



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 29 292 T2 2005.06.02**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 894 129 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 29 292.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/03847**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 915 007.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/033991**

(86) PCT-Anmeldetag: **14.03.1997**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **18.09.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **03.02.1999**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **26.05.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.06.2005**

(51) Int Cl.7: **C12N 15/11**

**C12N 9/00, C12N 9/22, A61K 31/70,**

**C07H 21/00**

(30) Unionspriorität:

**615961 14.03.1996 US**

(73) Patentinhaber:

**Yale University, New Haven, Conn., US**

(74) Vertreter:

**Henkel, Feiler & Hänzler, 81675 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**WERNER, Martina, New York, US; MA, Michael,  
Madison, US; GEORGE, T., Shaji, New York, US**

(54) Bezeichnung: **KURZE EXTERNE FÜHRUNGSSEQUENZEN**

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

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

**Beschreibung**

## Hintergrund der Erfindung

**[0001]** Diese Anmeldung ist auf Verfahren und externe Leitsequenzzusammensetzungen, die zur zielgerichteten Spaltung von RNA mittels RNase P gestaltet sind, gerichtet.

**[0002]** Ribonukleinsäure(RNA)moleküle können nicht nur als Träger von genetischer Information, beispielsweise genomische retrovirale RNA- und Boten-RNA(mRNA)-Moleküle, und als für die Proteinsynthese essentielle Strukturen, beispielsweise transfer-RNA (tRNA) und ribosomale RNA(rRNR)-Moleküle, sondern auch als Enzyme, die Nukleinsäuremoleküle spezifisch spalten, dienen. Derartige katalytische RNA-Moleküle werden als Ribozyme bezeichnet.

**[0003]** Die Entdeckung von katalytischer RNA durch Drs. Altman und Cech, die 1989 den Nobelpreis erhielten, rief viel Interesse an kommerziellen Anwendungen, insbesondere auf therapeutischem Gebiet hervor (Altman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10898–10900 (1993); Symons, Annu. Rev. Biochem. 61: 641–671 (1992); Rossi et al., Antisense Res. Dev., 1: 285–288 (1991); Cech, Annu. Rev. Biochem. 59: 543–568 (1990)). Mehrere Klassen katalytischer RNA (Ribozyme) wurden beschrieben, die intronabgeleitete Ribozyme (WO 88/04300; siehe auch T. Cech, Annu. Rev. Biochem., 59: 543–568, (1990)), Hammerkopfribozyme (WO 89/05852 und EP 321021 von GeneShears), Axtkopfribozyme (WO 91/04319 und WO 91/04324 von Innovir) umfassen.

## RNase P

**[0004]** Eine weitere Klasse von Ribozymen umfasst den RNA-Bereich eines Enzyms, RNase P, das an der Prozessierung von transfer-RNA (t-RNA), einer üblichen Zellkomponente der Proteinsynthesemaschinerie, beteiligt ist. Bakterien-RNase P umfasst zwei Komponenten, ein Protein (C5) und eine RNA (M1). Sidney Altman und seine Mitarbeiter zeigten, dass die M1-RNA genau wie das vollständige Enzym funktionieren kann, wobei sie zeigten, dass in *Escherichia coli* die RNA im Wesentlichen die katalytische Komponente ist (Guerrier-Takada et al., Cell 35: 849–857 (1983)). Bei anschließenden Arbeiten entwickelten Dr. Altmann und Kollegen ein Verfahren zur Umwandlung von praktisch jeder RNA-Sequenz in ein Substrat für bakterielle RNase P unter Verwendung einer externen Leitsequenz (EGS), die am 5'-Terminus mindestens sieben Nukleotide, die zu den 3' zur Spaltungsstelle in der zu spaltenden RNA befindlichen Nukleotiden komplementär sind, und an deren 5'-Terminus die Nukleotide NCCA (N ist ein beliebiges Nukleotid) aufweist (WO 92/03566 von Yale, und Forster und Altman, Science 238: 407–409 (1990)).

**[0005]** Unter Verwendung ähnlicher Prinzipien wurde eine EGS/RNase P-dirigierte Spaltung von RNA zur Verwendung in eukaryotischen Systemen entwickelt, wobei die äußere Leitsequenz Strukturen bildet, die ähnlich den Stamm-und-Schleife-Strukturen von tRNA sind, und wobei die Substrat-RNA mit Enden der EGS unter Bildung von Strukturen, die ähnlich den Akzeptor- und D-Stämmen von tRNA sind, hybridisiert (Yuan et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 89: 8006–8010 (1992); WO 93/22434 von Yale). Es wurde anschließend gezeigt, dass EGS-Moleküle zur Verwendung mit eukaryotischer RNase P nur eine Struktur ähnlich zu T-Stamm-und-Schleife von tRNA bilden müssen, wobei erneut das Substrat RNA mit Enden der EGS unter Bildung von Strukturen, die ähnlich den Akzeptor- und D-Stämmen von tRNA sind, hybridisiert (WO 95/24489 von Yale). Diese EGS-Moleküle sind zur Förderung einer RNase P-vermittelten Spaltung von Target-RNA-Molekülen verwendbar. Sie sind insbesondere zur in-vivo-Verwendung verwendbar, da nur das relativ kleine EGS-Molekül verabreicht werden muss. Die katalytische RNase P ist in den Zellen des Tiers oder Patienten bereits vorhanden und aktiv. Yuan und Altman, EMBO J 14: 159–168 (1995) und Carrara et al., Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 92: 2627–2631 (1995) bestimmten später eine Minimalstruktur, die zur Spaltung eines Substrats durch RNase P notwendig ist.

**[0006]** Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Therapeutikums der Zielrichtung der Behandlung von Viruserkrankungen und Erkrankungen, an denen anomale Transkriptionsprodukte beteiligt sind, und von Verfahren zur Verwendung desselben.

**[0007]** Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von kurzen externen Leitsequenzen für RNase P, Vektoren, die derartige kurze externe Leitsequenzen codieren, und Verfahren zur Verwendung derselben.

**[0008]** Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung chemisch modifizierter kurzer

externer Leitsequenzen für RNase P mit erhöhter Beständigkeit gegenüber einem Nukleaseabbau.

**[0009]** Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von Verfahren zur Spaltung von Target-RNA-Molekülen, die durch kurze externe Leitsequenzen für RNase P gefördert wird.

**[0010]** Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von kurzen externen Leitsequenzen für RNase P, die speziell gegen Viren, wie Hepatitis, zielgerichtet sind, von Vektoren, die derartige kurze externe Leitsequenzen codieren und von Verfahren zur Verwendung derselben.

#### Zusammenfassung der Erfindung

**[0011]** Ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung stellt ein Oligonukleotidmolekül gemäß Anspruch 1 bereit.

**[0012]** Ein zweiter Aspekt der vorliegenden Erfindung stellt die Verwendung eines Oligonukleotids gemäß Anspruch 13 bereit.

**[0013]** Ein dritter Aspekt der vorliegenden Erfindung stellt einen gentechnisch hergestellten Expressionsvektor mit Codierung für ein Oligonukleotid gemäß Anspruch 22 bereit.

**[0014]** Ein vierter Aspekt der vorliegenden Erfindung stellt eine Zusammensetzung zur Förderung der Spaltung eines Hepatitis-B-RNA-Moleküls gemäß Anspruch 23 bereit.

**[0015]** Ein fünfter Aspekt der vorliegenden Erfindung stellt ein ex-vivo-Verfahren zur Spaltung eines Target-RNA-Moleküls gemäß Anspruch 25 bereit.

**[0016]** Ein sechster Aspekt der vorliegenden Erfindung stellt die Verwendung eines Oligonukleotidmoleküls gemäß Anspruch 28 bereit.

**[0017]** Ein siebter Aspekt der vorliegenden Erfindung stellt die ex-vivo-Verwendung eines Oligonukleotidmoleküls gemäß Anspruch 29 bereit.

**[0018]** Ein achter Aspekt der vorliegenden Erfindung stellt ein Verfahren zur Herstellung eines Oligonukleotids gemäß Anspruch 30 bereit.

**[0019]** Externe Leitsequenz(EGS)moleküle für eukaryotische RNase P werden gentechnisch mit dem Ziel einer effizienten und spezifischen Spaltung von Target-RNA hergestellt. Sie enthalten spezifische Nukleotidsequenzen, die es ermöglichen, dass eine externe Leitsequenz für RNase P vorzugsweise an Target-RNA-Moleküle bindet und eine RNase P-vermittelte Spaltung von Target-RNA-Molekülen fördert. Kurze externe Leitsequenz(SEGS)moleküle wurden derart konstruiert, dass sie bei Hybridisierung an ein Targetmolekül eine Minimalstruktur ergeben, die durch RNase P als Substrat erkannt wird. Die kleine EGS/Targetstruktur umfasst Strukturen, die dem A-Stamm und dem T-Stamm einer tRNA, dem natürlichen Substrat von RNase P, ähnlich sind. Die SEGS macht nur die Hälfte dieser Stammstrukturen aus. Die andere Hälfte der Stammstrukturen wird vom Targetmolekül geliefert. Wenn das Targetmolekül einen größeren Teil der RNase P-Substratstruktur bilden kann, können die offenbarten SEGS-Moleküle signifikant kleiner als frühere EGS-Moleküle sein. Dies macht SEGS-Moleküle als therapeutische Mittel besonders geeignet, da sie leichter und kostengünstiger hergestellt und in einer größeren Menge verabreicht werden können.

**[0020]** Chemisch modifizierte Versionen dieser SEGS-Moleküle, die modifizierte Nukleotide oder Nukleotidverknüpfungen aufweisen, werden so gestaltet, dass deren Beständigkeit gegenüber einem Nukleaseabbau verstärkt ist. Spezifische Regionen werden modifiziert, um eine erhöhte Stabilität zu erreichen, während die RNase P-Targetingaktivität erhalten bleibt. Beispiele zeigen, dass SEGS-Moleküle für RNase P konstruiert wurden, die an Hepatitis-Virus-RNA binden und eine RNase P-Spaltung von Hepatitis-Virus-RNA fördern. Verfahren zur Bestimmung der Aktivität einer SEGS zum Zwecke von Konstrukt-Screening sowie Verfahren zur Verwendung und Herstellung derartiger: RNA-Moleküle werden ebenfalls offenbart.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

**[0021]** **Fig. 1** ist ein Diagramm der Struktur einer kurzen externen Leitsequenz (SEGS), die an ein Target-RNA-Molekül hybridisiert ist. Die Teile der SEGS (SEQ ID NO: 6) und des Target-RNA-Moleküls (SEQ ID

NO: 7) dienen jeweils einer spezifischen Strukturrolle in dem SEGS-Target-RNA-Komplex. Die Teile der SEGS sind von 5' zu 3' der T-Erkennungsarm und der A-Erkennungsarm. Die Teile der Target-RNA sind von 5' zu 3' die erste Targetregion, die Ausbuchtungsregion, die zweite Targetregion und die Windungsregion. Die primäre Strukturbeziehung zwischen der SEGS und der Target-RNA besteht darin, dass der A-Erkennungsarm komplementär zu der ersten Targetregion ist und der T-Erkennungsarm komplementär zu der zweiten Targetregion ist. Mit Ausnahme von zwei Nukleotiden in der Windungsregion sind die angegebenen Sequenzen nur Beispiele und nicht wichtig, um eine RNase P-vermittelte Spaltung der Target-RNA allgemein zu erhalten. In diesem Fall ist die Target-RNA HBV-RNA.

**[0022]** [Fig. 2](#) ist ein Diagramm der Struktur einer SEGS (EGS 3; SEQ ID NO: 1) und einer kurzen Modelltarget-RNA (T 10) mit der Nukleotidsequenz SEQ ID NO: 2. Die zwei Oligonukleotide sind so ausgerichtet, dass sie die Basenpaarung zeigen, die eine Struktur ähnlich dem A-Stamm und T-Stamm von tRNA bildet. Diese Struktur wird durch eukaryotische RNase P erkannt und sie fördert die RNase P-vermittelte Spaltung der Target-RNA. Die RNase P-Spaltungsstelle ist mit einem Pfeil angegeben.

**[0023]** [Fig. 3](#) ist ein Diagramm der Struktur einer SEGS (EGS a) mit der Nukleotidsequenz SEQ ID NO: 3 und einer kurzen Modelltarget-RNA (T a) mit der in den Nukleotiden 1 bis 36 von SEQ ID NO: 4 angegebenen Nukleotidsequenz. Die zwei Oligonukleotide sind so ausgerichtet, dass die Basenpaarung gezeigt wird, die eine dem A-Stamm und T-Stamm von tRNA ähnliche Struktur bildet. Diese Struktur wird durch eukaryotische RNase P erkannt und sie fördert die RNase P-vermittelte Spaltung der Target-RNA. Die RNase P-Spaltungsstelle ist mit einem Pfeil angegeben. Ein Teil der Modelltarget-RNA stimmt mit einem Teil der HBV-Sequenz überein. Die an der "gebrochenen" T-Schleife beteiligten Sequenzen sind die gleichen wie die Sequenzen in der T-Schleife von tRNA<sup>Tyr</sup>.

**[0024]** [Fig. 4](#) ist ein Diagramm der Struktur von EGS mit der Nukleotidsequenz SEQ ID NO: 3 und einer kurzen Modelltarget-RNA (T a') mit der Nukleotidsequenz SEQ ID NO: 4. Die zwei Oligonukleotide sind so ausgerichtet, dass die Basenpaarung gezeigt wird, die eine dem A-Stamm und T-Stamm von tRNA ähnliche Struktur bildet. Diese Struktur wird durch eukaryotische RNase P erkannt und sie fördert die RNase P-vermittelte Spaltung der Target-RNA. Die RNase P-Spaltungsstelle ist mit einem Pfeil angegeben. Die Modelltarget-RNA stimmt mit einem Teil der HBV-Sequenz überein.

**[0025]** [Fig. 5](#) ist ein Diagramm der Struktur von EGSs und einer Target-RNA. Links ist die Struktur der SEGS mit 15 Nukleotiden (EGS 3; SEQ ID NO: 1), die an die kurze Modelltarget-RNA (T 7; SEQ ID NO: 2) hybridisiert ist, angegeben. Rechts ist die Struktur der SEGS mit 12 Nukleotiden (EGS 7; Nukleotide 4 bis 15 von SEQ ID NO: 1), die an die kurze Modelltarget-RNA (T 7; SEQ ID NO: 2) hybridisiert ist, angegeben. Die SEGS und Target-RNA sind so ausgerichtet, dass die Basenpaarung gezeigt wird, die eine dem A-Stamm und T-Stamm von tRNA ähnliche Struktur bildet. Diese Struktur wird durch eukaryotische RNase P erkannt und sie fördert die RNase P-vermittelte Spaltung der Target-RNA. Die RNase P-Spaltungsstelle ist mit einem Pfeil angegeben.

**[0026]** [Fig. 6](#) ist ein Diagramm der Struktur eines minimalen RNase P-Substrats, das ähnlich einem SEGS/Target-RNA-Komplex ist. Die Nukleotidsequenz des Substrats ist SEQ ID NO: 5. Diese Struktur wird durch eukaryotische RNase P erkannt und gespalten. Die RNase P-Spaltungsstelle ist mit einem Pfeil angegeben. Die Sequenz ist ein Modell für einen Teil der HBV-Sequenz.

**[0027]** [Fig. 7](#) ist ein Diagramm der Struktur, die durch Hybridisierung einer SEGS (HBV B) mit der Nukleotidsequenz SEQ ID NO: 6 mit einem Teil von HBV-RNA, der den Nukleotiden 375–424 einer HBV-RNA von 2,1 kb (SEQ ID NO: 7) entspricht, gebildet wird. Die SEGS und HBV-RNA sind so ausgerichtet, dass die Basenpaarung gezeigt wird, die eine dem A-Stamm und T-Stamm von tRNA ähnliche Struktur bildet. Die RNase P-Spaltungsstelle ist mit einem Pfeil angegeben.

**[0028]** [Fig. 8](#) ist ein Diagramm der Struktur, die durch Hybridisierung einer SEGS (HBV C) mit der Nukleotidsequenz SEQ ID NO: 8 mit einem Teil von HBV-RNA, der den Nukleotiden 543–598 einer HBV-RNA von 2,1 kb (SEQ ID NO: 9) entspricht, gebildet wird. Die SEGS und HBV-RNA sind so ausgerichtet, dass die Basenpaarung gezeigt wird, die eine dem A-Stamm und T-Stamm von tRNA ähnliche Struktur bildet. Die RNase P-Spaltungsstelle ist mit einem Pfeil angegeben.

**[0029]** [Fig. 9](#) ist ein Diagramm der Struktur, die durch Hybridisierung einer SEGS (HBV F1) mit der Nukleotidsequenz SEQ ID NO: 10 mit einem Teil von HBV-RNA, der den Nukleotiden 673–718 einer HBV-RNA von 2,1 kb (SEQ ID NO: 11) entspricht, gebildet wird. Die SEGS und HBV-RNA sind so ausgerichtet, dass die Ba-

senpaarung gezeigt wird, die eine dem A-Stamm und T-Stamm von tRNA ähnliche Struktur bildet. Die RNase P-Spaltungsstelle ist mit einem Pfeil angegeben.

**[0030]** [Fig. 10](#) ist ein Diagramm der Struktur, die durch Hybridisierung einer SEGS (HBV H) mit der Nukleotidsequenz SEQ ID NO: 12 mit einem Teil von HBV-RNA, der den Nukleotiden 1559–1606 einer HBV-RNA von 2,1 kb (SEQ ID NO: 13) entspricht, gebildet wird. Die SEGS und HBV-RNA sind so ausgerichtet, dass die Basenpaarung gezeigt wird, die eine dem A-Stamm und T-Stamm von tRNA ähnliche Struktur bildet. Die RNase P-Spaltungsstelle ist mit einem Pfeil angegeben.

