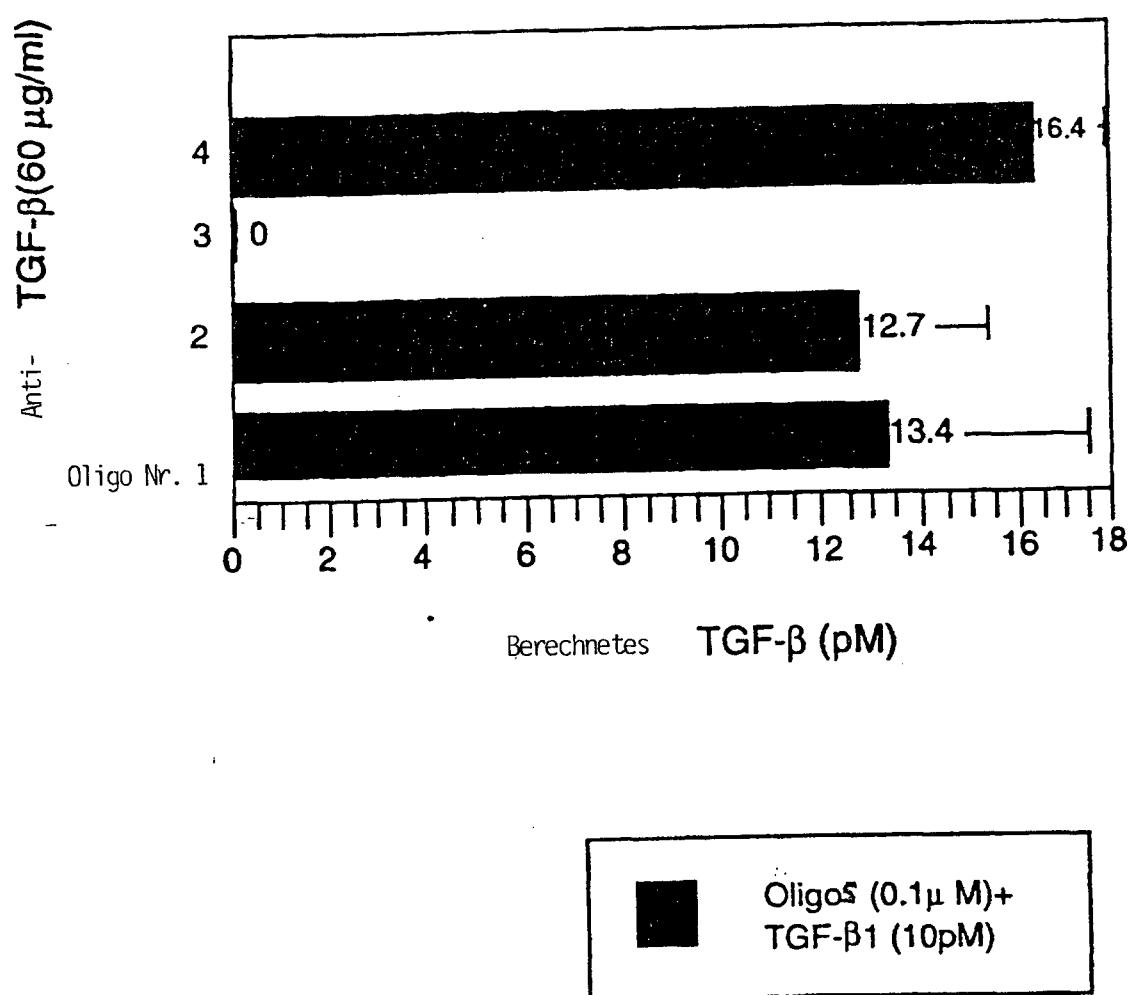
18. Nucleinsäureligand nach Anspruch 17, worin die Modifikation die In-vivo-Stabilität des Liganden erhöht oder die Zufuhr des Liganden steigert oder vermittelt und chemische Substitution an Zucker- und/oder Phosphat- und/oder Basenpositionen umfasst.
19. Nucleinsäureligand nach einem der vorangegangenen Ansprüche, der eine Desoxyribonucleinsäure ist.
20. Nucleinsäureligand nach einem der Ansprüche 1 bis 18, der eine Ribonucleinsäure ist.
21. Nucleinsäureligand nach einem der vorangegangenen Ansprüche, der einzelsträngig ist.
22. Nucleinsäureligand nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin der Ligand gereinigt und isoliert ist.
23. Nucleinsäureligand nach einem der vorangegangenen Ansprüche zur Verwendung in einer Therapie.
24. Verwendung eines Nucleinsäureliganden nach einem der vorangegangenen Ansprüche, der spezifisch an einen Blutplättchenaktivierungsfaktor (PDGF) bindet, bei der Herstellung eines Medikaments zur Verwendung bei der Behandlung einer durch PDGF vermittelten Erkrankung.
25. Verwendung nach Anspruch 24, worin die Erkrankung eine proliferative Erkrankung ist.
26. Verwendung nach Anspruch 25, worin die Erkrankung ein Tumor ist.
27. Verwendung oder Ligand nach einem der Ansprüche 1 bis 26, worin der PDGF ein PDGF-BB-Dimer ist.
28. Verwendung oder Ligand nach einem der Ansprüche 1 bis 26, worin der PDGF eine PDGF-AB-Heterodimer ist.
29. Verwendung oder Ligand nach einem der Ansprüche 1 bis 26, worin der PDGF ein PDGF-AA-Dimer ist.
30. Verwendung oder Ligand nach einem der Ansprüche 27 bis 29, worin der PDGF-Rezeptor das $\alpha\alpha$ -Homodimer ist.
31. Verwendung oder Ligand nach einem der Ansprüche 27 oder 28, worin der PDGF-Rezeptor das $\alpha\beta$ -Heterodimer ist.
32. Verwendung eines Liganden nach einem der Ansprüche 27 oder 28, worin der PDGF-Rezeptor das $\beta\beta$ -Homodimer ist.
33. Verwendung oder Ligand nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin der PDGF und der PDGF-Rezeptor menschlich sind.