**[0031]** [Fig. 11](#) ist ein Diagramm der Struktur, die durch Hybridisierung einer SEGS (HBV H1) mit der Nukleotidsequenz SEQ ID NO: 14 mit einem Teil von HBV-RNA, der den Nukleotiden 1562–1606 einer HBV-RNA von 2,1 kb (Nukleotide 4–48 von SEQ ID NO: 13) entspricht, gebildet wird. Die SEGS und HBV-RNA sind so ausgerichtet, dass die Basenpaarung gezeigt wird, die eine dem A-Stamm und T-Stamm von tRNA ähnliche Struktur bildet. Die RNase P-Spaltungsstelle ist mit einem Pfeil angegeben.

**[0032]** [Fig. 12](#) ist ein Diagramm der Struktur eines minimalen RNase P-Substrats, das ähnlich einem SEGS/Target-RNA-Komplex ist. Die Nukleotidsequenz des Substrats ist SEQ ID NO: 15. Diese Struktur wird durch eukaryotische RNase P erkannt und gespalten. Die RNase P-Spaltungsstelle ist mit einem Pfeil angegeben. Die an den Stämmen und der T-Schleife beteiligten Sequenzen sind die gleichen wie die Sequenzen in dem A-Stamm und T-Stamm und der Schleife von tRNA<sup>Tyr</sup>.

**[0033]** [Fig. 13](#) ist ein Diagramm der Struktur einer SEGS (EGS 3) mit der Nukleotidsequenz SEQ ID NO: 1 und einer kurzen Modelltarget-RNA (T 7) mit der in den Nukleotiden 1 bis 36 von SEQ ID NO: 2 angegebenen Nukleotidsequenz. Die zwei Nukleotide sind so ausgerichtet, dass die Basenpaarung gezeigt wird, die eine dem A-Stamm und T-Stamm von tRNA ähnliche Struktur bildet. Diese Struktur wird durch eukaryotische RNase P erkannt und sie fördert die RNase P-vermittelte Spaltung der Target-RNA. Die RNase P-Spaltungsstelle ist mit einem Pfeil angegeben. Die an den Stämmen und der "gebrochenen" T-Schleife beteiligten Sequenzen sind die gleichen wie die Sequenzen im A-Stamm und T-Stamm und in der Schleife von tRNA<sup>Tyr</sup>.

#### Detaillierte Beschreibung der Erfindung

**[0034]** Oligonukleotide, die zur Förderung der Spaltung von Target-RNA-Molekülen geeignet sind, wurden konstruiert. Die Oligonukleotide sind externe Leitsequenz(EGS)moleküle für eukaryotische RNase P, die so gestaltet sind, dass sie spezifisch an Target-RNA-Moleküle binden und die RNase P-vermittelte Spaltung von Target-RNA-Molekülen fördern und eine verstärkte Nukleasebeständigkeit aufweisen. Diese EGS-Moleküle unterscheiden sich hinsichtlich Struktur und Größe von früheren externen Leitsequenzen, und sie werden als Kurze Externe Leitsequenzen (SEGS) bezeichnet. Eine zur Unterscheidung beitragende Schlüsseleigenschaft besteht darin, dass SEGS nicht von sich aus T-Stamm-und-Schleife von tRNA ähnliche Struktur bilden.

**[0035]** SEGS, die zur Verwendung bei der Behandlung von Hepatitis-B-Virusinfektionen geeignet sind, wurden konstruiert. Die hier verwendeten Ausdrücke "externe Leitsequenz" und "EGS" bezeichnen ein Oligonukleotid, das eine aktive Spaltungsstelle für RNase P in einer Target-RNA bildet. Die Ausdrücke "Kurze Externe Leitsequenz" und "SEGS" bezeichnen die kurzen Formen von EGS, die im Folgenden beschrieben sind. Die Ausdrücke "Kurze Externe Leitsequenz" und "SEGS" sollen nur die kurzen Formen von EGS-Molekülen, die im Folgenden beschrieben sind, im Gegensatz zu "kurzen" EGS-Molekülen im Allgemeinen, d. h. EGS-Molekülen, die nur "kurz" sind, bezeichnen. Um diesen Unterschied zu betonen wird "Kurz Externe Leitsequenz" hier mit Großbuchstaben geschrieben. Wenn auf externe Leitsequenzen Bezug genommen wird, sollen diese SEGS umfassen.

**[0036]** Frühere EGS-Moleküle wurden so gestaltet, dass sie eine mindestens T-Stamm-und-Schleife von tRNA ähnliche Struktur mit einem 3'-Ende und einem 5'-Ende, die mit einem Target-RNA-Molekül unter Bildung von dem A-Stamm und D-Stamm von tRNA ähnlichen Strukturen hybridisieren, bilden. Es wurde ermittelt, dass die der T-Schleife und dem D-Stamm ähnlichen Strukturen für die Spaltung einer Target-RNA/EGS-Struktur unnötig sind. In den offenbarten Molekülen der Kurzen Externen Leitsequenz bilden das SEGS- und Target-RNA-Molekül zusammen dem A-Stamm und T-Stamm von tRNA ähnliche Strukturen. Im Gegensatz zu früheren EGS-Molekülen bildet eine SEGS keine T-Schleife und es bildet von sich aus keine einem T-Stamm ähnliche Struktur. Stattdessen hybridisiert das Target-RNA-Molekül mit der SEGS unter Bildung der Hälfte einer Struktur, die dem T-Stamm von tRNA ähnlich ist. Ein Beispiel für eine SEGS, die mit deren Target-RNA-Molekül hybridisiert ist, ist in [Fig. 1](#) angegeben.

**[0037]** SEGS unterscheiden sich von früheren EGS-Molekülen insofern, als 1) keine intakte T-Schleife vorhanden ist, 2) die SEGS und Target-RNA keine dem D-Stamm von tRNA ähnliche Struktur bilden und 3) die Target-RNA in Kombination mit der SEGS die Hälfte einer Struktur, die ähnlich dem T-Stamm von tRNA ist, bildet.

**[0038]** SEGS besitzen gegenüber früheren EGS-Molekülen mehrere Vorteile. 1) Sie sind leichter zu synthetisieren und zu reinigen, und sie sind aufgrund ihrer kürzeren Länge kostengünstiger, 2) die Verwendung des T-Stamms zur Targeterkennung verleiht der EGS stärkere Spezifität, da die zur Targeterkennung in früheren EGS-Molekülen verwendeten kurzen D-Stämme in der EGS eine weniger targetspezifische Sequenz ergeben, wodurch die Spezifität der Spaltung vermindert wird, und 3) eine SEGS wird von der Zelle bereitwilliger aufgenommen.

## I. Design und Synthese von SEGS-Molekülen

**[0039]** SEGS-Moleküle sind synthetische Oligonukleotide, die an ein Targets substrat unter Bildung einer Sekundär- und Tertiärstruktur, die der natürlichen Spaltungsstelle von Vorläufer-tRNA für eukaryotische RNase P ähneln, binden. Die Fähigkeit von SEGS-Molekülen zur Zielausrichtung und Förderung von RNase P-Aktivität wird unter Verwendung eines in-vitro-Aktivitätstests zur Spaltung einer Target-RNA-Sequenz durch RNase P wie im Folgenden detaillierter beschrieben ohne weiteres bestimmt. Im Falle von SEGS-Molekülen mit modifizierten Nukleotiden oder Nukleotidverknüpfungen ermöglicht ein Stabilitätstest die Bestimmung der Nukleasebeständigkeit von verschiedenen Modifizierungsarten. Der Aktivitätstest ermöglicht den Vergleich der Wirksamkeit einer durch SEGS-Moleküle geförderten, RNase P-vermittelten Spaltung mit unterschiedlichen Modifikationen. Zusammen werden die Tests zur Optimierung und Ausbalancierung von Stabilität und Spaltungseffizienz modifizierter SEGS Moleküle verwendet.

**[0040]** Beispiel für SEGS-Moleküle wurden konstruiert, die zur Verwendung bei der Behandlung einer Viruserkrankung geeignet sind. Das spezifische Target ist das Hepatitis-B-Virus, insbesondere die das Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) codierende RNA. Da HBsAg eine wesentliche Rolle bei der Virusüberstruktur und -infektion spielt, können Therapeutika auf SEGS-Basis zur Abregulierung von Hepatitis durch die Spaltung von HBsAg-mRNA verwendet werden. Bevorzugte Zielstellen in Hepatitis-B-RNA oder anderen Target-RNAs sind Regionen einer konservierten Sequenz, die in allen Formen der Target-RNA auftreten und die ein UNR-Motiv, das im Folgenden beschrieben ist, besitzen. Fünf derartige bevorzugte Stellen wurden in der HBsAg codierenden Region von Hepatitis-B-RNA identifiziert und werden von SEGS-Molekülen mit Nukleotidbasensequenzen, die in SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 und SEQ ID NO: 14 angegeben sind, als Ziele angestrebt.

### A. Design von SEGS-Molekülen

**[0041]** SEGS-Moleküle können gestaltet werden, indem ein Teil der Grundstruktur eines Vorläufer-tRNA-Moleküls so angepasst wird, dass eine Substraterkennungssequenz gebildet wird. Diese Erkennungssequenz ist komplementär zu Regionen einer Zielsequenz in einem Target-RNA-Molekül. In SEGS besteht die Erkennungssequenz aus zwei Erkennungsarmen, die als der A-Erkennungsarm und der T-Erkennungsarm bezeichnet werden, die in Kombination mit Regionen der Zielsequenz in der Target-RNA dem A-Stamm und bzw. T-Stamm eines Target-RNA-Moleküls ähnliche Strukturen bilden. Der T-Erkennungsarm ist 5' von dem und angrenzend an den A-Erkennungsarm lokalisiert. Die Sequenz der Erkennungsarme wird so gewählt, dass sie spezifisch komplementär zu zwei Regionen der Zielsequenz in der Target-RNA, die als die erste Targetregion und die zweite Targetregion bezeichnet werden, sind. Die erste Targetregion umfasst oder ist angrenzend an die 5' und 3' der Stelle, an der die RNase P-vermittelte Spaltung erfolgt.

**[0042]** Die Sequenzen der Erkennungsarme werden derart gewählt, dass die erste und zweite Targetregion in der Target-RNA durch eine kurze ungepaarte Region, die als die Ausbuchtungsregion bezeichnet wird, getrennt sind. Die Bildung dieser Struktur ist die einzige wesentliche Forderung zur Festlegung der Nukleotidsequenz einer SEGS. Vorzugsweise werden die Sequenzen der Erkennungsarme jedoch auch so gewählt, dass ein UNR-Motiv in dem Target-RNA-Molekül angrenzend an die 5' und 3' der zweiten Targetregion vorhanden ist. Das UNR-Motiv kann an die zweite Targetregion unmittelbar angrenzend sein oder es kann von der zweiten Targetregion durch ein oder wenige Spacer-Nukleotide getrennt sein. Üblicherweise ist das UNR-Motiv von der zweiten Targetregion durch 0 bis 10 Spacer-Nukleotide getrennt, zweckmäßigerweise ist das UNR-Motiv von der zweiten Targetregion durch 0 bis 30 Spacer-Nukleotide getrennt und vorzugsweise ist das UNR-Motiv von der zweiten Targetregion durch ein Spacer-Nukleotid getrennt. Das UNR-Motiv besitzt die Nukleotidsequenz UNR, wobei N für ein beliebiges Nukleotid steht, R für ein beliebiges Purinnukleotid steht und U für ein Uridin-



nukleotid steht. Die Region der Zielsequenz in dem Target-RNA-Molekül, die das UNR-Motiv oder eine entsprechende Sequenz und Spacer-Nukleotide bildet, wird als die Windungsregion bezeichnet. Die Windungsregion befindet sich, wenn sie vorhanden ist, unmittelbar angrenzend an die 5' und 3' der zweiten Targetregion. Ohne durch eine spezielle Theorie beschränkt zu sein, wird angenommen, dass die Möglichkeit für die Windungsregion der Targetsequenz in einer Target-RNA, eine Uridinwindungsstruktur zu bilden (siehe Quigley und Rich, *Science* 194: 796–806 (1976) und Junker und Pardi, *RNA* 1: 219–222 (1995)), die Förderung der RNase P-vermittelten Spaltung der Target-RNA unterstützt.

**[0043]** Gemäß den oben beschriebenen Beziehungen besteht die Zielsequenz in der Target-RNA aus von 5' nach 3' der ersten Targetregion, der Ausbuchtungsregion und der zweiten Targetregion, wobei der A-Erkennungsarm der SEGS komplementär zu der ersten Targetregion ist und der T-Erkennungsarm der SEGS komplementär zu der zweiten Targetregion ist. Vorzugsweise ist eine Windungsregion, die ein UNR-Motiv aufweist, ebenfalls in der Zielsequenz 3' der zweiten Targetregion vorhanden. Ein Beispiel für diese Regionen und Beziehungen sind in [Fig. 1](#) angegeben.

**[0044]** Die Erkennungsarme können eine beliebige Länge aufweisen, die zu einem funktionalen SEGS-Molekül führt. Zweckmäßigerweise besitzen der A-Erkennungsarm und T-Erkennungsarm zusammen insgesamt 12 bis 16 Nukleotide. Vorzugsweise besitzen der A-Erkennungsarm und T-Erkennungsarm zusammen insgesamt 12 oder 13 Nukleotide. Allgemein weist der A-Erkennungsarm zweckmäßigerweise eine Länge von 7 bis 9 Nukleotiden auf und der T-Erkennungsarm eine Länge von 5 bis 7 Nukleotiden auf. Vorzugsweise weist der A-Erkennungsarm eine Länge von 7 oder 8 Nukleotiden auf und der T-Erkennungsarm eine Länge von 5 oder 6 Nukleotiden auf. Im Allgemeinen können die Erkennungsarme eine beliebige Nukleotidsequenz besitzen. Wie im Folgenden diskutiert, beruht die Wahl der Sequenz vorzugsweise auf der Sequenz der Zielsequenz in einer interessierenden Target-RNA. Zweckmäßigerweise ist das Nukleotid am 3'-Ende des A-Erkennungsarms ein Cytidin- oder Guanidinnukleotid. Vorzugsweise ist das Nukleotid am 3'-Ende des A-Erkennungsarms ein Cytidinnukleotid.

**[0045]** Die Ausbuchtungsregion kann eine beliebige Länge aufweisen, die zu einem funktionalen SEGS-Molekül führt. Üblicherweise besitzt die Ausbuchtungsregion eine Länge von 1 bis 30 Nukleotiden. Zweckmäßigerweise besitzt die Ausbuchtungsregion eine Länge von 5 bis 15 Nukleotiden. Vorzugsweise besitzt die Ausbuchtungsregion eine Länge von 9 Nukleotiden.

**[0046]** Die Windungsregion kann, wenn sie vorhanden ist, eine beliebige Sequenz aufweisen, die die Konsensusformel UNR, die zu einem funktionalen SEGS-Molekül führt, umfasst. Die Nukleotidsequenzen der Windungsregion werden hier unter Verwendung von Standardnukleotidbasesymbolen bezeichnet. Als Bezug steht N für ein beliebiges Nukleotid, R für ein beliebiges Purinnukleotid, Y für ein beliebiges Pyrimidinnukleotid, A für ein Adeninnukleotid, C für ein Cytosinnukleotid, G für ein Guaninnukleotid, T für ein Thyminnukleotid und U für ein Uracilnukleotid. Üblicherweise besitzt die Windungsregion die Sequenz NUNR. Zweckmäßigerweise besitzt die Windungsregion die Sequenz NU CR oder UUNR. Vorzugsweise besitzt die Windungsregion die Sequenz UUCR.

**[0047]** Üblicherweise umfasst die Windungsregion einer Zielsequenz in einer Target-RNA eine Nukleotidsequenz, die von der Formel NNNR umfasst wird. Zweckmäßigerweise umfasst die Windungsregion einer Zielsequenz in einer Target-RNA eine Nukleotidsequenz, die von mindestens einer der Formeln NNYR, YNNR oder NYNR umfasst wird. Es ist noch zweckmäßiger, dass die Windungsregion einer Zielsequenz in einer Target-RNA eine Nukleotidsequenz umfasst, die von mindestens einer der Formeln YNYR, NY YR oder YYNR umfasst wird. Es ist noch zweckmäßiger, dass die Windungsregion einer Zielsequenz in einer Target-RNA eine Nukleotidsequenz umfasst, die von mindestens einer der Formeln YYYR, YUNR oder NUYR umfasst wird. Es ist noch zweckmäßiger, dass die Windungsregion einer Zielsequenz in einer Target-RNA eine Nukleotidsequenz umfasst, die von mindestens einer der Formeln UYYR oder YYCR oder mindestens einer der Formeln YUYR, UUNR oder NU CR umfasst wird. Es ist noch zweckmäßiger, dass die Windungsregion einer Zielsequenz in einer Target-RNA eine Nukleotidsequenz umfasst, die von der Formel UYCR oder mindestens einer der Formeln UUYR oder YUCR umfasst wird. Vorzugsweise umfasst die Windungsregion einer Zielsequenz in einer Target-RNA eine Nukleotidsequenz, die von der Formel UUCR umfasst wird.

**[0048]** Wenn die Windungsregion einer Zielsequenz in einer Target-RNA eine Nukleotidsequenz umfasst, die von der Formel NNNY umfasst wird, umfasst die Windungsregion üblicherweise eine Nukleotidsequenz, die von der Formel YNNY umfasst wird.