Es folgen 17 Blatt Zeichnungen

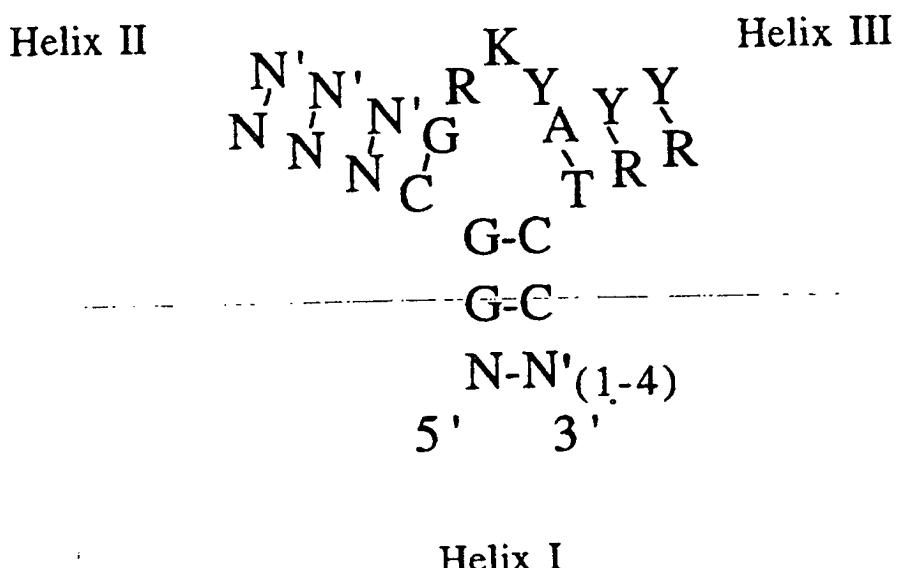
Anhängende Zeichnungen



FIGUR 1



FIGUR 2

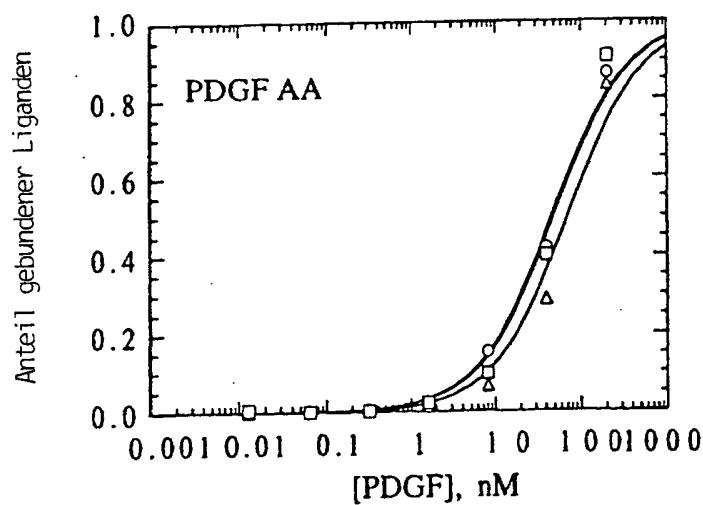


Seq.-ID Nr. 171

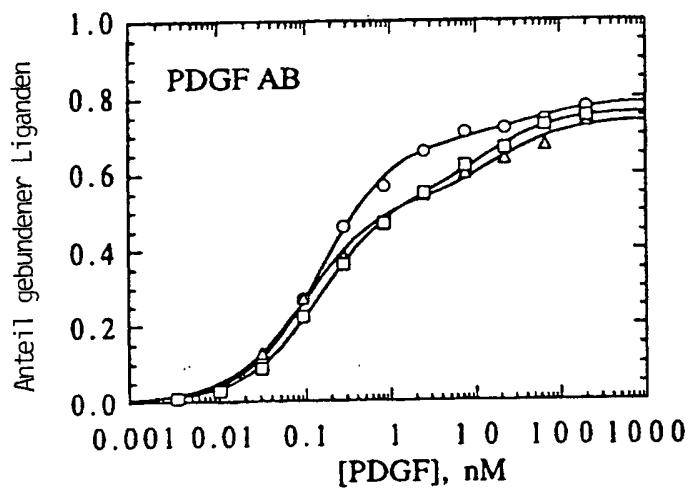
FIGUR 3

<p>36t</p> <p>$5' \text{C}^A \text{C}^G \text{G}^T \text{A}^G \text{A}^T \text{C}^A \text{C}^T \text{A}$</p> <p>$\text{G}^G \text{G}^C \text{A}^T \text{A}^G \text{C}^A \text{T}^G \text{G}^T \text{A}$</p> <p>G-C G-C A-T C-G A-T $5', \text{C-G}[3'T]$</p>
<p>20t</p> <p>$5' \text{C}^T \text{T}^G \text{G}^T \text{G}^C \text{G}^T \text{G}^C \text{G}^T \text{G}^T \text{A}^T$</p> <p>$\text{T}^T \text{G}^C \text{C}^T \text{G}^C \text{G}^T \text{G}^C \text{G}^T \text{G}^T \text{A}^T$</p> <p>G-C G-C $5', \text{TGGGA}^G \text{-CG}[3'T]$</p>