**[0049]** Zweckmäßigerweise umfasst die Windungsregion einer Zielsequenz in einer Target-RNA eine Nukle-

otidsequenz, die von mindestens einer der Formeln YNYY oder YNYN umfasst wird. Es ist noch zweckmäßiger, dass die Windungsregion einer Zielsequenz in einer Target-RNA eine Nukleotidsequenz umfasst, die von der Formel YYYY umfasst wird. Es ist noch zweckmäßiger, dass die Windungsregion einer Zielsequenz in einer Target-RNA eine Nukleotidsequenz umfasst, die von der Formel YUYN oder der Formel UYCY umfasst wird. Es ist noch zweckmäßiger, dass die Windungsregion einer Zielsequenz in einer Target-RNA eine Nukleotidsequenz umfasst, die von mindestens einer der Formeln UUYN oder YUCY umfasst wird. Vorzugsweise umfasst die Windungsregion einer Zielsequenz in einer Target-RNA eine Nukleotidsequenz, die von der Formel UUCY umfasst wird.

**[0050]** Funktionale SEGS-Moleküle erfordern nur, dass sie in Kombination mit einer Target-RNA eine dem A-Stamm und T-Stamm einer Vorläufer-tRNA entsprechende Struktur derart bilden, dass in der Target-RNA zwischen den dem A-Stamm und T-Stamm der tRNA entsprechenden Strukturen eine ungepaarte Region vorhanden ist. Keine der T-Schleife einer tRNA entsprechenden Struktur ist erforderlich. Daher erfordert ein funktionales SEGS-Molekül nur eine Nukleotidsequenz, die zu zwei Regionen eines Target-RNA-Moleküls komplementär ist, wobei die Regionen des Target-RNA-Moleküls durch eine Region, die Ausbuchtungsregion, die zur SEGS nicht komplementär ist, getrennt sind. Vorzugsweise ist eine ein UNR-Motiv enthaltende Windungsregion oder eine andere bevorzugte Windungsregionnukleotidsequenz gemäß der obigen Beschreibung ebenfalls in der Target-RNA angrenzend an die 5' und 3' der Struktur, die dem T-Stamm von tRNA entspricht, vorhanden.

**[0051]** Eine SEGS kann so gestaltet werden, dass sie eine beliebige Sequenz in einer beliebigen interessierenden Target-RNA als Ziel anstrebt. SEGS werden jedoch vorzugsweise gestaltet, indem die Nukleotidsequenz einer interessierenden Target-RNA nach der Lokalisation eines UNR-Motivs oder einer anderen bevorzugten Windungsregionnukleotidsequenz gemäß der obigen Beschreibung abgesehen wird. Für stärker bevorzugte SEGS kann die Suche auf die bevorzugten Sequenzen von Windungsregionen gemäß der obigen Beschreibung beschränkt werden. Sobald eine gewünschte Windungssequenz identifiziert ist, wird die Sequenz des T-Erkennungsarms der SEGS so gewählt, dass sie zu Nukleotiden in der Target-RNA, die angrenzend an die 5' der Windungsregionsequenz und, falls gewünscht, durch ein oder wenige Spacer-Nukleotide abgetrennt sind, komplementär ist. Diese Nukleotide in der Target-RNA stehen für die zweite Targetregion. Die Sequenz des A-Erkennungsarms der SEGS wird so gewählt, dass sie zu Nukleotiden in der Target-RNA, die sich 5' der zweiten Targetregion und durch eine ungepaarte Region getrennt befinden, komplementär ist. Die ungepaarte Region ist die Ausbuchtungsregion in der Zielsequenz.

**[0052]** Die Gestaltung einer SEGS kann mit einem Beispiel erläutert werden. Ein Teil der Nukleotidsequenz des Hepatitis-B-Virus, der ein UNR-Motiv enthält, ist:  
CUGGAUGUGUCUGCGGCGUUUUAUCAUCUCCUCUUCUCCUGCUGCUAU (SEQ ID NO: 7; UNR-Motiv fettgedruckt). Bei Wahl einer Länge des T-Erkennungsarms von fünf Nukleotiden, einer Länge der Ausbuchtungsregion von neun Nukleotiden und einer Länge des A-Erkennungsarms von acht Nukleotiden und eines einzigen Spacer-Nukleotids in der Windungsregion ist die Sequenz für die SEGS das Komplement der fünf Nukleotide, die sich angrenzend an die 5' der Windungsregion befinden, die ein Spacer-Nukleotid (U) 5' des UNR-Motivs umfasst, und anschließend das Komplement der sieben Nukleotide, die beim fünfzehnten Nukleotid 5' der Windungsregion beginnen. Diese SEGS (HBV B) hat die Sequenz GAGGAAACGCCGC (SEQ ID NO: 6; T-Erkennungsarm fettgedruckt). Die Struktur des Komplexes von SEGS HBV B und HBV-RNA ist in [Fig. 7](#) angegeben. Andere Beispiele, die ebenfalls HBV umfassen, sind in [Fig. 8](#), [Fig. 9](#), [Fig. 10](#) und [Fig. 11](#) angegeben.

**[0053]** SEGS-Moleküle können auch zusätzliche Nukleotidsequenzen am 3'-Ende des A-Erkennungsarms und/oder 5'-Ende des T-Erkennungsarms enthalten. Derartige Nukleotidregionen unterscheiden sich von der Erkennungssequenz der SEGS insofern, als sie zur Zielsequenz der Target-RNA nicht komplementär sind. Derartige Sequenzen werden nicht als Teil der Erkennungssequenz der SEGS betrachtet. Ein Beispiel für eine derartige zusätzliche Nukleotidsequenz am 5'-Ende des T-Erkennungsarms ist in [Fig. 2](#) angegeben.

**[0054]** SEGS-Moleküle können auf ihre Fähigkeit zur Förderung der Spaltung von Target-RNA durch RNase P unter Verwendung des Tests gemäß der Beschreibung bei Yuan et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89: 8006–8010 (1992) oder des im Folgenden beschriebenen Tests ohne weiteres durchgemustert werden.

**[0055]** Eine SEGS und die katalytische RNA-Untereinheit einer RNase P können unter Bildung eines einzigen Oligonukleotidmoleküls, das sowohl die Targetingfunktion der SEGS als auch die Spaltungsfunktion der katalytischen RNA von RNase P besitzt, gekoppelt werden. Eine derartige Kombination in einem einzigen Oligonukleotidmolekül wird als interne Leitsequenz von RNase P (RIGS) bezeichnet. Eine RIGS kann in der gleichen Weise wie SEGS zur Spaltung eines Target-RNA-Moleküls verwendet werden.



**[0056]** RIGSs können durch Verknüpfen einer Leitsequenz mit einer katalytischen Sequenz von RNase P durch beliebige geeignete Mittel gebildet werden. Beispielsweise können eine SEGS und katalytische RNA von RNase P als getrennte Moleküle hergestellt werden, die dann in vitro kovalent gekoppelt werden.

**[0057]** Alternativ kann eine vollständige RIGS als einziges Molekül entweder durch chemische Synthese oder durch in-vitro- oder in-vivo-Transkription eines DNA-Moleküls mit Codierung für eine verknüpfte SEGS und katalytische Sequenz von RNase P synthetisiert werden. Die Verknüpfung zwischen den SEGS- und RNase P-Domänen einer RIGS kann eine beliebige Form aufweisen, die eine Spaltung einer Target-RNA durch die Domänen ermöglicht. Beispielsweise können die zwei Domänen durch einen Oligonukleotid-Linker verbunden sein. Vorzugsweise besteht der Linker aus üblichen Nukleotiden, die durch Phosphodiesterbindungen verbunden sind. Die Komponenten der SEGS und der katalytischen Sequenz von RNase P können in jeder Reihenfolge verbunden werden, wobei die katalytische Sequenz von RNase P an entweder das 3'-Ende oder 5'-Ende der SEGS-Komponente gebunden wird. Verfahren zur Konstruktion und Verwendung von RIGS sind in der PCT-Anmeldung WO 95/24489 der Yale University beschrieben.

**[0058]** Die SEGS-Moleküle können auch regelbar sein. Ein regelbares SEGS-Molekül ist eine wie oben beschriebene SEGS-Sequenz, die an eine Ligandenbindungssequenz gebunden ist, die die Aktivität des SEGS-Moleküls unter die Kontrolle dieses Liganden stellt und das Vorhandensein des Liganden zur Aktivierung oder Inaktivierung erforderlich macht. RNA-Moleküle werden konstruiert, in denen ein Teil einen Liganden binden kann und der andere Teil eine SEGS-Sequenz ist. Nach der Wahl von Molekülen, die den Liganden binden, erfolgt ein zweites Selektionsverfahren, bei dem die ligandbindenden Moleküle auf ihre katalytische Funktion in Gegenwart und Abwesenheit des Liganden oder "Co-Arzneimittels" getestet werden. Auf diese Weise werden regelbare SEGS-Moleküle zur Verwendung bei der Spaltung einer Target-RNA in Gegenwart eines Liganden oder der Spaltung einer Target-RNA in Abwesenheit eines Liganden ausgewählt.

**[0059]** Dieses Verfahren und regelbare SEGS-Moleküle sind bei der Spaltung eines Target-RNA-Moleküls in gesteuerter Weise verwendbar. Es ist besonders günstig, wenn das Target-RNA-Molekül in einer Zelle vorhanden ist, in der es nicht günstig ist, die Wirtszelle durch eine vollständige Inaktivierung dieser RNA-Moleküle abzutöten. Die Bildung, Auswahl und Verwendung von regelbaren EGS-Molekülen ist in den PCT-Anmeldungen WO 94/13791 und WO 94/13833 vollständig beschrieben. Die gleichen Verfahren können zur Bildung, Auswahl und Verwendung von regelbaren SEGS-Molekülen verwendet werden.

**[0060]** Verfahren zur Herstellung oder Synthese von SEGS-Molekülen und DNA-Sequenzen mit Codierung für SEGS-Moleküle mit einer bekannten Sequenz können routinemäßig unter Verwendung von automatisierter Nukleinsäuresynthese, beispielsweise unter Verwendung des Cyanoethylphosphoramidit-Verfahrens an einem DNA Modell 392 Synthesizer von Applied Biosystems, Inc. (Foster City, CA) oder einer Pharmacia Oligo Pilot (Pharmacia, Piscataway, NJ) durchgeführt werden. Andere Verfahren zur Synthese von Nukleinsäuremolekülen sind ebenfalls verfügbar (siehe beispielsweise Ikuta et al., *Ann. Rev. Biochem.* 53: 323–356 (1984) (Phosphotriester- und Phosphitriester-Verfahren); Narang et al., *Methods Enzymol.* 65: 610–620 (1980) (Phosphotriester-Verfahren). Alternativ können SEGS-Moleküle durch Transkription von DNA-Templaten, beispielsweise mit T7-RNA-Polymerase, synthetisiert werden (Milligan et al., *Nucl Acids Res.* 15: 8783 (1987)). SEGS-Moleküle können auch in Zellen durch Platzieren eines Vektors, der die SEGS codiert und in den Zellen exprimiert, synthetisiert werden.

## B. Aktivität von SEGS-Molekülen

**[0061]** Ein in-vitro-Spaltungstest, der den Prozentsatz von Substrat-RNA, die nach der Inkubation mit verschiedenen Mengen einer SEGS in Gegenwart einer nicht-beschränkenden Menge von RNase P verbleibt, ermittelt, wird als Indikator der potentiellen Aktivität des SEGS/RNase P-Komplexes verwendet.

**[0062]** SEGS/RNase P-Komplexe, die die höchste in-vitro-Aktivität zeigen, werden für weitere Tests gewählt. Der verbleibende Prozentsatz von RNA kann als Funktion der SEGS-Konzentration aufgetragen werden. Die katalytische Wirksamkeit einer SEGS/RNase P kann als  $k_{cat}/K_m$  (wobei  $k_{cat}$  die Geschwindigkeitskonstante der Spaltung ist und  $K_m$  die Michaelis-Konstante ist), die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung für die Reaktion einer freien SEGS und eines Substrat-RNA-Moleküls, ausgedrückt werden. Gemäß den Verfahren von Heidenreich und Eckstein (*J. Biol. Chem.*, 267: 1904–1909 (1992)) wird  $k_{cat}/K_m$  unter Verwendung der Formel

$$-\ln F/t = (k_{cat}/K_m)[C]$$

worin F der Bruchteil des verbliebenen Substrats ist, t die Reaktionsdauer ist und [C] die SEGS-Konzentration

ist, bestimmt.

**[0063]** Bevorzugte SEGS-Konstrukte sind diejenigen, die an die Hepatitis-Substrat-RNA binden und die bevorzugte RNase P-Spaltung der Hepatitis-Substrat-RNA fördern. Bevorzugte Konstrukte können unter Verwendung des Ribozym-spaltungstests gemäß der Beschreibung in Beispiel 1 und durch Bestimmen, welche Konstrukte bei Vermitteln der spezifischen RNase P-Spaltung der Hepatitis-Substrat-RNA-Sequenz die wirksamsten sind, was durch den Wert  $k_{cat}/K_m$  gemäß der obigen Beschreibung bestimmt wurde, ausgewählt werden.

**[0064]** Die intrazelluläre Aktivität einer SEGS kann unter Verwendung von Zellen, die die interessierende Target-RNA exprimieren, getestet werden. Beispielsweise können SEGS-Moleküle, die auf verschiedene Regionen von HBV-RNA mit dem NUNR-Motiv gemäß der obigen Beschreibung zielgerichtet sind, in Zellen, die HBV-RNA exprimieren, getestet werden. Hierfür kann eine SEGS in HepG2.2.15-Zellen, die HBV-RNA und vollständig zusammengebaute HBV-Teilchen konstitutiv exprimieren (Sells et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 84: 1005–1009 (1987)), auf die Hemmung der Virusreplikation getestet werden. Die Tests können allgemein gemäß der Beschreibung bei Korba und Gerin (Antiviral Res. 19: 55–70 (1992)) durchgeführt werden. Die SEGS-Moleküle können den Zellen als Komplex mit Hämlipidteilchen, speziell 1,2-Dioleoyloxy-3-(trimethylammonium)propan (DOTAP) und Dioleoyl-phosphatidylethanolamin (DOPE), die mit Häm konjugiert sind (als DDH bezeichnet), während 10 Tagen zugeführt werden, und das DNA-Genom von HBV-Partikeln, die in das Medium sezerniert wurden, kann unter Verwendung von Dot-Blot-Tests getestet werden.

**[0065]** Hämlipidteilchen können allgemein wie folgt hergestellt werden. Häm (als Fe-Protoporphyrin-IX-chlorid, Hämin) wird in Ethanol, das 8,3 mM NaOH enthält, gelöst, und unlösliches Material wird mit 14 krpm 10 min pelletisiert. Um eine effektive Konjugation unter Verwendung von Carbodiimid zu ermöglichen, wird der pH-Wert der Hämlösung durch die Zugabe kleiner Volumina HCl ohne die Ausfällung von Häm verringert. In einer typischen Reaktion werden 200 mg Hämin zu 10 ml Ethanol, das 8,3 mM NaOH enthält, gegeben. HCl wird zu der überstehenden Hämlösung gegeben, um den pH-Wert auf 1,7 zu senken, die Hämlösung (die etwa 1,6 mg Häm enthält), 760  $\mu$ l (10  $\mu$ mol) DOPE (10 mg/ml) und 500  $\mu$ l DCC (10 mg/ml) werden zugegeben, und die Konjugation wird über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln fortschreiten gelassen. 10  $\mu$ mol DOTAP in Chloroform werden zu dem mit Häm konjugierten DOPE in einem sterilen Glasteströhrchen gegeben, und die Lipide werden unter Vakuum in einem Wirbelexsikkator bei 50°C 20 min zu einem dünnen Film getrocknet. 1 ml sterile 150 mM NaCl wird zu dem Lipidfilm gegeben, und die Emulsion wird 30 min in einem Ultraschallbad Branson 1210, das mit 47 kHz bei 20°C arbeitet, ultraschallbehandelt, wobei eine trübe Lösung erhalten wird. Die Lipidteilchen werden durch eine Polycarbonatmembran unter Verwendung eines Lipex-Extruder (Lipex Biomembranes, Vancouver, Canada) extrudiert.

**[0066]** Die SEGS/Lipid-Zusammensetzungen werden durch Einstellen der SEGS-Moleküle enthaltenden Lösungen auf 150 mM NaCl hergestellt, und DDH-Lipid-Teilchen (in 150 mM NaCl) werden zu der SEGS-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml gegeben. Nach 15minütigem Inkubieren bei Raumtemperatur wird Kulturmedium zugegeben und das SEGS/Lipid-Gemisch verdünnt, um SEGS-Zusammensetzungen mit der gewünschten Endkonzentration von SEGS zu erhalten. Ein äquivalentes Volumen von 150 mM NaCl wird als Kontrolle verwendet.

**[0067]** Konfluente Kulturen von HepG2.2.15-Zellen werden auf 96-Vertiefungen-Kulturplatten mit ebenem Boden gehalten. Duplikatplatten werden für jede SEGS-Behandlung verwendet. Insgesamt drei Kulturen auf jeder Platte werden mit jeder der verdünnten SEGS-Zusammensetzungen behandelt. Die Kulturen werden mit 10 aufeinanderfolgenden Tagesdosen der SEGS-Zusammensetzungen behandelt. Das Medium wird täglich gegen frische SEGS-Zusammensetzungen ausgetauscht. Die Wirkung dieser Behandlungen wird durch Ermitteln der extrazellulären HBV/DNA-Spiegel überwacht.

**[0068]** Die antiviralen Aktivitäten dieser SEGSs können als  $EC_{50}$ -Wert berechnet werden. Der  $EC_{50}$ -Wert ist die Konzentration einer Verbindung, bei der eine 50%ige Verringerung der produzierten Menge von HBV gegenüber Zellen, die mit der Kontrollzusammensetzung behandelt wurden, auftritt. Zum Vergleich kann die antivirale Wirkung von 2'-3'-ddC, einem bekannten wirksamen anti-HBV-Nukleosidanalogon, in den gleichen Tests ermittelt werden.

**[0069]** Ein Phenolrotttest, der die Lebensfähigkeit der Zellen, die die SEGS erhalten, ermittelt, kann verwendet werden, um zu bestimmen, ob irgendeine Toxizität (die als eine mehr als 50%ige Verringerung der Farbstoffaufnahmemengen, die in unbehandelten Zellen beobachtet werden, definiert ist) mit der Verabreichung der SEGS verbunden ist.

## II. Nukleasebeständige SEGS-Moleküle

## A. Arten der Modifikationen

**[0070]** Obwohl nicht-modifizierte Oligoribonukleotide als wirksame SEGS in einer nukleasefreien Umgebung funktionieren können, verringert die kurze Halbwertszeit in Serum und in Zellen deren Wirksamkeit als Therapeutika. Chemische Modifikationen können durchgeführt werden, die die Nukleasebeständigkeit von SEGS ohne Beeinträchtigen von deren biologischer Funktion der Förderung der RNase P-vermittelten Spaltung von Target-RNA stark erhöhen. Im Allgemeinen können derartige Modifikationen an der 2'-Position der Nukleotide in einer SEGS, den 3'- und 5'-Enden einer SEGS und an den Phosphatverknüpfungen zwischen den Nukleotiden in einer SEGS durchgeführt werden. Beispielsweise können eine oder mehrere der Basen eines SEGS-Konstrukts durch 2'-Methoxyribonukleotide, Phosphorothioatdesoxyribonukleotide oder Phosphorothioatribonukleotide unter Verwendung von verfügbaren Nukleinsäuresyntheseverfahren ersetzt werden. Modifizierte Nukleotide und Oligonukleotide und Verfahren für deren Synthese sind bekannt. Einige von diesen sind beschrieben bei Offensperger et al., EMBO J., 12: 1257–1262 (1993); WO 93/01286 von Rosenberg et al.; Agrawal et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 7079–7083 (1988); Sarin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 7448–7794 (1989); Shaw et al., Nucleic Acids Res., 19: 747–750 (1991); Orson et al., Nucl. Acids Res., 19: 3435–3441 (1991); Paoletta et al., EMBO J., 11: 1913–1919 (1992); Pieken, et al., Science, 253: 314–317 (1991); Heidenreich und Eckstain, J. Biol. Chem., 267: 1904–1909 (1992); WO 91/17093 von Hybridon, Inc.; EP 0339842 von Ajinomoto Co., Inc.; WO 95/23225 von Ribozyme Pharmaceuticals, Inc.; WO 94/15619 von Johns Hopkins University; und US-Patent 5 334 711 von Sproat et al.

**[0071]** Bei der Beschreibung von Substituenten, die zur Modifizierung von Nukleotiden, Oligonukleotiden und SEGS verwendet werden, bezeichnen Alkyl- oder Alkylgruppen einen gesättigten aliphatischen Kohlenwasserstoff, der geradkettig, verzweigt-kettig und cyclische Alkylgruppen umfasst. Für diesen Zweck besitzen derartige Alkylgruppen üblicherweise 1 bis 12 Kohlenstoffe. Zweckmäßigerweise besitzen derartige Alkylgruppen 1 bis 6 Kohlenstoffe. Noch zweckmäßiger besitzen derartige Alkylgruppen 1 bis 2 Kohlenstoffe. Vorzugsweise besitzen derartige Alkylgruppen einen Kohlenstoff. Diese Alkylgruppen können auch eine oder mehrere Hydroxylgruppen, eine oder mehrere Aminogruppen oder beide umfassen. Derartige Hydroxyl- und Aminogruppen können an ein beliebiges Kohlenstoffatom in der Alkylgruppe gekoppelt sein. Der hier verwendete Ausdruck Hydroxyalkyl wird zur Bezeichnung einer Alkylgruppe, die eine oder mehrere Hydroxylgruppen umfasst, verwendet, der Ausdruck Aminoalkyl wird zur Bezeichnung einer Alkylgruppe, die eine oder mehrere Aminogruppen umfasst, verwendet, und der Ausdruck Hydroxylaminoalkyl wird zur Bezeichnung einer Alkylgruppe, die eine oder mehrere Hydroxylgruppen und eine oder mehrere Aminogruppen umfasst, verwendet. Der hier verwendete Ausdruck Allyl oder Allylgruppe bezeichnet einen ungesättigten aliphatischen Kohlenwasserstoff, der geradkettig, verzweigt-kettig und cyclische Allylgruppen umfasst. Für diesen Zweck besitzen derartige Allylgruppen üblicherweise 1 bis 12 Kohlenstoffe. Zweckmäßigerweise besitzen derartige Allylgruppen 1 bis 6 Kohlenstoffe. Noch zweckmäßigerweise besitzen derartige Allylgruppen 2 bis 3 Kohlenstoffe. Vorzugsweise besitzen derartige Allylgruppen drei Kohlenstoffe. Andere Substituenten können ebenfalls zur Modifizierung der hier beschriebenen Nukleotide, Oligonukleotide und SEGS verwendet werden, beispielsweise Aryl, Alkaryl und Arylalkyl, wobei Aryl eine Benzylgruppe bezeichnet, Alkaryl eine mit einer Arylgruppe substituierte Alkylgruppe bezeichnet und Arylalkyl eine mit einer Alkylgruppe substituierte Arylgruppe bezeichnet.

**[0072]** Die Verwendung des Ausdrucks Modifikation in Bezug auf Nukleotide, Oligonukleotide und SEGS soll hier chemische Unterschiede eines Nukleotids oder Oligonukleotids gegenüber herkömmlichen Nukleotiden und Oligonukleotiden bezeichnen. Die Verwendung des Ausdrucks Modifikation soll hier nicht die Art und Weise beschränken, in der die modifizierten Nukleotide, Oligonukleotide oder SEGS hergestellt werden. In ähnlicher Weise sollen Bezugnahmen auf das Ersetzen einer chemischen Gruppe an einem Nukleotid, Oligonukleotid oder SEGS chemische Unterschiede eines Nukleotids oder Oligonukleotids in Bezug auf herkömmliche Nukleotide und Oligonukleotide bezeichnen und nicht die Art und Weise beschränken, in der die Nukleotide, Oligonukleotid oder SEGS hergestellt werden.

**[0073]** 1. Modifikationen an den 3'- und 5'-Enden. In der derzeitigen Literatur ist klar dokumentiert, dass der Abbau von Oligonukleotidanaloga hauptsächlich 3'-Exonukleasen zuzuschreiben ist. Mehrere Untersuchungen zeigten auch, dass verschiedene 3'-Modifikationen die Nukleaseempfindlichkeit dieser Analoga stark vermindern können. So ist ein weiteres Verfahren zur Verringerung der Empfindlichkeit gegenüber 3'-Exonukleasen die Einführung eines freienamins an einer 3'-terminalen Hydroxylgruppe des SEGS-Moleküls (siehe beispielsweise Orson et al., Nucl. Acids Res., 19: 3435–3441 (1991)). Eine weitere günstige 3'-terminale Modifikation ist die Kopplung eines Thyminnukleotids eines SEGS mit einer 3'-3'-Verknüpfung. Eine derartige Struktur wird hier als 3'-3'-Thyminnukleotid oder T(3'-3') bezeichnet.

**[0074]** Übliche 3'-Modifikationen sind diejenigen, wobei das 3'-Hydroxyl der Kurzen Externen Leitsequenz durch eine chemische Gruppe, wie -H, -O-R<sup>1</sup>, -NH<sub>2</sub>, -NH-R<sup>1</sup>, -N-R<sup>1</sup><sub>2</sub>, F und -3'-Nukleotid, ersetzt ist, wobei jeder Rest R<sup>1</sup> unabhängig voneinander Alkyl, Hydroxyalkyl, Aminoalkyl, Hydroxylaminoalkyl, Allyl, -PR<sup>2</sup>(O)-R<sup>2</sup> oder -PR<sup>2</sup>(S)-R<sup>2</sup> bedeutet, wobei jeder Rest R<sup>2</sup> unabhängig voneinander O, S, F, Alkyl, Hydroxyalkyl, Aminoalkyl, Hydroxylaminoalkyl, Allyl, O-R<sup>3</sup> oder S-R<sup>3</sup> bedeutet und wobei jeder Rest R<sup>3</sup> unabhängig voneinander Alkyl, Hydroxyalkyl, Aminoalkyl, Hydroxylaminoalkyl oder Allyl bedeutet. Zweckmäßige 3'-Modifikationen sind diejenigen, wobei das 3'-Hydroxyl der Kurzen Externen Leitsequenz durch eine chemische Gruppe, wie -H, -O-CH<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH-CH<sub>3</sub>, -N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, F, -3'-Thyminnukleotid, -OPO(O)-CH<sub>3</sub>, -OPO(S)-CH<sub>3</sub>, -OPO(O)OCH<sub>2</sub>CH(OH)-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> und -OPO(S)OCH<sub>2</sub>CH(OH)-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, ersetzt ist. Die bevorzugten 3'-Modifikationen sind diejenigen, wobei das 3'-Hydroxyl der Kurzen Externen Leitsequenz durch -3'-Thyminnukleotid, -OPO(O)OCH<sub>2</sub>CH(OH)-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> oder -OPO(S)OCH<sub>2</sub>CH(OH)-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> ersetzt ist. Der hier verwendete Ausdruck 3'-Hydroxyl einer SEGS bezeichnet die Hydroxylgruppe, die normalerweise am 3'-Kohlenstoff des Riboserests im 3'-terminalen Nukleotid der SEGS vorhanden ist. Der hier verwendete Ausdruck 3'-Kohlenstoff einer SEGS bezeichnet den 3'-Kohlenstoff des Riboserests im 3'-terminalen Nukleotid der SEGS.

**[0075]** Obwohl das 5'-Ende einer SEGS vorzugsweise eine Hydroxyl- oder Phosphatgruppe aufweist, kann das 5'-Ende modifiziert werden, um die Beständigkeit der SEGS gegenüber Nukleasen zu erhöhen. Übliche 5'-Modifikationen sind diejenigen, wobei das 5'-Hydroxyl der Kurzen Externen Leitsequenz durch eine chemische Gruppe, wie -H, -O-R<sup>4</sup>, -NH<sub>2</sub>, -NH-R<sup>4</sup>, -N-R<sup>4</sup><sub>2</sub> und F, ersetzt ist, wobei jeder Rest R<sup>4</sup> unabhängig voneinander Alkyl, Hydroxyalkyl, Aminoalkyl, Hydroxylaminoalkyl, Allyl, -PR<sup>5</sup>(O)-R<sup>5</sup> oder -PR<sup>5</sup>(S)-R<sup>5</sup> bedeutet, wobei jeder Rest R<sup>5</sup> unabhängig voneinander O, S, F, Alkyl, Hydroxyalkyl, Aminoalkyl, Hydroxylaminoalkyl, Allyl, O-R<sup>6</sup> oder S-R<sup>6</sup> bedeutet und wobei jeder Rest R<sup>6</sup> unabhängig voneinander Alkyl, Hydroxyalkyl, Aminoalkyl, Hydroxylaminoalkyl oder Allyl bedeutet. Zweckmäßige 5'-Modifikationen sind diejenigen, wobei das 5'-Hydroxyl der Kurzen Externen Leitsequenz durch eine chemische Gruppe, wie -H, -O-CH<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH-CH<sub>3</sub>, -N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, F, -OPO(O)-CH<sub>3</sub>, -OPO(S)-CH<sub>3</sub>, -OPO(O)OCH<sub>2</sub>CH(OH)-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> und -OPO(S)OCH<sub>2</sub>CH(OH)-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, ersetzt ist. Die bevorzugten 5'-Modifikationen sind diejenigen, wobei das 5'-Hydroxyl der Kurzen Externen Leitsequenz durch -OPO(O)OCH<sub>2</sub>CH(OH)-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> oder -OPO(S)OCH<sub>2</sub>CH(OH)-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> ersetzt ist. Der hier verwendete Ausdruck 5'-Hydroxyl einer SEGS bezeichnet die Hydroxylgruppe, die normalerweise am 5'-Kohlenstoff des Riboserests im 5'-terminalen Nukleotid der SEGS vorhanden ist, an das normalerweise eine Phosphatgruppe gebunden ist. Der hier verwendete Ausdruck 5'-Kohlenstoff einer SEGS bezeichnet den 5'-Kohlenstoff des Riboserests im 5'-terminalen Nukleotid der SEGS. Eine weitere günstige Modifikation ist eine kovalente Bindung eines Interkalationsmittels, beispielsweise eines Acridinderivats, an das 5'-terminale Phosphat (beispielsweise unter Verwendung einer Pentamethylenbrücke) (siehe beispielsweise Maher et al., *Science*, 245: 725–730 (1989); Grigoriev et al., *J. Biol. Chem.*, 267: 3389–3395 (1992)). Die WO 95/23225 beschreibt chemische Modifikationen zur Erhöhung der Stabilität von Ribozymen, beispielsweise die Einführung einer Alkylgruppe am 5'-Kohlenstoff eines Nukleosids- oder Nukleotidzuckers. Derartige Modifikationen können auch bei SEGS-Molekülen verwendet werden.

**[0076]** 2. Modifikationen an der 2'-Position von Nukleotiden. Eine weitere Klasse von chemischen Modifikationen, die vermutlich günstig ist, ist die Modifikation der 2'-OH-Gruppe einer Riboseeinheit eines Nukleotids, von der gezeigt wurde, dass sie für die Aktivität der verschiedenen intrazellulären und extrazellulären Nukleasen entscheidend ist. Typische 2'-Modifikationen sind die Synthese von 2'-O-Methyl-Oligonukleotiden (Paolella et al., *EMBO J.*, 11: 1913–1919, 1992) und 2'-Fluor- und 2'-Amino-Oligonukleotiden (Pieken et al., *Science*, 253: 314–317 (1991); Heidenreich und Eckstain, *J. Biol. Chem.*, 267: 1904–1909 (1992)). SEGS-Moleküle können auch Desoxyribonukleotide enthalten. Derartige Substitutionen verbessern die Nukleasebeständigkeit durch Eliminieren der entscheidenden 2'-OH-Gruppe. Die WO 95/23225 beschreibt 2'-Desoxy-2'-alkylnukleotide, die zur Verstärkung der Stabilität von Oligonukleotiden vorhanden sein können.

**[0077]** Übliche 2'-Modifikationen sind diejenigen, wobei das 2'-Hydroxyl eines Nukleotids durch eine chemische Gruppe, wie -H, -O-R<sup>7</sup>, -NH<sub>2</sub>, -NH-R<sup>7</sup>, -N-R<sup>7</sup><sub>2</sub>, F und -2'-Nukleotid, ersetzt ist, wobei jeder Rest R<sup>7</sup> unabhängig voneinander Alkyl, Hydroxyalkyl, Aminoalkyl, Hydroxylaminoalkyl, Alkyl, -PR<sup>8</sup>(O)-R<sup>8</sup> oder PR<sup>8</sup>(S)-R<sup>8</sup> bedeutet, wobei jeder Rest R<sup>8</sup> unabhängig voneinander O, S, F, Alkyl, Hydroxyalkyl, Aminoalkyl, Hydroxylaminoalkyl, Allyl, O-R<sup>9</sup> oder S-R<sup>9</sup> bedeutet und wobei jeder Rest R<sup>9</sup> unabhängig voneinander Alkyl, Hydroxyalkyl, Aminoalkyl, Hydroxylaminoalkyl oder Allyl bedeutet. Zweckmäßige 2'-Modifikationen sind diejenigen, wobei das 2'-Hydroxyl eines Nukleotids durch eine chemische Gruppe, wie -H, -O-CH<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH-CH<sub>3</sub>, -N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, F, -OCH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>, -OPO(O)-CH<sub>3</sub> und -OPO(S)-CH<sub>3</sub> ersetzt ist. Die bevorzugte 2'-Modifikation ist diejenige, wobei das 2'-Hydroxyl eines Nukleotids durch -O-CH<sub>3</sub> ersetzt ist.

**[0078]** 3. Modifikationen der Phosphatverknüpfungen. Eine Modifikation der die Nukleotide in einer SEGS verknüpfenden Phosphatgruppen kann auch zur Verstärkung der Beständigkeit der SEGS gegenüber Nukle-

asen verwendet werden. Eine typische Modifikation für diesen Zweck umfasst das Ersetzen von einem oder beiden der freien Sauerstoffatome durch Schwefel oder ein Halogen. Die freien Sauerstoffatome oder ein Schwefelatom, falls dieses vorhanden ist, können auch mit chemischen Gruppen, wie Alkyl, Hydroxyalkyl, Aminoalkyl, Hydroxylaminoalkyl oder Allyl, verknüpft werden. Beispiele derartiger Substitutionen, beispielsweise die Verwendung von 3'- und/oder 5'-Dihalogenphosphonat-substituierten Nucleotiden (beispielsweise 3'- und/oder 5'-CF<sub>2</sub>-Phosphonat-substituierte Nucleotide) sind in WO 95/23225 beschrieben. Übliche modifizierte Phosphatverknüpfungsgruppen zur Verwendung in SEGS umfassen -OPR<sup>10</sup>(O)O-, -OPR<sup>10</sup>(S)O- und -OPO(S)O-, wobei R<sup>10</sup> Alkyl, Hydroxyalkyl, Aminoalkyl, Hydroxylaminoalkyl, Allyl, -O-R<sup>11</sup>, -NH<sub>2</sub>, -NH-R<sup>11</sup>, -N-R<sup>11</sup><sub>2</sub> oder F bedeutet und wobei jeder Rest R<sup>11</sup> unabhängig voneinander Alkyl, Hydroxyalkyl, Aminoalkyl, Hydroxylaminoalkyl oder Allyl bedeutet. Zweckmäßige modifizierte Phosphatverknüpfungsgruppen zur Verwendung in SEGS umfassen -OPR<sup>12</sup>(O)O-, -OPR<sup>12</sup>(S)O- und -OPO(S)O-, wobei R<sup>12</sup> -CH<sub>3</sub>, -O-CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH-CH<sub>3</sub>, -N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> oder F bedeutet. Die bevorzugte modifizierte Phosphatverknüpfungsgruppe zur Verwendung in SEGS ist -OPO(S)O-, das üblicherweise als Phosphorothioat bezeichnet wird.