<p>Seq.-ID Nr. 172</p> <p>41t</p> <p>$5' \text{T}^A \text{T}^G \text{G}^T \text{C}^A \text{G}^T \text{C}^A \text{G}^T \text{G}^C \text{G}^T \text{G}^C \text{G}^T \text{G}^C \text{G}^T \text{A}^T$</p> <p>$[3'T] \text{A}^T \text{G}^C \text{T}^A \text{G}^T \text{C}^A \text{G}^T \text{C}^A \text{G}^T \text{G}^C \text{T}^G \text{G}^T \text{G}^C \text{T}^G \text{G}^T \text{A}^T$</p> <p>G-C G-C G-C T_A^A</p>
<p>Seq.-ID Nr. 173</p> <p>41t</p> <p>$5' \text{T}^A \text{T}^G \text{G}^T \text{C}^A \text{G}^T \text{C}^A \text{G}^T \text{G}^C \text{G}^T \text{G}^C \text{G}^T \text{G}^C \text{G}^T \text{A}^T$</p> <p>$[3'T] \text{A}^T \text{G}^C \text{T}^A \text{G}^T \text{C}^A \text{G}^T \text{C}^A \text{G}^T \text{G}^C \text{T}^G \text{G}^T \text{G}^C \text{T}^G \text{G}^T \text{A}^T$</p> <p>G-C G-C G-C T_A^A</p>
<p>Seq.-ID Nr. 174</p>

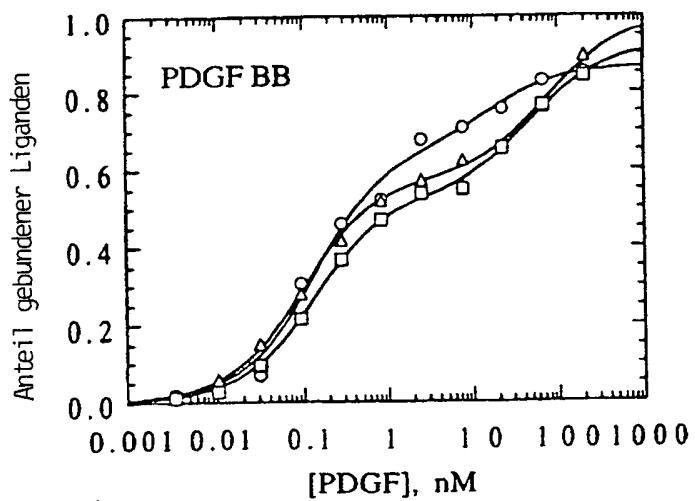
FIGUR 4



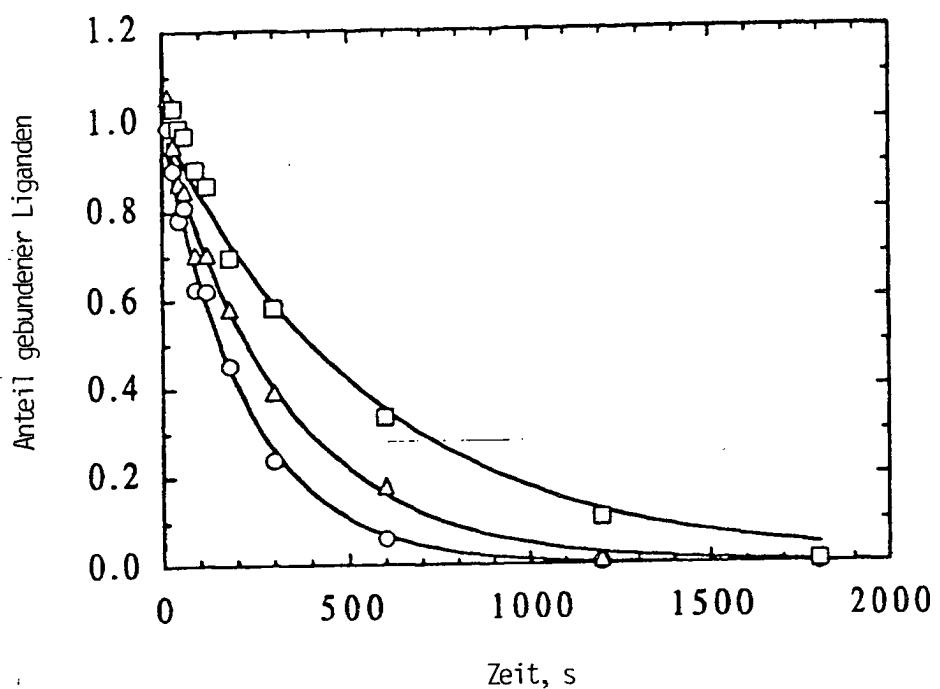
Figur 5A



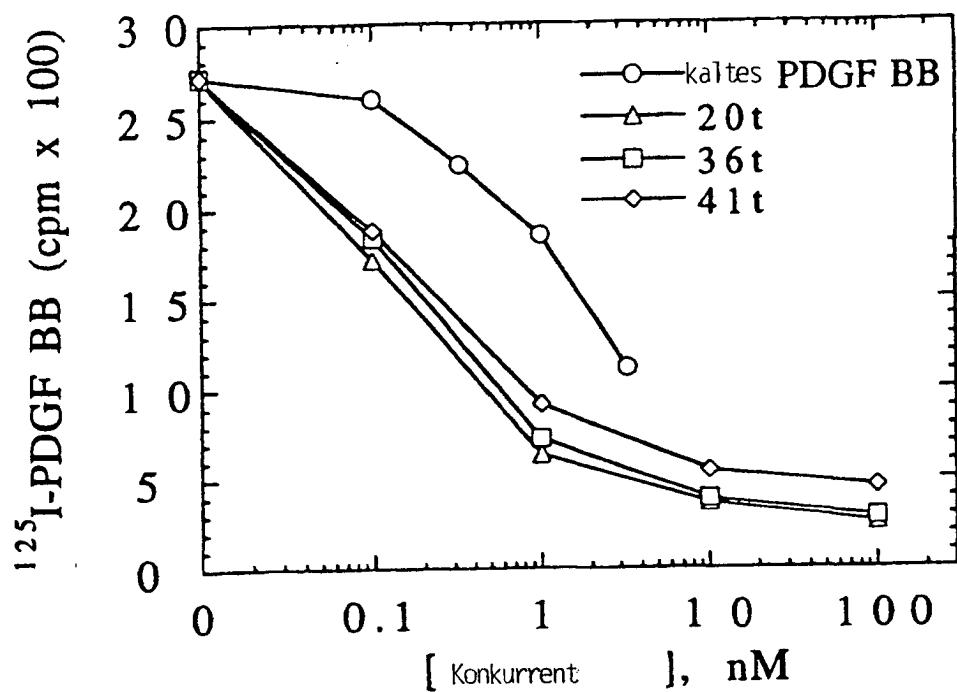
Figur 5B



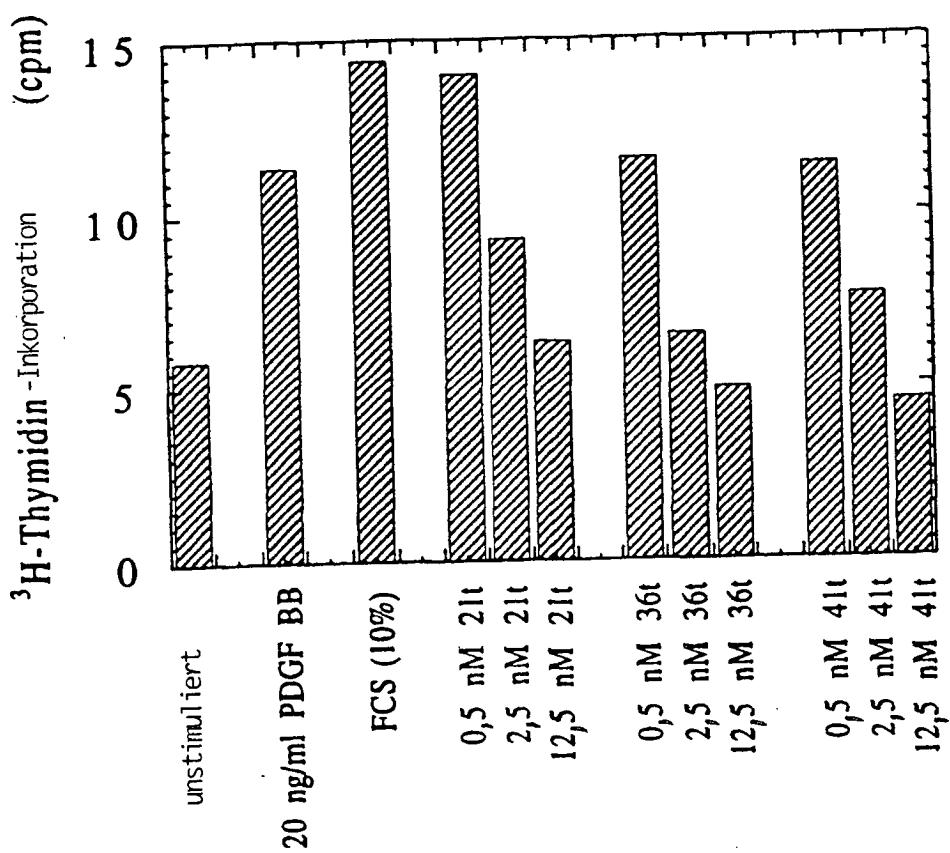
Figur 5C



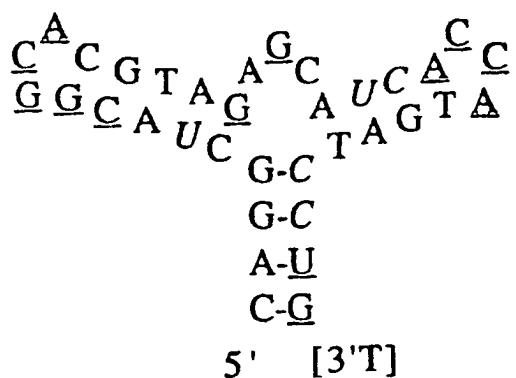
FIGUR 6



FIGUR 7

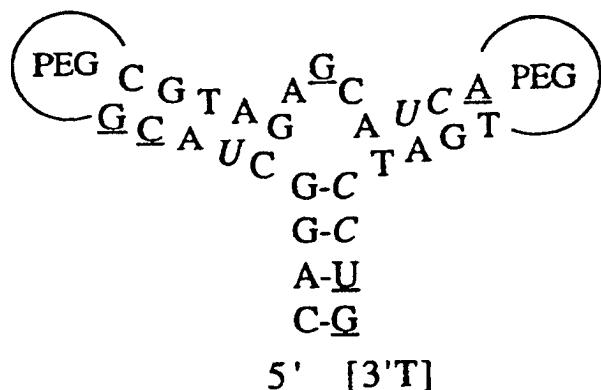


FIGUR 8



K_d=0.065 nM

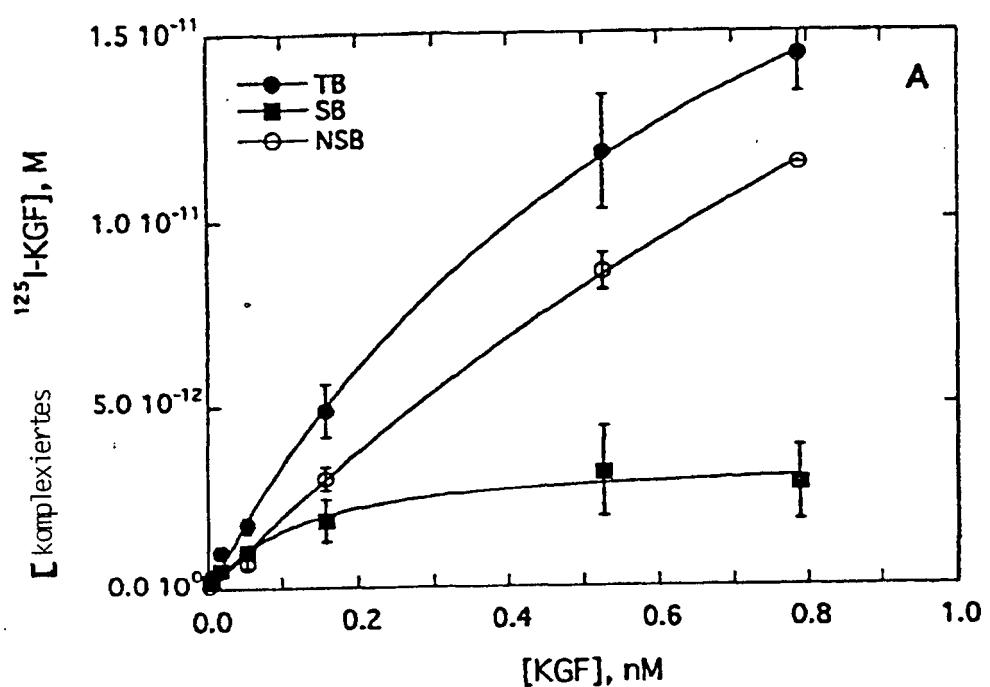