**[0079]** Eine weitere günstige Modifikation ist die Methylierung von Cytosinbasen, die in der Sequenz vorhanden sein können. Die Stabilität von SEGS/Target-RNA-Hybriden kann durch die Verwendung modifizierter Nucleotide, die Oligonucleotide mit einer stärkeren Basenpaarung mit der Target-RNA ergeben, erhöht werden. Beispielsweise erhöhen C-5-Propinylpyrimidnucleotide die Wasserstoffbrückenbindung zwischen Nucleinsäuren (Froehler et al., Tetrahedron Letters 33: 5307–5310 (1992)).

**[0080]** Das Ausmaß, in dem Modifikationen die Effizienz, mit der ein modifiziertes SEGS-Molekül eine ribozymvermittelte Spaltung von Target-RNA fördert, beeinflussen, kann ohne weiteres unter Verwendung des im Vorhergehenden beschriebenen Spaltungstests bestimmt werden.

#### B. Chimäre SEGS-Moleküle

**[0081]** Die obigen Modifikationen können durchgängig in einem SEGS-Molekül, in beschränkten Regionen eines, SEGS-Moleküls und/oder in Kombinationen unter Bildung von Chimären modifizierter SEGS-Moleküle verwendet werden. Es wird angenommen, dass alle Nucleotide in einer SEGS ohne eine signifikante Verminderung von deren Fähigkeit, die RNase P-vermittelte Spaltung einer Target-RNA zu fördern, chemisch modifiziert werden können. Beispielsweise wurde ermittelt, dass 2'-O-Methyl-modifizierte Nucleotide durchgängig in einer SEGS ohne eine signifikante Abnahme der RNase P-Targetingaktivität verwendet werden können.

**[0082]** Das Ausmaß, in dem Modifikationen die Effizienz, mit der das modifizierte SEGS-Molekül die RNase P-vermittelte Spaltung einer Target-RNA fördert, beeinflussen, kann ohne weiteres unter Verwendung des im Vorhergehenden beschriebenen Spaltungstests bestimmt werden. Chemisch modifizierte SEGS-Moleküle können entsprechend der Höhe der Ribozymspaltungsaktivität, die durch die modifizierte SEGS gefördert wird, im Vergleich zu der Ribozymspaltungsaktivität, die durch eine nicht-modifizierte SEGS, d. h. ein SEGS-Molekül mit der gleichen Nucleotidsequenz wie die modifizierte SEGS, das jedoch aus nicht-modifizierten Ribonucleotiden, nicht-modifizierten Phosphodiester-Verknüpfungen und nicht-modifizierten 3'- und 5'-Enden besteht, gefördert wird, klassifiziert werden. Dieser Vergleich ergibt die relative Ribozymspaltungsaktivität, die durch das modifizierte SEGS-Molekül gefördert wird, die vorzugsweise als Prozentsatz der Ribozymspaltungsaktivität, die durch das nicht-modifizierte SEGS-Molekül gefördert wird, ausgedrückt wird. Modifizierte SEGS-Moleküle können auf der Basis dieser Aktivitätshöhen in Klassen eingeteilt werden. Auf diese Weise können modifizierte SEGS-Moleküle beispielsweise in vier Klassen eingeteilt werden: (1) modifizierte SEGS-Moleküle, die mehr als 70% der Ribozymspaltungsaktivität, die von einer nicht-modifizierten SEGS gefördert wird, fördern, (2) modifizierte SEGS-Moleküle, die 25% bis 50% der Ribozymspaltungsaktivität, die von einer nicht-modifizierten SEGS gefördert wird, fördern, (3) modifizierte SEGS-Moleküle, die 25% bis 10% der Ribozymspaltungsaktivität, die von einer nicht-modifizierten SEGS gefördert wird, fördern, und (4) modifizierte SEGS-Moleküle, die weniger als 25% der Ribozymspaltungsaktivität, die von einer nicht-modifizierten SEGS gefördert wird, fördern. Übliche modifizierte SEGS-Moleküle fördern mindestens 25% der Ribozymspaltungsaktivität, die von einer nicht-modifizierten SEGS gefördert wird. Zweckmäßige modifizierte SEGS-Moleküle fördern mindestens 50% der Ribozymspaltungsaktivität, die von einer nicht-modifizierten SEGS gefördert wird. Bevorzugte modifizierte SEGS-Moleküle fördern mindestens 70% der Ribozymspaltungsaktivität, die von einer nicht-modifizierten SEGS gefördert wird.

#### III. Klonierungs- und Expressionsvektoren

**[0083]** Bevorzugte Vektoren zur Einführung von SEGS-Molekülen in Säugetierzellen umfassen virale Vektoren, wie die Retroviren, die DNA, die ein SEGS-Molekül codiert, direkt in den Kern einführen, wo die DNA dann

transkribiert wird, wobei das codierte SEGS-Molekül produziert wird.

**[0084]** Beispiele für Verfahren zur Verwendung von Retrovirusvektoren zur Gentherapie sind in US Patent Nr. 4 868 116 und 4 980 286, den PCT-Anmeldungen WO 90/02806 und WO 89/07136 und Mulligan, Science 260: 926–932 (1993) beschrieben.

**[0085]** Fehlererzeugende Retrovirusvektoren, die ihre eigene RNA-Sequenz in der Form von DNA in das Wirtschromosom einbauen, können gentechnisch so verändert werden, dass sie eine SEGS in die Zellen eines Wirts einbauen, wo Kopien der SEGS erstellt und in das Cytoplasma freigesetzt werden oder im Kern zurückgehalten werden, wobei sie mit den Targetnukleotidsequenzen der Hepatitis-RNA wechselwirken.

**[0086]** Knochenmarkstammzellen und Hämatopoesezellen werden bei Menschen relativ einfach entfernt und ersetzt und liefern eine sich selbst regenerierende Population von Zellen zur Fortpflanzung übertragener Gene. Derartige Zellen können in vitro oder in vivo mit Vektoren auf Retrovirusbasis mit Codierung für SEGS-Moleküle transfiziert werden. Wenn eine in-vitro-Transfektion von Stammzellen durchgeführt wird, können, sobald die transfizierten Zellen mit der Produktion der speziellen SEGS-Moleküle beginnen, die Zellen an den Patienten zurückgegeben werden, um vollständig klonale Populationen von Zellen, die SEGS exprimieren und daher gegenüber einer Virusinfektion, Transformation und anderen Erkrankungen resistent sind, zu etablieren.

**[0087]** Als Beispiel kann ein Vektor, der zur Klonierung und Expression von DNA-Sequenzen mit Codierung für Konstrukte verwendet wird, umfassen:

1. Eine Klonierungsstelle, zur Insertion einer DNA-Sequenz mit Codierung für ein zu exprimierendes SEGS-Molekül.
2. Einen (optionalen) Säugetierreplikationsstartpunkt, der eine episomale (nicht-integrative) Replikation ermöglicht, beispielsweise den vom Epstein-Barr-Virus stammenden Replikationsstartpunkt.
3. Einen in Bakterienzellen arbeitenden Replikationsstartpunkt zur Herstellung der erforderlichen Mengen der DNA mit Codierung für die SEGS-Konstrukte, beispielsweise den vom pBR322-Plasmid stammenden Replikationsstartpunkt.
4. Eine Promotor, beispielsweise den von Rous-Sarcom-Virus (RSV), Cytomegalovirus (CMV) stammenden, oder den Promotor des Säugetier-U6-Gens (ein RNA-Polymerase-III-Promotor), der die Transkription der insertierten DNA-Sequenz mit Codierung für das zu exprimierende SEGS-Konstrukt in Säugetierzellen dirigiert.
5. Einen (optionalen) Säugetierselektionsmarker, beispielsweise Neomycin- oder Hygromycinresistenz, der die Selektion von Säugetierzellen, die mit dem Konstrukt transfiziert sind, ermöglicht.
6. Einen Bakterien-Antibiotikaresistenzmarker, wie Neomycin- oder Ampicillinresistenz, der die Selektion von Bakterienzellen, die mit dem Plasmidvektor transformiert sind, ermöglicht.

**[0088]** Ein bevorzugter Vektor zur Abgabe und Expression von SEGS-Molekülen in vivo verwendet einen RNA-Polymerase-III (pol III)-Promotor zur Expression. Derartige Promotoren können Transkripte konstitutiv ohne eine für den Zelltyp spezifische Expression produzieren. Pol-III-Promotoren erzeugen auch Transkripte, die so technisch verändert werden können, dass sie im Kern der Zelle, der Position vieler Target-RNA-Moleküle, verbleiben. Vorzugsweise wird eine vollständige pol III-Transkriptionseinheit verwendet, die einen pol-III-Promotor, ein Capping-Signal und eine Terminationssequenz umfasst. Pol-III-Promotoren und andere pol-III-Transkriptionssignale sind in ein tRNA-Genen, 5S-RNA-Genen, kleinen nukleären RNA-Genen und kleinen cytoplasmatischen RNA-Genen vorhanden. Bevorzugte pol-III-Promotoren zur Verwendung in SEGS-Expressionsvektoren sind der humane kleine nukleäre U6-Genpromotor und tRNA-Genpromotoren. Die Verwendung von U6-Gentranskriptionssignalen zur Produktion kurzer RNA-Moleküle in vivo ist bei Noonberg et al., Nucleic Acids Res. 22: 2830–2836 (1995) beschrieben, und die Verwendung von tRNA-Transkriptionssignalen ist bei Thompson et al., Nucleic Acids Res., 23: 2259–2268 (1995) beschrieben.

**[0089]** Viele pol-III-Promotoren sind interne Promotoren, d. h. sie liegen in der Transkriptionseinheit. Daher umfassen diese pol-III-Transkripte Promotorsequenzen. Damit sie für die Expression von SEGS-Molekülen geeignet sind, sollten diese Promotorsequenzen nicht in die Struktur oder Funktion der SEGS eingreifen. Da SEGS-Moleküle von tRNA-Molekülen abgeleitet sind, können tRNA-Genpromotorsequenzen ohne weiteres in SEGS-Moleküle eingebaut werden. Der interne Promotor von tRNA-Genen tritt in zwei Teilen, einer A-Box und einer B-Box, auf. In tRNA-Molekülen sind Sequenzen der A-Box im Allgemeinen in der D-Schleife und einer Hälfte des D-Stamms von tRNA-Molekülen vorhanden, und Sequenzen der B-Box im Allgemeinen in der T-Schleife und den proximalen Nukleotiden im T-Stamm vorhanden. SEGS-Molekülen fehlt der größte Teil dieser Strukturen. Jedoch können Sequenzen sowohl der B-Box als auch der A-Box an das 5'-Ende der SEGS nach dem T-Erkennungsarm derart angehängt werden, dass der passende Abstand zwischen der A-Box und



der B-Box beibehalten wird.

**[0090]** Der U6-Genpromotor ist kein interner Promotor (Kunkel und Pederson, *Nucleic Acids Res.* 18: 7371–7379 (1989); Kunkel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 83: 8575–8579 (1987); Reddy et al. *J. Biol. Chem.* 262: 75–81 (1987)). Günstige pol-III-Promotorsysteme, die zur Expression von SEGS-Molekülen verwendbar sind, sind beschrieben bei Hall et al., *Cell* 29: 3–5 (1982), Nielsen et al., *Nucleic Acids Res.* 21: 3631–3636 (1993), Fowlkes und Shenk, *Cell* 22: 405–413 (1980), Gupta und Reddy, *Nucleic Acids Res.*, 19: 2073–2075 (1990), Kickoefer et al., *J. Biol. Chem.* 268: 7868–7873 (1993), und Romero und Blackburn, *Cell* 67: 343–353 (1991). Die Verwendung von pol-III-Promotoren zur Expression von Ribozymen ist auch in WO 95/23225 von Ribozyme Pharmaceuticals, Inc. beschrieben.

#### IV. Therapie

##### A. Pharmazeutische Zusammensetzungen

**[0091]** SEGS-Moleküle können in Kombination mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger zur Bildung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die zur Behandlung eines Patienten geeignet ist, direkt verwendet werden. Alternativ kann eine SEGS über einen Vektor, der eine Sequenz enthält, die das SEGS-Molekül codiert und exprimiert, der für eine spezielle RNA spezifisch ist, zugeführt werden.

**[0092]** Eine direkte Zugabe umfasst die Insertion von zuvor synthetisierten SEGS-Molekülen in die Targetzellen, üblicherweise mit der Hilfe von Lipidkomplexen (Liposomen) zur Erleichterung der Durchquerung der Zellmembran und anderen Molekülen, wie Antikörpern oder anderen kleinen Liganden, wie Häm oder einem anderen Porphyrin oder Phthalocyanin, zur Maximierung des Targeting. Porphyrine bilden mit Oligonukleotiden Komplexe, wobei ein Schutz sowie eine Verstärkung der Abgabe an Zellen, wie Hepatocyten, erfolgt. Wegen der Empfindlichkeit von RNA gegenüber einem Abbau können in vielen Fällen direkt zugeführte SEGS-Moleküle chemisch modifiziert werden, wobei sie nukleasebeständig gemacht werden, wie im Vorhergehenden beschrieben wurde. Diese Zufuhr- bzw. Abgabemethodik ermöglicht eine genauere Überwachung der therapeutischen Dosis.

**[0093]** Die vektorvermittelte Zufuhr umfasst die Infektion der Targetzellen mit einem sich selbst replizierenden oder nicht-replizierenden System, beispielsweise einem modifizierten Virusvektor oder einem Plasmid, das eine große Menge der SEGS, die in einer von dem Vektor getragenen Sequenz codiert ist, produziert. Das Targeting der Zellen und der Eintrittsmechanismus können vom Virus geliefert werden, oder es können, wenn ein Plasmid verwendet wird, Methoden verwendet werden, die ähnlich den zur direkten Zufuhr der SEGS-Moleküle beschriebenen sind. Die vektorvermittelte Zufuhr ergibt eine nachhaltige Menge von SEGS-Molekülen. Sie ist wesentlich billiger und erfordert eine weniger häufige Verabreichung als eine direkte Zufuhr, beispielsweise eine intravenöse Injektion der SEGS-Moleküle.

**[0094]** Das direkte Zufuhrverfahren kann während der akuten kritischen Stadien einer Infektion verwendet werden. Vorzugsweise wird eine intravenöse oder subkutane Injektion zur direkten Zufuhr von SEGS-Molekülen verwendet. Es ist wesentlich, dass eine wirksame Menge von Oligonukleotiden in einer Form zugeführt wird, die den Abbau des Oligonukleotids, bevor es die geplante Targetstelle erreicht, minimiert.

**[0095]** Vorzugsweise führt der pharmazeutische Träger die SEGS spezifisch betroffenen Zellen zu. Beispielsweise betrifft das Hepatitis B-Virus Leberzellen und daher führt ein bevorzugter pharmazeutischer Träger Anti-Hepatitis-SEGS-Moleküle Leberzellen zu.

**[0096]** HBV, ein Mitglied einer Gruppe von kleinen DNA enthaltenden Viren, die chronische nicht-cytopathische Infektionen der Leber verursachen, ist ein infektiöses Mittel bei Menschen, das weltweit gefunden wird und bei Menschen in einem großen Reservoir chronischer Träger beständig vorhanden ist. Es wird geschätzt, dass etwa 6–7% der Weltbevölkerung infiziert ist (300 Millionen Träger). Die Verbreitung der Infektion ist nicht gleichförmig auf der ganzen Welt. Es besteht ein geographischer Gradient der Verteilung von HBV. Sie ist am niedrigsten in Nordamerika und Westeuropa, wo der Virus in 0,1 bis 0,5% der Bevölkerung nachgewiesen werden kann, und sie ist am höchsten in Südostasien und Afrika südlich der Sahara, wo die Häufigkeit der Infektion von 5 bis 20% der Bevölkerung variieren kann. Diese schiefe Verteilung ist parallel der von Leberzellkrebs und ergibt starke epidemiologische Beweisanzeichen für eine Verbindung zwischen einer chronischen HBV-Infektion und dieser Art von Malignität.

**[0097]** Hepatitis B ist von großer medizinischer Bedeutung, da sie wahrscheinlich die häufigste Ursache einer

chronischen Lebererkrankung, die Leberzellkrebs bei Menschen umfasst, ist. Infizierte Hepatocyten scheiden kontinuierlich Viruspartikel aus, die sich im Blut zu hohen Konzentrationen ansammeln. Diese Partikel sind von zwei Arten: (i) nichtinfektiöse Partikel, die aus überschüssigem Virushüllprotein bestehen (HBsAg) und keine Nucleinsäure enthalten (in Konzentrationen von bis zu  $10^{13}$  Partikel/ml Blut), und (ii) infektiöse, DNA enthaltende Partikel (Dane-Partikel), die aus einem Nucleocapsidkern von 27 nm bestehen (HBcAg), um den eine Hülle angeordnet ist, die das Hauptvirushüllprotein, Kohlehydrat und Lipid enthält, die in geringeren Konzentrationen ( $10^9$  Partikel/ml Blut) vorhanden sind. Das humane Hepatitis-B-Virus ist ein Mitglied der Hepadna Viridae-Familie, wobei nahe Verwandte Woodchuck Hepatitisvirus (WHV), Duck Hepatitisvirus (DHV) und Ground Squirrel Hepatitisvirus (GHV) umfassen (Robinson (1990)). Wie Retroviren nutzt das Hepadnavirus die reverse Transkription von dessen 3,2 kb-DNA-Genom (Pugh (1990)). Das Genom des Hepatitis-B-Virus ist ringförmig und teilweise einzelsträngig, wobei es einen unvollständigen plus-Strang enthält. Der unvollständige plus-Strang wird in dem Virion mit einer DNA-Polymerase komplexiert, wobei gezeigt wurde, dass diese den plus-Strang unter Verwendung des vollständigen minus-Strangs als Templat verlängert. Diese morphologischen und strukturellen Merkmale unterscheiden Hepatitis-B-Viren von allen bekannten Klassen von DNA enthaltenden Viren.

**[0098]** Der Replikationszyklus von Hepatitis-B-Viren ist ebenfalls außerordentlich verschieden von anderen DNA enthaltenden Viren und legt eine enge Verwandtschaft mit den RNA enthaltenden Retroviren nahe. Das wichtigste ungewöhnliche Merkmal ist die Verwendung einer RNA-Kopie des Genoms als Zwischenelement bei der Replikation des DNA-Genoms. Infizierende DNA-Genome werden in eine Doppelstrangform umgewandelt, die als Templat zur Transkription von RNA dient. Mehrfache RNA-Transkripte werden von jedem infizierenden Genom synthetisiert, die entweder Messenger-Funktion oder DNA-Replikationsfunktion aufweisen. Die Letzteren, die als "Prägenome" bezeichnet werden, sind Vorläufer der Nachkommen-DNA-Genome, da sie zu Nucleocapsidkernen angeordnet und in DNA revers transkribiert werden, bevor sie umhüllt und aus der Zelle exportiert werden. Daher enthält jedes reife Virion eine DNA-Kopie des RNA-Prägenoms und eine DNA-Polymerase.

**[0099]** Die erste zu synthetisierende DNA besitzt minus-Strang-Polarität und wird an einer singulären Stelle auf der Virusgenkarte gestartet. Sehr kleine naszierende DNA-minus-Stränge (weniger als 30 Nukleotide) werden kovalent an ein Protein gebunden und wirken wahrscheinlich als Primer für die minus-Strang-DNA-Synthese. Das Wachstum der minus-Strang-DNR wird von einem koordinierten Abbau des Prägenoms begleitet, so dass das Produkt eher eine einzelsträngige DNA voller Länge als ein RNA:DNA-Hybrid ist. Eine plus-Strang-DNA-Synthese wurde erst nach der Fertigstellung des minus-Strangs beobachtet, und sie beginnt an einer singulären Stelle in der Nähe des 5'-Endes des minus-Strangs. Eine vollständige Länge des plus-Strangs ist keine Bedingung für die Umhüllung und den Export der Nucleocapsidkerne, daher enthalten die meisten extrazellulären Virionen unvollständige plus-Stränge und eine große einzelsträngige Lücke in ihren Genomen. Da das Genom des Hepatitisvirus autonom ist und für dessen Replikation keinen DNA-DNA-Pfad verwendet, ist die kontinuierliche intrazelluläre Replikation von dessen Genom für den Erhalt des Virus wesentlich.

**[0100]** Die Oberflächenantigene des Hepatitis-B-Virus (HBsAgs), die die Virushülle bilden, sind Polypeptide, die durch die Prä-S1-, Prä-S2- und S-Gene des Virus codiert werden. Das Hauptprotein ist das S-Genprodukt von 226 Aminosäuren, das von einer Subgenombotschaft von 2,1 kb abgeleitet ist. Wie durch das folgende Beispiel angegeben, wurden SEGs gestaltet, die eine HBV-Nucleinsäure als Ziel haben und die Replikation hemmen, was zu verminderten Viruslasten führt.

#### B. Zufuhr von SEGs-Molekülen

**[0101]** Zwei Zufuhrverfahren können verwendet werden, (1) die Zufuhr von synthetischen SEGs-Molekülen oder (2) die Zufuhr eines SEGs-Moleküle exprimierenden Vektors in transienter Weise. Das Verfahren der Wahl wird in präklinischen Untersuchungen unter Verwendung von Standardverfahren bestimmt, und sie können in Kombination verwendet werden. Beide können beispielsweise durch die Verwendung kationischer Liposomzubereitungen effizient zugeführt werden.

**[0102]** Eine Vielzahl von Nicht-Vektorverfahren steht zur Zufuhr von SEGs-Molekülen zu Zellen zur Verfügung. Beispielsweise können allgemein die SEGs-Moleküle oder die SEGs-Moleküle codierende DNA-Sequenzen in oder auf Mikropartikeln eingearbeitet werden. Die hierfür verwendeten Mikropartikel umfassen Liposome, Virosome, Mikrokügelchen und Mikrokapseln, die aus synthetischen und/oder natürlichen Polymeren gebildet sind. Verfahren zur Herstellung von Mikrokapseln und Mikrokügelchen sind einem Fachmann bekannt und sie umfassen Lösemittelverdampfung, Lösemittelguss, Sprühtrocknung und Lösemittelstreckung. Beispi-

le für verwendbare Polymere, die in verschiedene Mikropartikel eingearbeitet werden können, umfassen Polysaccharide, Polyanhydride, Polyorthoester, Polyhydroxide und Proteine und Peptide.

**[0103]** Liposome können durch Standardverfahren, beispielsweise die bei Kim et al., *Biochim., Biophys. Acta*, 728: 339–348 (1983); Liu et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1104: 95–101 (1992); und Lee et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1103: 185–197 (1992); Wang et al., *Biochem.*, 28: 9508–9514 (1989)) angegeben sind, hergestellt werden. SEGS-Moleküle oder derartige Moleküle codierende DNA können in Liposomen eingekapselt werden, wenn die Moleküle während der Herstellung der Mikropartikel vorhanden sind. Kurz gesagt, werden die in einem organischen Lösemittel gelösten Lipide der Wahl gemischt und auf den Boden eines Glasröhrchens unter Vakuum aufgetrocknet. Der Lipidfilm wird unter Verwendung einer wässrigen gepufferten Lösung der SEGS-Moleküle, von DNA mit Codierung für SEGS-Moleküle, die eingekapselt werden sollen, rehydratisiert und die gebildeten hydratisierten Lipidvesikel oder Liposome, die das Material einkapseln, können dann durch Zentrifugation gewaschen und filtriert und bei 4°C aufbewahrt werden. Dieses Verfahren wurde zur Zufuhr von Nukleinsäuremolekülen zu dem Kern und Cytoplasma von Zellen der MOLT-3-Leukämiezelllinie verwendet (Thierry und Dritschilo, *Nucl. Acids Res.*, 20: 5691–5698 (1992)). Alternativ können SEGS-Moleküle oder DNA mit Codierung für derartige Moleküle in Mikropartikeln eingebaut oder entweder ionisch oder kovalent an die Außenseite der Mikropartikel gebunden werden.

**[0104]** Kationische Liposome oder Mikrokapseln sind Mikropartikel, die besonders günstig zur Zufuhr negativ geladener Verbindungen, wie Verbindungen auf Nukleinsäurebasis, die ionisch an die positiv geladene äußere Oberfläche dieser Liposomen binden können, sind. Von verschiedenen kationischen Liposomen wurde bereits gezeigt, dass sie sehr wirksam zur Zufuhr von Nukleinsäuren oder Nukleinsäure/Proteinkomplexen zu Zellen sowohl in vitro als auch in vivo sind, wie bei Felgner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 84: 7413–7417 (1987); Felgner, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 5: 163–187 (1990); Clarenc et al., *Anti-Cancer Drug Design*, 8: 81–94 (1993) angegeben. Kationische Liposome oder Mikrokapseln können hergestellt werden, indem Gemische verwendet werden, die ein oder mehrere Lipide umfassen, die eine kationische Seitengruppe in einer derart ausreichenden Menge enthalten, dass die aus dem Gemisch gebildeten Liposome oder Mikrokapseln eine positive Nettoladung besitzen, die negativ geladene Verbindungen ionisch bindet. Beispiele für positiv geladene Lipide, die zur Herstellung kationischer Liposome verwendet werden können, umfassen das Aminolipid Dioleoylphosphatidylethanolamin (PE), das eine positiv geladene primäre Aminokopfgruppe besitzt; Phosphatidylcholin (PC), das positiv geladene Kopfgruppen besitzt, die nicht primäre Amine sind; und N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triethylammonium ("DOTMA", siehe Felgner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 84: 7413–7417 (1987); Felgner et al., *Nature*, 337: 387–388 (1989); Felgner, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 5: 163–187 (1990)).

**[0105]** Eine bevorzugte Form eines Mikropartikels zur Zufuhr von SEGS-Molekülen sind Hämtragende Mikropartikel. Bei diesen Mikropartikeln ist Häm in die äußere Oberfläche der Mikropartikel eingelagert oder kovalent mit dieser konjugiert. Hämtragende Mikropartikel bieten insofern einen Vorteil, als sie vorzugsweise von Zellen, die den Häm-Rezeptor exprimieren, wie Hepatocyten, gebunden und aufgenommen werden, wobei die für eine wirksame Dosis erforderliche Menge eines Arzneimittels oder einer anderen Verbindung signifikant verringert ist. Eine derartige zielgerichtete Zufuhr kann auch systemische Nebenwirkungen verringern, die aufgrund der Verwendung relativ hoher Arzneimittelkonzentrationen bei nicht-zielgerichteten Zufuhrverfahren auftreten können. Bevorzugte Lipide zur Bildung von Häm-tragenden Mikropartikeln sind 1,2-Dioleoyloxy-3-(trimethylammonium)propan (DOTAP) und Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE). Die Produktion und Verwendung von Hämtragenden Mikropartikeln sind in der PCT-Anmeldung WO 95/27480 von Innovir beschrieben.

**[0106]** Nukleinsäure kann auch durch kationische Liposome verkapselt oder auf diesen aufgetragen werden, die dann intravenös in einen Säuger injiziert werden können. Dieses System wurde zur Einführung von DNA in die Zellen von mehreren Geweben von ausgewachsenen Mäusen, die das Endothel und Knochenmark, wo sich Hämatopoesezellen befinden, umfassen, verwendet (siehe beispielsweise Zhu et al., *Science*, 261: 209–211 (1993)).

**[0107]** Liposome, die entweder SEGS-Moleküle oder diese Moleküle codierende DNA enthalten, können systemisch, beispielsweise durch intravenöse oder intraperitoneale Verabreichung, in einer zur Zufuhr der Anti-Hepatitis-SEGS-Moleküle zu Zielzellen wirksamen Menge verabreicht werden. Andere mögliche Wege umfassen einen transdermalen oder oralen Weg bei einer Verwendung in Verbindung mit passenden Mikropartikeln. Im Allgemeinen ist die Gesamtmenge der Liposom-assoziierten Nukleinsäure, die einem Individuum verabreicht wird, geringer als die Menge der nicht-assoziierten Nukleinsäure, die für die gleiche gewünschte oder geplante Wirkung verabreicht werden muss.

**[0108]** Ein weiteres verwendbares Zufuhrsystem ist ein Komplex der SEGS mit einem kationischen Porphyrin, der die SEGS nach der Injektion schützt sowie diese auf Hepatocyten als Ziel ausrichtet. Das System ist äußerst einfach, da die zwei Hauptkomponenten ein Porphyrin mit einer positiven Nettogesamtladung und die zuzuführende SEGS, die eine negative Nettogesamtladung aufweist, sind. Das Porphyrin bindet an die zuzuführende SEGS und richtet die Verbindung selektiv auf Zellen als Ziel aus, die vorzugsweise das Porphyrin binden.

**[0109]** Zusammensetzungen, die verschiedenen Polymere, wie die Polymilchsäure- und Polyglykolsäure-Copolymere, Polyethylen und Polyorthoester und die Anti-Hepatitis-SEGS-Moleküle oder DNA mit Codierung für derartige Moleküle umfassen, können unter Verwendung eines Katheters oder einer Spritze lokal den passenden Zellen zugeführt werden. Andere Mittel der lokalen Zufuhr derartiger Zusammensetzungen zu Zellen umfassen die Verwendung von Infusionspumpen (beispielsweise von Alza Corporation, Palo Alto, Kalifornien) oder den Einbau der Zusammensetzungen in Polymerimplantate (siehe beispielsweise Johnson und Lloyd-Jones, Hrsg., Drug Delivery Systems (Chichester, England: Ellis Horwood Ltd., 1987), die eine nachhaltige Freisetzung der therapeutischen Anti-Hepatitis-SEGS-Zusammensetzungen auf den unmittelbaren Bereich des Implantats bewirken können.

**[0110]** SEGS können auch topisch, beispielsweise zur Behandlung von Psoriasis oder ophthalmologischen Erkrankungen, in einem geeigneten topischen Träger, wie einem Einreibemittel, einer Salbe, einer gepufferten Kochsalzlösung, oder einem anderen pharmazeutisch akzeptablen topischen oder ophthalmologischen Träger appliziert werden.

**[0111]** Die folgenden Beispiele sind zum Zwecke der Erläuterung und als weitere Richtlinie angegeben.

#### Beispiele

Beispiel 1: Oligonukleotidsynthese, Plasmide und Transkriptionsreaktionen zur Konstruktion und Analyse von SEGS-Molekülen

**[0112]** Oligonukleotide: Oligoribonukleotide (RNA) wurden gemäß dem Verfahren von Ogilvie et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85: 5764–5768 (1988), unter Verwendung von 5'-Dimethoxytrityl-2'-methylsilyl-ribonukleosid-3'-CE-phosphoramiditen (Biosearch, MA oder ChemGenes Corp., MA) hergestellt. 2'-O-Methyl-oligoribonukleotide (2'-O-Methyl-RNA) wurden unter Verwendung von RNA-Syntheseprotokollen von synthetisiert und Amidite wurden von entweder Biosearch oder Glen Research gekauft. Die Synthesen wurden auf einem Millipore 8909 Expedite DNA/RNA Synthesizer durchgeführt. Controlled Pore Glass (CPG) wurde als feste Trägermatrix verwendet. Die Kopplungsdauer betrug etwa 13 min. Für die Synthesen von Analoga, die Phosphorothioatverknüpfungen enthalten, wurde die Oxidation durch Sulfurierung ersetzt, die unter Verwendung von Beaucage-Reagens während 10 bis 15 min durchgeführt wurde. Die durchschnittliche Kopplung ergab, was durch Tritylmessung getestet wurde, (96–98%).

**[0113]** Die Abspaltung vom Träger, das Entschützen von Base und Phosphat und das Entfernen der 2'-O-TB-DMS-Gruppe wurde gemäß der Beschreibung von Scaringe et al., Nucleic Acids Research, 18: 5433–5441 (1990) durchgeführt. Die rohen Oligonukleotide in TBAF-Lösung wurden auf einer Sephadex-G-25-Säule entsalzt, bevor eine standardmäßige elektrophoretische Reinigung unter Verwendung von 15–20% Polyacrylamid/7 M Harnstoff-Gelen durchgeführt wurde. Produktbanden wurden durch UV-Beleuchtung sichtbar gemacht, ausgeschnitten und aus der Gelmatrix eluiert. Die eluierten Oligomere wurden schließlich auf einer C<sub>18</sub>-Sep-Pak-Patrone entsalzt und durch OD<sub>260</sub>-Messung quantitativ bestimmt. Die Homogenität der gereinigten Analoga wurde durch 5'-Endmarkierung oder analytische HPLC geprüft. Sie können ferner durch Analyse der Basenzusammensetzung gemäß der Beschreibung bei Seela und Kaiser, Nucleic Acids Res., 15: 3113–3129 (1987) gekennzeichnet werden, und der Gehalt an Thioatverknüpfungen kann quantitativ durch <sup>31</sup>P-NMR bestimmt werden. Terminale Modifikationen des 3'-Endes erfolgten durch Starten der Synthese ausgehend von einem modifizierten CPG-Träger, der eine Aminogruppe enthielt.

**[0114]** RNase P-Spaltungstests: Die Spaltungsreaktionen wurde allgemein gemäß dem bei Yuan et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89: 8006–8010 (1992) beschriebenen Verfahren durchgeführt. Kurz gesagt, wurden kurze Substratreaktionsgemische auf ein Gesamtvolumen von 31 µl in 50 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl, 0,1 mM EDTA mit einer SEGS-Konzentration von 200–400 nM und einer Targetmolekülkonzentration von 50 nM oder weniger gebracht. Die Reaktionsgemische wurden 1 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Reaktionslösung mit Beladungspuffer (98% Formamid, 10 mM EDTA, 0,025% Bromphenolblau) gemischt. Das gespaltene Substrat wurde von den nicht-gespaltenen durch Elektrophorese auf

einem 15%-Acrylamidgel, das 7 M Harnstoff enthält, abgetrennt. Die Banden wurden auf einem Molecular Dynamics Phosphorimager quantitativ bestimmt.

**[0115]** Die Banden, die dem RNA-Substrat und den gebildeten zwei Spaltprodukten entsprachen, wurden ausgehend von dem getrockneten Gel unter Verwendung eines Betascope Gel Analyzer (Betagen) gezählt.