Seq.-ID Nr. 175



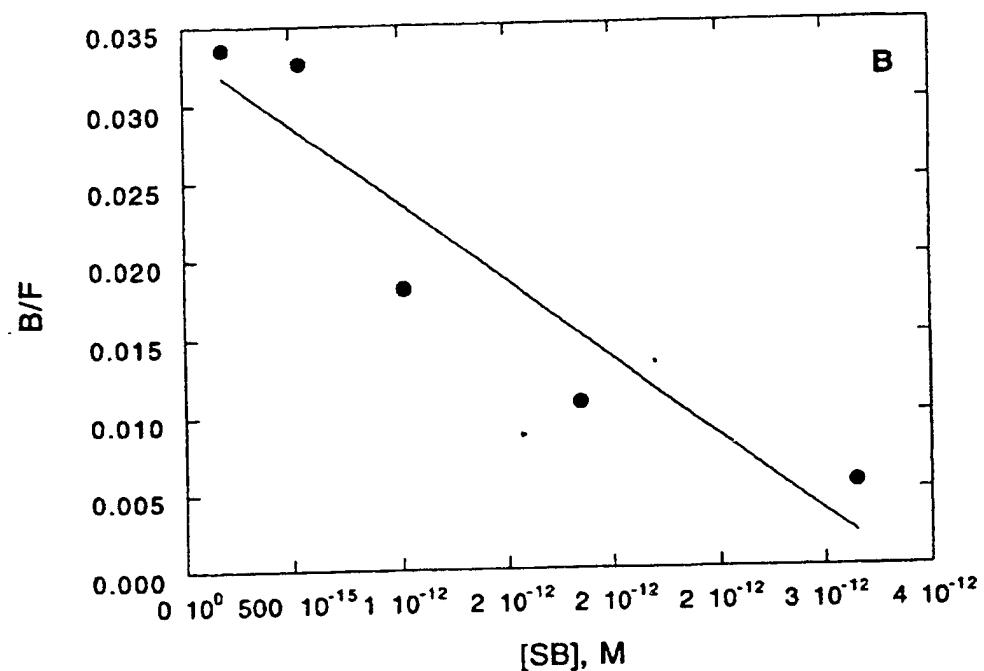
K_d=0.097 nM

Seq.-ID Nr. 176

FIGUR 9

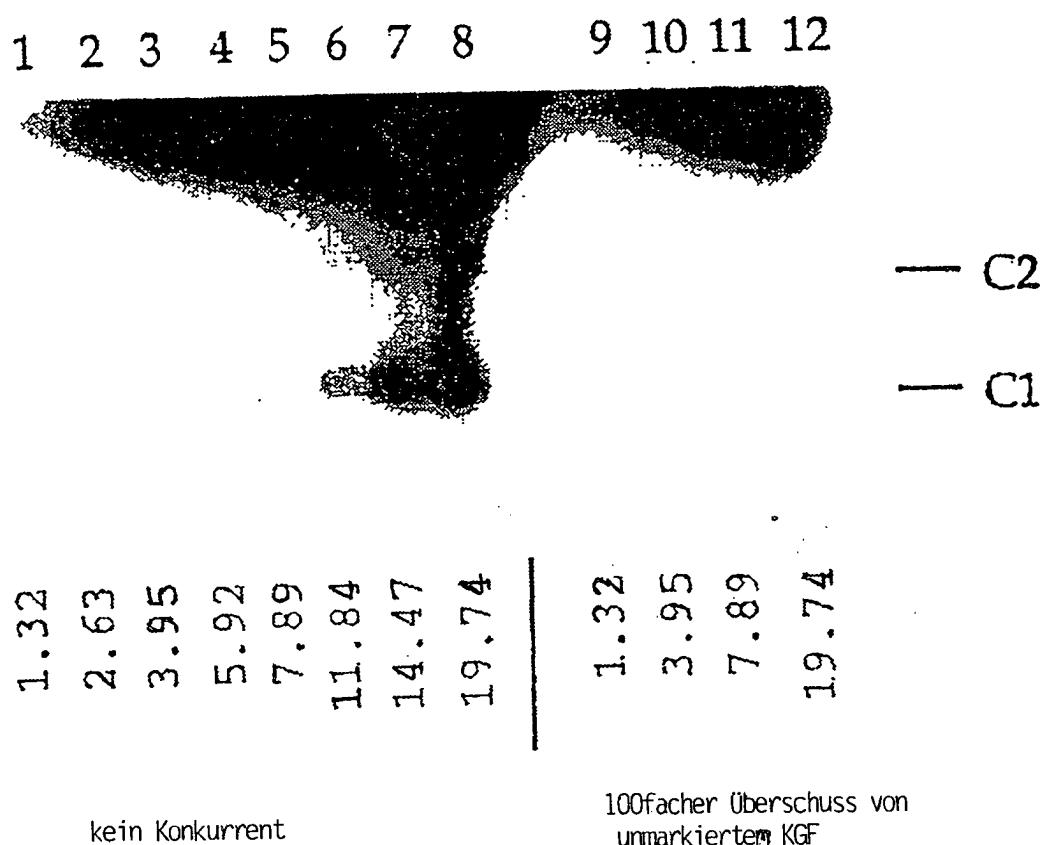


FIGUR 10A



FIGUR 10B

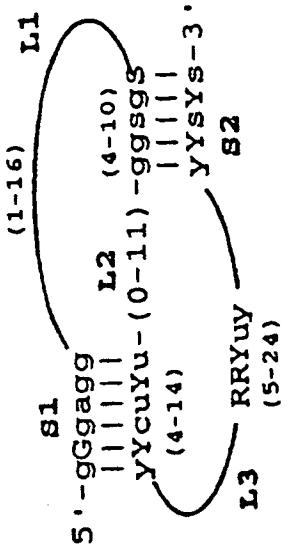
[¹²⁵I-KGF], nM



FIGUR 11

Klasse 1

Summenstruktur

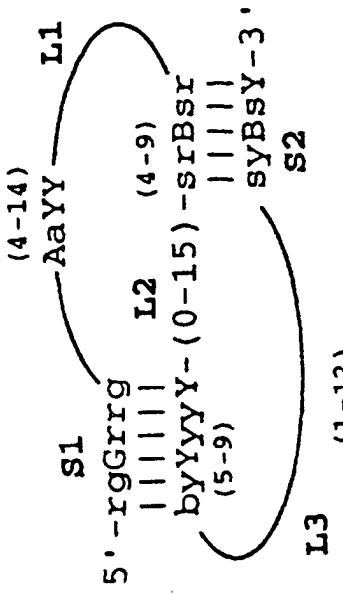


Klasse 2

Seq.-ID Nr.	Klon	K_d , nM	K_1 , nM
230	*11P	0.03	10.0
254	*50P	0.12	
247	18P	0.33	0.2