**[0116]** RNase P wurde durch DEAE-Sephrose-Chromatographie und Glycerin-Dichtegradientenzentrifugation im Wesentlichen gemäß der Beschreibung bei Bartkiewicz et al., Genes Dev., 3: 488–499 (1989) gereinigt.

**[0117]** Zum Testen der Spaltung mit längeren Target-RNA-Molekülen, die durch Transkription erzeugt wurden, wurden unterschiedliche Reaktionsbedingungen verwendet. Die Reaktionsgemische in einem Gesamtvolumen von 10 µl enthielten 40 mM Tris-HCl (pH-Wert 7,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Spermidin, 10 mM Dithiothreitol, 0,05 µg/µl nukleasefreies Rinderserumalbumin, 0,01% (V/V) Triton-X100, 0,8 Einheiten/µl RNASIN, 0,2 mM ATP, 0,2 mM GTP, 0,2 mM UTP, 0,2 mM CTP, 0,1 µCi/µl [<sup>32</sup>P]-CTP, 2 mM m<sup>7</sup>G(5')pppG, 0,06 µg/µl Hefe-RNA, 25 mM KCl, 3 Einheiten T7-RNA-Polymerase, 250 nM SEGS, 1 µl humane RNase P und 3 ng/µl linearisiertes Plasmid. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von linearisiertem Plasmid gestartet und es wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von 10 µl von 80% Formamid, 10 mM EDTA, 0,1% Bromphenolblau beendet. Nach 2-minütigem Erhitzen auf 90°C wurden die Proben 2 h mit 48 Watt auf einem 5%-Denaturierungspolyacrylamidgel einer Elektrophorese unterzogen. Nach dem Vakuumtrocknen während 1 h bei 60°C wurde das Gel durch Phosphorimaging analysiert.

**[0118]** Der Prozentsatz des RNA-Substrats, der in jedem Test zurückblieb, wurde als Funktion der SEGS-Konzentration aufgetragen, und die katalytische Wirksamkeit wurde als  $k_{cat}/K_m$  (wobei  $k_{cat}$  die Geschwindigkeitskonstante der Spaltung ist und  $K_m$  die Michaelis-Konstante ist), die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung für die Reaktion von freiem SEGS und Substrat, ausgedrückt. Gemäß den Verfahren von Heidenreich und Eckstein (J. Biol. Chem., 267: 1904–1909 (1992)) wurde die Wirksamkeit der Spaltungsreaktion ( $k_{cat}/K_m$ ) unter Verwendung der Formel

$$-\ln F/T = (k_{cat}/K_m)[C]$$

worin F den Bruchteil des verbliebenen RNA-Substrats bedeutet, t die Reaktionsdauer bedeutet und [C] die SEGS-Konzentration bedeutet, bestimmt.

**[0119]** Stabilitätstests in fetalem Kalbsserum: Die Nukleasebeständigkeit von modifizierten SEGS-Molekülen kann in einem Fetal Calf Serum (FCS) Assay getestet werden. Von Shaw et al., Nucleic Acids Res. 19: 747–750 (1991), wurde berichtet, dass 10%iges FCS, wenn es hitzeinaktiviert wurde, humanes Serum ziemlich stark imitiert. Die Testbedingungen sind sehr ähnlich den früher von Hoke et al., Nucleic Acids Res., 19: 5743–5748 (1991), beschriebenen. Kurz gesagt, wird ein zu testendes SEGS-Analogon mit T4-Polynukleotidkinase und [<sup>35</sup>S]-ATP 5'-endmarkiert (dieses Verfahren kann radioaktiv markierte Oligonukleotide erzeugen, die gegen Dephosphorylierung beständig sind). Die markierte SEGS wird dann durch Phenol Chloroform-Extraktion und anschließende Sephadex G-25-Spinaulnfiltration gereinigt.

**[0120]** Die gereinigte SEGS wird mit kalter SEGS und 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kalbsserum (FCS) so gemischt, dass die Endkonzentration der SEGS etwa 5 µM beträgt. SEGS-Analoga werden über einen Zeitraum von 24 h behandelt. Aliquots werden zu verschiedenen Zeitpunkten aus dem Reaktionsgemisch entnommen, mit 2 × Beladungsfarbstoff gemischt, bei 90°C 3 min hitzeinaktiviert und dann bei –20°C aufbewahrt. Die Ergebnisse werden auf 12% Polyacrylamid/7 M Harnstoff-Gelen analysiert.

#### Beispiel 2: Aktivität von SEGS-Molekülen hinsichtlich der Förderung der RNase P-Spaltung

**[0121]** Nach RNA modellierte SEGS-Konstrukte: Die Aktivitäten von SEGS und Modell-Target-RNA-Molekülen mit verschiedenen Sequenzen und Strukturen, die nach tRNA-Sequenzen modelliert wurden, wurden getestet. Die Aktivitäten wurden in Form des Prozentsatzes des Substrats, der in 1 h gespalten wurde, gemäß der Beschreibung in Beispiel 1 ermittelt. Ein Vergleich wurde zwischen einer SEGS mit T-Schleifensequenzen, die an dem T-Erkennungsarm angefügt waren (SEGS 3; SEQ ID NO: 1; siehe [Fig. 2](#)) und einer SEGS ohne irgendeine angefügte Sequenz (SEGS 7; Nukleotide 4–15 von SEQ ID NO: 1; siehe [Fig. 5](#)) durchgeführt. Dies erfolgte zum Teil deshalb, um zu testen, ob T-Schleifensequenzen außer dem URN-Motiv die Förderung der RNase P-vermittelten Spaltung in einer SEGS beeinflussen. Die verwendeten SEGS-Moleküle sind in [Fig. 5](#) angegeben. Die SEGS mit 15 Nukleotiden besitzt eine angefügte T-Schleifensequenz und die SEGS mit 12

Nukleotiden tut dies nicht. Die Aktivitäten dieser zwei SEGS hinsichtlich der Förderung der Spaltung eines Modells substrats (T 10, auch in [Fig. 2](#) und [Fig. 5](#) angegeben) sind in den Reihen 1 und 2 in Tabelle 1 angegeben. Es ist klar, dass die angefügten Nukleotide keine signifikante Wirkung auf die Spaltungsaktivität besitzen. Die erste Spalte in Tabelle 1 zeigt die Sequenz der Windungsregion und im Falle dieser Beispiele eine kurze Schwanzsequenz, die aus fünf oder sechs Adeninnukleotiden besteht. Dies wird durch (A) für die Targets mit sechs Adeninnukleotiden und durch (A)\* für die Targets mit fünf Adeninnukleotiden angegeben.

Tabelle 1: Spaltungsaktivität verschiedener Windungsregionsequenzen

Windungsregion-sequenz	%-Spaltung	SEGS + Target	Bemerkungen
UUCG (A)	96	EGS 7 + T 10	12 nt SEGS
UUCG (A)	91	EGS 3 + T 10	15 nt SEGS
UUCA (A)*	96	EGS 3 + T 11	15 nt SEGS
UCCG (A)	12	EGS 3 + T 12	15 nt SEGS
UCGA (A)*	55	EGS 3 + T 13	15 nt SEGS
UUUG (A)	19	EGS 3 + T 14	15 nt SEGS
CUCG (A)	51	EGS 3 + T 15	15 nt SEGS
UUCG (A)	45	EGS 6 + T 16	der Spaltungsstelle benachbartes G-C-Paar in C-G-Paar geändert
CUGA (A)	26	EGS 7 + T 24	12 nt SEGS
GAAA (A)	0	EGS 7 + T 25	12 nt SEGS
GAGA (A)	2	EGS 7 + T 26	12 nt SEGS
GUGA (A)	21	EGS 7 + T 27	12 nt SEGS
UACG (A)	16	EGS 7 + T 28	12 nt SEGS
AUCA (A)	34	EGS 7 + T 29	12 nt SEGS
AUCG (A)	25	EGS 7 + T 30	12 nt SEGS
AUCU (A)	0	EGS 7 + T 31	12 nt SEGS
UUCG (A)	49	EGS 7m + T 10	alle 2'-O-Methyl
UUCA (A)*	60	EGS 7m + T 11	alle 2'-O-Methyl

**[0122]** Wirkung der Sequenz in der Windungsregion und an der Spaltungsstelle auf die SEGS-Aktivität: Verschiedene Modell-Target-RNA-Moleküle, die sich nur hinsichtlich der Sequenz der Windungsregion unterscheiden, wurden gestaltet. Die Substrate besitzen die gleiche Nukleotidsequenz wie die Target-RNA T 10 (SEQ ID NO: 2) mit Ausnahme der Windungsregion (Nukleotide 33–36 von SEQ ID NO: 2). Die Sequenz in der Windungsregion für jedes Substrat ist in Tabelle 1 aufgelistet. Die Aktivität wurde unter Verwendung von EGS 3 (SEQ ID NO: 1) oder EGS 7 (Nukleotide 4 bis 15 von SEQ ID NO: 1) getestet. Die Tests wurden wie im Vorhergehenden beschrieben mit 50 nM Target-RNA, 400 nM SEGS und 3 µl RNase P durchgeführt. Die Aktivität dieser SEGS ist in den Reihen 2–7 und 9–18 in Tabelle 1 angegeben. Nahezu alle Varianten werden in einem signifikanten Ausmaß aktiv gespalten. Bei diesen Beispielen sind spezielle Sequenzen weniger günstig als an-



dere, beispielsweise GAAA und AUCU. Diese Ergebnisse bestätigen, dass SEGS für Targetsequenzen mit einem breiten Bereich von Sequenzen 3' der zweiten Targetregion gestaltet werden können.

**[0123]** Das Nukleotid am 3'-Ende des A-Erkennungsarms (das an dem der Spaltungsstelle benachbarten Basenpaar beteiligt ist) von SEGS EGS 3 wurde von einem Cytidinnukleotid zu einem Guaninnukleotid geändert. Die Target-RNA-Sequenz wurde entsprechend geändert. Die Aktivität der gebildeten SEGS (EGS 6) ist in Reihe 8 von Tabelle 1 gezeigt. Diese Aktivität (45% Spaltung) ist zwar niedriger als die SEGS mit einem Cytidinnukleotid (Reihe zwei in Tabelle 1), jedoch immer noch signifikant. Dies zeigt, dass ein Cytidinnukleotid am 3'-Ende des A-Erkennungsarms zwar bevorzugt ist, jedoch nicht erforderlich ist. Obwohl die variierten Sequenzen der Windungsregion und des 3'-Ende die Aktivität der SEGS beeinflussten, besaßen alle eine messbare und verwendbare Aktivität.

**[0124]** Wirkung chemischer Modifikationen auf die SEGS-Aktivität: 2'-O-Methyl-Oligoribonukleotide besitzen mehrere günstige Merkmale als logische Wahl einer Modifizierung. Die Synthese dieser Analoga ist sehr ähnlich der der DNA-Synthese. Sie besitzen eine viel bessere Bindungsaffinität zu einem RNA-Target als DNA-Analoga, und die gebildeten Doppelhelix besitzen eine Struktur zwischen der einer RNA-RNA-Doppelhelix (A-Form) und einer DNA-DNA-Doppelhelix (B-Form). Außerdem erweisen sie sich als ziemlich beständig gegenüber einem Abbau durch entweder RNA- oder DNA-spezifische Nukleasen. 2'-O-Methyl-Oligoribonukleotid-SEGS wurden nach EGS 7 (Nukleotide 4–15 von SEQ ID NO: 1) modelliert gebildet. Die Aktivitäten dieser chemisch modifizierten SEGS mit zwei Substraten sind in Reihe 19 und 20 in Tabelle 1 angegeben. Diese Aktivitäten sind zwar niedriger als die mit unmodifizierten SEGS erhaltenen Aktivitäten (man vergleiche mit Reihe 1 und 3 in Tabelle 1), jedoch immer noch signifikant. Dies zeigt, dass eine SEGS alle Nukleotide chemisch modifiziert aufweisen und dennoch signifikante Aktivität behalten kann.

**[0125]** Wirkungen der Länge der Erkennungsarme und der Ausbuchtungsregion auf die SEGS-Aktivität: Zur Bestimmung der Wirkungen der Länge der Erkennungsarme und der Ausbuchtungsregion wurden verschiedene SEGS und Modell-Target-RNAs mit unterschiedlichen Kombinationen von Längen für diese Regionen konstruiert. Die Substrate wurden nach der Target-RNA T 10 modelliert. Die SEGS-Moleküle wurden nach der EGS 7 modelliert. Die Tests wurden wie im Vorhergehenden beschrieben mit 33 nM Target-RNA, 333 nM SEGS und 3 µl RNase P durchgeführt. Die getesteten Längenkombinationen und die beobachtete Aktivität sind in Tabelle 2 angegeben. Die Ausgangslängen, an denen Veränderungen durchgeführt wurden, waren ein A-Stamm von 7 Basenpaaren, ein T-Stamm von 5 Basenpaaren und eine Ausbuchtungsregion von 9 Nukleotiden. Diese Kombination besitzt eine hohe Aktivität (siehe Reihe 1 in Tabelle 2).

Tabelle 2. Spaltungsaktivität verschiedener Konstrukte

Basenpaare in A-Stamm	Basenpaare in T-Stamm	Nukleotide in der Ausbuchtung	% Spaltung	Konstrukt
7	5	9	92	T 10 + EGS 7
8	5	9	91	T 10 + EGS 9
9	5	9	36	T 10 + EGS 10
10	5	9	10	T 10 + EGS 11
7	6	9	93	T 17 + EGS 8
7	7	9	10	T 18 + EGS 5
8	6	9	23	T 17 + EGS 12
7	5	7	95	T 19 + EGS 7
7	5	11	92	T 20 + EGS 7
7	5	13	95	T 21 + EGS 7
7	5	15	92	T 22 + EGS 7

**[0126]** Die erste Gruppe von Reihen in Tabelle 2 (Reihe eins bis vier) zeigt Ergebnisse mit A-Stammlängen von 7, 8, 9 und 10 Basenpaaren. Alle sind aktiv, obwohl die SEGS mit 10 Nukleotiden im A-Erkennungsarm weniger aktiv ist. Dies zeigt, dass ein A-Erkennungsarm von 7, 8 oder 9 Nukleotiden bevorzugt ist. Die zweite Gruppe von Reihen in Tabelle 2 (Reihe 5 bis 7) zeigt Ergebnisse mit T-Stammlängen von 6 und 7 Basenpaaren. Die Reihe 7 kombiniert einen A-Stamm mit 8 Basenpaaren mit einem T-Stamm mit 6 Basenpaaren. Alle sind aktiv, obwohl die SEGS mit 7 Nukleotiden im T-Erkennungsarm weniger aktiv ist. Dies zeigt, dass ein T-Erkennungsarm von 5 oder 6 Nukleotiden bevorzugt ist. Die dritte Gruppe von Reihen in Tabelle 2 (Reihe 8 bis 11) zeigt Ergebnisse mit Ausbuchtungsregionlängen von 7 bis 15 Nukleotiden. Alle diese Konstrukte sind hochaktiv. Dies zeigt, dass die Länge der Ausbuchtungsregion keine signifikante Determinante der SEGS-Aktivität ist. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass ein A-Erkennungsarm von 7 Nukleotiden und ein T-Erkennungsarm von 5 Nukleotiden am stärksten bevorzugt sind. Diese Änderungen beeinflussen zwar die Aktivität der SEGS, doch haben die meisten Änderungen eine geringe Wirkung und alle SEGS besaßen eine messbare und verwendbare Aktivität.

**[0127]** Vergleich der SEGS-Aktivität und Aktivität von RNase P-Substraten: Die Spaltungsaktivitäten von minimalen RNase P-Substraten, die SEGS/Target-RNA-Komplexen ähnliche Strukturen bilden, wurden mit der Aktivität von SEGS-Molekülen verglichen. RNase P-Substrate sind Einzelnukleotidmoleküle, die sowohl die RNase P-Spaltungsstelle als auch eine Leitsequenz enthalten. Im Gegensatz zu SEGS/Target-RNA-Komplexen besitzen RNase P-Substrate eine intakte T-Schleife. [Fig. 12](#) und [Fig. 13](#) zeigen ein minimales RNase P-Substrat bzw. einen SEGS/Target-RNA-Komplex. Beide sind nach der Sequenz von tRNA<sup>Tyr</sup> modelliert. In Tests der RNase P-Aktivität gemäß der Beschreibung in Beispiel 1 wurde das RNase P-Substrat in einer Stunde zu 99% gespalten und die SEGS förderte die Spaltung von 95% der Target-RNA.

**[0128]** RNase P-Substrate und SEGS/Target-RNA-Paare wurden auch nach HBV-Sequenzen modelliert. [Fig. 3](#) und [Fig. 6](#) zeigen Beispiele für ein derartiges SEGS/Target-RNA-Paar bzw. eine RNase P-Substrat. In Tests der RNase P-Aktivität gemäß der Beschreibung in Beispiel 1 wurde das RNase P-Substrat in einer Stunde zu 80% gespalten und die SEGS förderte die Spaltung von 65% der Target-RNA. Diese Ergebnisse zeigen, dass SEGS/Target-RNA-Komplexe einen signifikanten Bruchteil der Aktivität, die in eine T-Schleife enthaltenen RNase P-Substraten vorhanden ist, auch im Falle von SEGS, die nach beliebigen Sequenzen modelliert sind, beibehalten.

Beispiel 3: Konstruktion und Aktivität von SEGS-Molekülen, die die RNase P-Spaltung von HBsAg-RNA fördern.

**[0129]** SEGS-Moleküle wurden so gestaltet, dass sie eine Spaltung durch RNase P in RNA mit Codierung für HBsAg fördern. In Gegenwart des Targets bildeten die SEGS-Moleküle eine dem A-Stamm und T-Stamm von tRNA ähnliche Struktur, die die Spaltung durch RNase P auslöste.