227	10P	0.47	10.0
226	9P	0.81	
256	53P	0.7	
253	49P	1.0	
250	43P	1.13	16.7
260	57P	1.2	
248	41P	1.44	
241	27P	1.52	
235	20P	2.05	
258	55P	2.52	
261	58P	2.52	
221	3P	4.47	
236	21P	ND	
242	28P	ND	
	Consensus	269	

CACCUAGACUCGUCCUCAAGGUGAGUUG	CUGUGGCCcaga
ggacgaucccg	UUACUCUGGCCUACC
cgaugccndGA	GCGGT
ggacca-cguug	GUGCCcaga
acgaugcggcacAGA	GGUGGCCcaga
AUAUUGGUAGA	UCGGGGA
gacgauccggAUAAA	ACUAGC
ggaccaudGC	ACACCUCA
ggaccaudG	UGAGACU
ggaccaudG	UGAGUGUAG
ggaccaudG	CCAUACCC
ggaccaudG	CAUAGAUUCCG
ggaggaccaua	UAUUAGGAA
ggaggaccaua	AUUAGGUCCUC
UUCGAGA	UUCGAGA
ggaccaua	UGCCUCCUCCcagacqacucgc
ggaccaua	UGGCCcaga
ggaccaua	UGGCCcaga
ggaccaua	GGCCGUGAUUAACCAAUCCAGCCUNIC
ggaccaua	CCCACUACUA
ggaccaua	CGACCGAUUAUCCC
ggaccaua	UUCGUU
ggaccaua	GGCGGCAAGUGAAAAAU
rgGrrg	YYYYb
	raBra

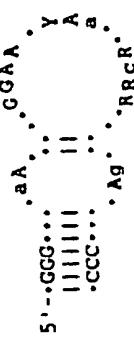
Summenstruktur



FIGUR 12B

Klasse 1

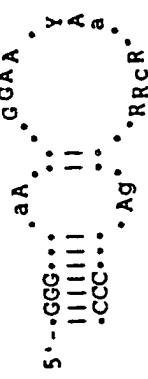
Summenstruktur



FIGUR 12C

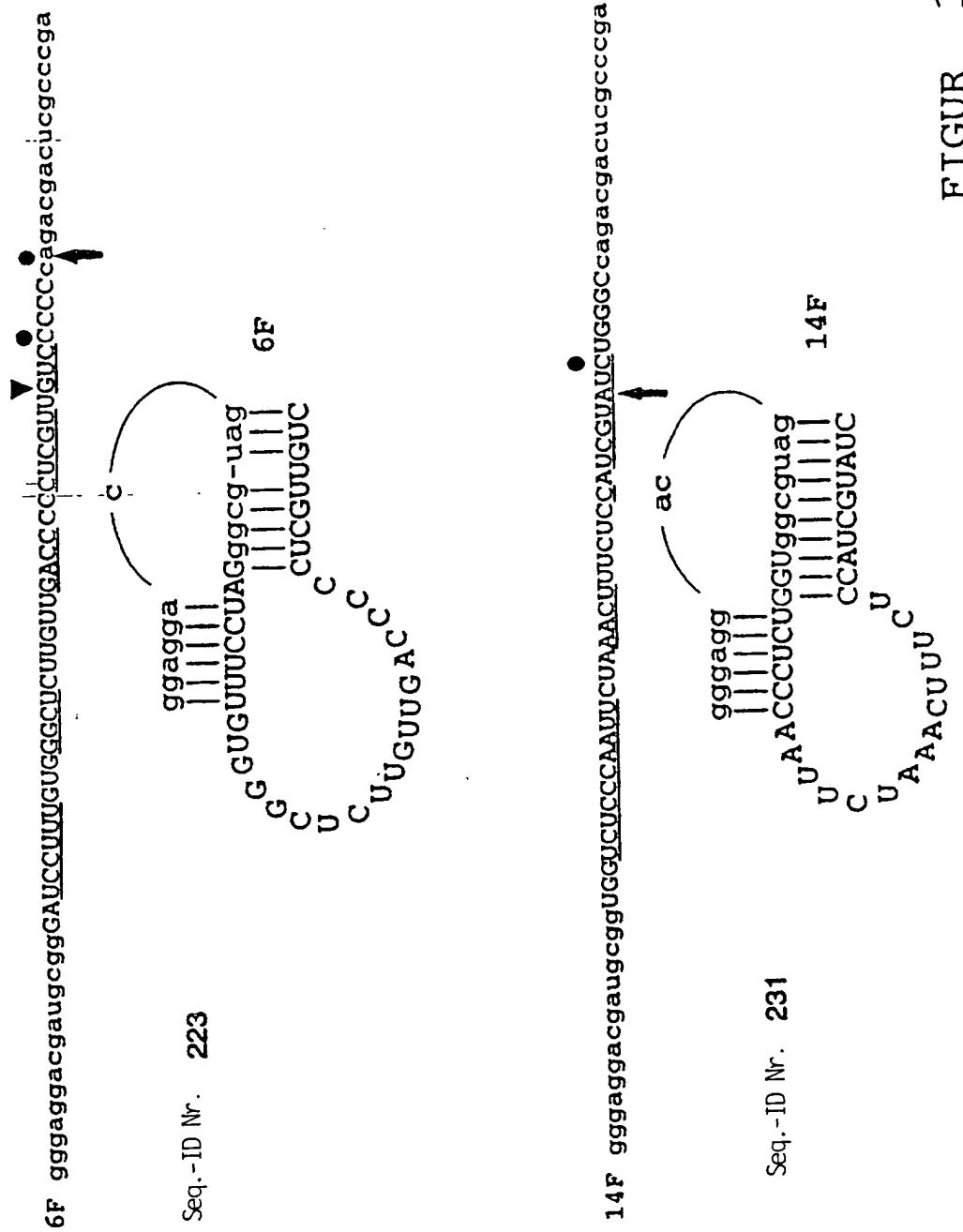
Klasse 2

Summenstruktur



149/150

FIGURE 12D



FIGUR 13