**[0130]** SEGS-Konstrukte mit Zielrichtung auf HBsAg: Die SEGS-Sequenzen HBV B (SEQ ID NO: 6), HBV C (SEQ ID NO: 8), HBV F1 (SEQ ID NO: 10), HBV H (SEQ ID NO: 12) und HBV H1 (SEQ ID NO: 14) wurden so gestaltet, dass sie auf Regionen von RNA mit Codierung für das Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) zielgerichtet waren. Die Regionen wurden, wie früher beschrieben durch Identifizieren der Position von UNR-Motiven in HBsAg codierender RNA gewählt. Wie in [Fig. 7](#) gezeigt, ist die Sequenz von einem der Erkennungsarme (der A-Erkennungsarm; Nukleotide 6–13 von SEQ ID NO: 6) von SEGS HBV B zu acht Nukleotiden in der Sequenz mit Codierung für HBsAg (Nukleotide 13–20 von SEQ ID NO: 7; Nukleotide 387–394 des 2,1-kb-HBV-Transkripts) komplementär. Die Sequenz des anderen Erkennungsarms (der T-Erkennungsarm; Nukleotide 1–5 von SEQ ID NO: 6) von SEGS HBV B ist zu 5 Nukleotiden in der Sequenz mit Codierung für HBsAg (Nukleotide 30 – 34 von SEQ ID NO: 7; Nukleotide 404–408 des 2,1-kb-HBV-Transkripts) komplementär. Daher enthält die Targetsequenz zwei Regionen (die erste und zweite Targetregion), die zu den zwei Erkennungsarmen der SEGS komplementär sind, die durch 9 nicht-gepaarte Nukleotide (die Ausbuchtungsregion) getrennt sind.

**[0131]** 2'-O-Methyl enthaltende SEGS-Moleküle: Die auf HBV zielgerichteten SEGS-Moleküle wurden so hergestellt, dass sie 2'-O-Methyl-Nukleotide enthielten. Diese Oligonukleotide wurden in einem automatisierten Oligonukleotidsynthesizer, wie bereits beschrieben, hergestellt, wobei die Nukleotidreagenzien jedoch eine 2'-O-Methylgruppe enthielten. Die durchschnittliche Kopplungsausbeute, die durch Tritylmessungen getestet wurde, lag im Bereich von 96–98%. Nach der Beendigung des Entschützens wurden vollständig entschützte Oligonukleotide durch denaturierende Gelelektrophorese gereinigt und ihre Reinheit durch 5'-Endmarkierung, analytische HPLC, Analyse der Basenzusammensetzung und <sup>31</sup>P-NMR festgestellt.

**[0132]** Spaltung von großer Target-RNA, die durch SEGS gefördert wird: Die für HBV-RNA-Sequenzen spezifischen SEGS wurden unter Verwendung der in Beispiel 1 beschriebenen RNase P-Spaltungstests getestet, um die Wirksamkeit der Spaltungsreaktion zu bestimmen. Hierfür wurde das Plasmid pAYW2.1, das die Sequenz enthält, die für die 2,1-kb-RNA des AYW-Stamms von HBV codiert, durch Verdauen mit Not I linearisiert und dann durch T7-RNA-Polymerase in Gegenwart von [<sup>32</sup>P]CTP transkribiert. Markierte Transkripte wurden 30 min bei 37°C mit RNase P in Gegenwart verschiedener SEGS-Moleküle inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden einer denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese unterzogen und durch Phosphoimaging analysiert. Jede der für HBV-RNA spezifischen SEGS, die oben beschrieben wurden, ergab eine sichtbare Spaltungsbande auf dem Gelbild. Dies zeigt, dass SEGS, die für willkürliche Targetsequenzen in großen, natürlich vorkommenden Target-RNA-Molekülen gestaltet sind, funktionsfähig sind.

#### Beispiel 4: In-vivo-Wirksamkeit von Kurzen Externen Leitsequenzen

**[0133]** Dieses Beispiel zeigt, dass bei einer Verabreichung in vivo eine kurze externe Leitsequenz funktionsfähig ist und signifikante messbare Wirkungen auf Marker einer Target-RNA hat. Die SEGS HBV B wurde in dieser Untersuchung verwendet. Diese SEGS induzierte die Spaltung von HBV-HBsAg-mRNA in Gegenwart einer gereinigten RNase P (siehe Beispiel 3).

**[0134]** Zur in-vivo-Verabreichung wurde die SEGS HBV B allein (frei) oder ionisch an ein Porphyrin komplexiert verwendet. Speziell wurde die SEGS mit entweder Tetra-meso-(n-methyl-4-pyridyl)porphin (TMP) oder meso-Tetra-(trimethylanilinium)porphin (TMA oder Anlinium) komplexiert.

**[0135]** Die komplexierte oder freie EGS wurde in transgene Mäuse injiziert, die vollständig zusammengebaute HBV-Viruspartikel exprimieren (Guidotti et al., J. Virol. 69: 6158–6169 (1995)). Diese Mäuse unterstützen die Replikation von HBV in der Leber und produzieren alle Marker einer Virusreplikation. 5 mg/kg Körpergewicht von SEGS HBV B wurden über die Schwanzvene der Maus pro Tag während 5 Tagen injiziert. Die Tiere wurden am 6. Tag getötet und die im Folgenden angegebenen Marker einer Virusreplikation wurden analysiert.

A. Die im Blut der Tiere vorhandene Konzentration von DNA in HBV-Virionen wurde durch einen Standard-Dot-Blot-Test (Guidotti, et al.) bestimmt. Die Konzentration von Virus-DNA im Blut ist ein direkter Index des Virustiters.

B. Die Virus-DNA in der Leber wurde durch eine Standard-Southern-Blot-Analyse bestimmt. Dies ist ein di-

rekter Index der Replikation des Virus in der Leber.

C. Die Konzentration von Viruskernpartikeln in Lebergewebeschnitten wurde durch Immunocytochemie bestimmt. Die reverse Transkription von HBV-RNA, die ein integraler Teil des Replikationsprozesses des Virus ist, findet in den Kernpartikeln statt. Daher ist eine Verringerung der Kernpartikel ein weiterer Index der Zunahme der Replikation des Virus.

D. Die Serumalanin-Aminotransferase (ALT) wurde ermittelt, um jede Möglichkeit einer Toxizität aufgrund der Verabreichung des Arzneimittels auszuschließen. Eine Leberschädigung verursacht eine Erhöhung der Spiegel von Serum-ALT.

**[0136]** Die Ergebnisse dieser Messungen (Tabelle 3) zeigen, dass SEGS-Moleküle tatsächlich eine Wirkung hinsichtlich der Verringerung der HBV-Replikation in vivo besitzen, was durch die Verringerung von Virus-DNA im Blut, Virus-DNA-Replikationszwischenprodukten und Kernpartikeln in der Leber ersichtlich ist. Es ist insbesondere anzumerken, dass die HBV-Marker ungeachtet dessen, ob die SEGS mit einem Porphyrinträger komplexiert war oder nicht, verringert waren. Dies zeigt, dass die in-vivo-Aktivität einer SEGS keine besondere oder spezialisierte Art und Weise der Verabreichung erfordert. Es ist auch anzumerken, dass die Serum-ALT bei allen Behandlungen stabil bleibt, was anzeigt, dass durch die Verabreichung der SEGS keine signifikante Leberschädigung verursacht wird. Es wurde früher gezeigt, dass eine Verabreichung von TMP allein während 10 Tagen mit 5 mg/kg Körpergewicht an ähnliche Mäuse über die Schwanzvene keine Wirkung auf die HBV-Replikation hatte, wodurch bestätigt wird, dass die beobachtete antivirale Wirkung nicht auf TMP beruht.

Tabelle 3

Gruppen (4 Mäuse/ Gruppe)	Virus-DNA (Blut)  % der Kontrolle	DNA- Replikations- zwischen- produkte (Leber)  % der Kontrolle	Kern- partikel (Leber)  relative Punkte- zahl	Serum-ALT
Kochsalz- kontrolle	100	100	+++++	normal
nur SEGS	17	52	++	normal
SEGS + TMP	32	59	++	normal
SEGS + Anilinium	nicht nachweis- bar	30	+	normal

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

- (i) ANMELDER: Innovir Laboratories, Inc.
- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Kurze Externe Leitsequenzen
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 15
- (iv) KORRESPONDENZADRESSE:
  - (A) NAME: Patrea L. Pabst
  - (B) STRASSE: 2800 One Atlantic Center  
1201 West Peachtree Street
  - (C) ORT: Atlanta
  - (D) STAAT: Georgia
  - (E) LAND: USA
  - (F) ZIP: 30309-3450
- (v) COMPUTERLESBARE FASSUNG:
  - (A) DATENTRÄGER: Diskette
  - (B) COMPUTER: IBM-PC-kompatibel
  - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
  - (D) SOFTWARE: PatentIn Release 1.0, Version 1.25
- (vi) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:
  - (A) ANMELDENUMMER:
  - (B) ANMELDETAG:
  - (C) KLASSIFIKATION:
- (vii) DATEN DER VORANMELDUNG:
  - (A) ANMELDENUMMER: 08/615 961
  - (B) ANMELDETAG: 14. März 1996
  - (C) KLASSIFIKATION:
- (viii) ANGABEN ZU ANWALT/VERTRETER:
  - (A) NAME: Pabst, Patrea L.
  - (B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 31 284
  - (C) REFERENZ/AKTENZEICHEN: ILI115
- (ix) TELEKOMMUNIKATIONSANGABEN:
  - (A) TELEFON: (404) 873-8794
  - (B) TELEFAX: (404) 873-8795

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 15 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: RNA
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

AAUCCUUCCC CCACC

15

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 43 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: RNA
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GCACGGAAUU CGGUGGGGCC AGCUCCUGAA GGUUCGAAAA AAA

43

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 15 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: RNA
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

AAUCCACUGC ACUAG

15



## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 43 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: RNA
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

GGCUCAGUUU ACUAGUGCCA UUUGUUCAGU GGUUCGAAAA AAA

43

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 51 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: RNA
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GGCUCAGUUU ACUAGUGCCA UUUGUUCAGU GGUUCGAAUC CACUGCACUA G

51

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 13 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: RNA
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

GAGGAAACGC CGC

13

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 50 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: RNA
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

CUGGAUGUGU CUGCGGCGUU UUAUCAUCUU CCUCUUCAUC CUGCUGCUAU 50

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 13 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: RNA
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

GGUUUGGGGA UAC

13

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 56 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: RNA
- (iii) HYPOTHETISCH: nein

- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

AGGAACCUCU AUGUAUCCCU CCUGUUGCUG UACCAAACCU UCGGACGGAA  
AUUGCA

56

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 13 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: RNA
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

CCACUGAUGG CAC

13

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 46 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: RNA
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

CUCAGUUUAC UAGUGCCAUU UGUUCAGUGG UUCGUAGGGC UUUCCC

46

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 13 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang

- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: RNA
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

GCGAAGGUCC GGC

13

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 48 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: RNA
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

GCCUUCUCAU CUGCCGGACC GUGUGCACUU CGCUUCACCU CUGCACGU

48

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 13 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: RNA
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

GCGAAGACGG UCC

13

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 51 Basenpaare

- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: RNA
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

GCACGGAAU CGGUGGGGCC AGCUCCUGAA GGUUCGAAUC CUUCCCCAC C 51

### Patentansprüche

1. Oligonukleotidmolekül, das die folgenden Bestandteile umfasst:  
eine Erkennungssequenz, die komplementär zu Regionen einer Zielsequenz in einem viralen Target-RNA-Molekül ist, wobei die Erkennungssequenz einen ersten Bindungsbereich und einen zweiten Bindungsbereich umfasst und die Zielsequenz in 5'- zu 3'-Richtung eine erste Targetregion, eine Ausbuchtungsregion und eine zweite Targetregion umfasst, wobei der erste Bindungsbereich komplementär zur ersten Targetregion ist und eine Länge von sieben bis neun Nukleotiden aufweist, der zweite Bindungsbereich komplementär zur zweiten Targetregion ist und eine Länge von fünf bis sieben Nukleotiden aufweist und der zweite Bindungsbereich sich 5' von dem und benachbart zu dem ersten Bindungsbereich in dem Oligonukleotid befindet und bei Bindung an das Target-RNA-Molekül der erste Bindungsbereich und die erste Targetregion eine Struktur bilden, die dem A-Stamm einer tRNA in der Oligonukleotid-Target-RNA-Struktur ähnelt und der zweite Bindungsbereich und die zweite Targetregion eine Struktur bilden, die dem T-Stamm einer tRNA in der Oligonukleotid-Target-RNA-Struktur ähnelt, und  
wobei das Oligonukleotid die durch eukariontische RNase P-ermittelte Spaltung des Target-RNA-Moleküls fördert.
2. Oligonukleotid nach Anspruch 1, wobei die Ausbuchtungsregion 1 bis 30 Nukleotide lang ist.
3. Oligonukleotid nach Anspruch 1, wobei die Zielsequenz des Weiteren einen Windungsbereich umfasst, wobei der Windungsbereich eine Sequenz NUNR aufweist, wobei N für ein beliebiges Nukleotid steht, R für ein beliebiges Purinnukleotid steht und U für ein Uridinnukleotid steht.
4. Oligonukleotid nach Anspruch 1, das eine Nukleotidbasensequenz umfasst, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 6, SEQ ID Nr. 8, SEQ ID Nr. 10, SEQ ID Nr. 12 und SEQ ID Nr. 14 besteht.
5. Oligonukleotid nach Anspruch 1, wobei das Target-RNA-Molekül ein Hepatitis B-RNA-Molekül ist.
6. Oligonukleotid nach Anspruch 1, wobei eine oder mehrere der 2'-Hydroxylgruppen von Ribonukleotiden durch eine chemische Gruppe ersetzt ist (sind), die aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Wasserstoff, einer O-Alkyl-Gruppe, einer O-Alkyl-Gruppe, einer Aminogruppe und Fluor besteht.
7. Oligonukleotid nach Anspruch 1, wobei eine oder mehrere der Phosphatverbindungsgruppen durch eine Verbindungsgruppe ersetzt sind, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Methylphosphonat und Phosphorothioat besteht.
8. Oligonukleotid nach Anspruch 1, wobei die 3'-Hydroxylgruppe des Oligonukleotids durch eine chemische Gruppe ersetzt ist, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus  $-OPO(O)OCH_2CH(OH)-CH_2NH_2$ ,  $-OPO(S)OCH_2CH(OH)CH_2NH_2$  und einem -3'-Thyminnukleotid besteht.
9. Zusammensetzung zur Förderung der Spaltung eines Target-RNA-Moleküls, wobei die Zusammensetzung das Oligonukleotid nach Anspruch 1 in einem pharmazeutisch akzeptablen Abgabesystem umfasst.
10. Zusammensetzung nach Anspruch 9, wobei das pharmazeutisch akzeptable Abgabesystem aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Liposomen, Virosomen, Mikrokügelchen und Mikrokapseln besteht.

11. Oligonukleotid nach Anspruch 1, das ferner eine RNA-Sequenz umfasst, die an einen Liganden bindet, wobei das Oligonukleotid die Spaltung des Target-RNA-Moleküls durch RNase P lediglich bei Bindung an den Liganden fördert.
12. Oligonukleotid nach Anspruch 1, das ferner eine RNA-Sequenz umfasst, die an einen Liganden bindet, wobei das Oligonukleotid die Spaltung des Target-RNA-Moleküls durch RNase P lediglich dann fördert, wenn keine Bindung an den Liganden vorliegt.
13. Verwendung eines Oligonukleotids nach Anspruch 1 bei der Herstellung eines Medikaments zur Spaltung eines viralen Target-RNA-Moleküls in einem mit dem Virus infizierten Patienten, wobei RNase P, das Target-RNA-Molekül und das Oligonukleotid unter Bedingungen in Kontakt gebracht werden, die die durch RNase P vermittelte Spaltung fördern.
14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei das Oligonukleotid sich in einem pharmazeutisch akzeptablen Abgabesystem befindet.
15. Verwendung nach Anspruch 14, wobei das pharmazeutisch akzeptable Abgabesystem aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Liposomen, Virosomen, Mikrokügelchen und Mikrokapseln besteht.
16. Verwendung nach Anspruch 14, wobei das virale RNA-Molekül ein Hepatitis B-RNA-Molekül ist.
17. Verwendung eines gentechnisch hergestellten Expressionsvektors mit Codierung für ein Oligonukleotid nach Anspruch 1 bei der Herstellung eines Medikaments zur Hemmung eines Virus in einem Patienten.
18. Verwendung nach Anspruch 17, wobei der gentechnisch hergestellte Expressionsvektor sich in einem pharmazeutisch akzeptablen Abgabesystem befindet.
19. Verwendung nach Anspruch 18, wobei das pharmazeutisch akzeptable Abgabesystem aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Liposomen, Virosomen, Mikrokügelchen und Mikrokapseln besteht.
20. Verwendung nach Anspruch 19, wobei das pharmazeutisch akzeptable Abgabesystem ein Liposom ist.
21. Verwendung nach Anspruch 17, wobei der Vektor ein viraler Vektor ist, der aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus retroviralen Vektoren, adeno-assoziierten viralen Vektoren und viralen Epstein-Barr-Vektoren besteht.
22. Gentechnisch hergestellter Expressionsvektor mit Codierung für ein Oligonukleotid nach Anspruch 1.
23. Zusammensetzung zur Förderung der Spaltung eines Hepatitis B-RNA-Moleküls, wobei die Zusammensetzung den gentechnisch hergestellten Expressionsvektor nach Anspruch 22 in einem pharmazeutisch akzeptablen Abgabesystem umfasst.
24. Zusammensetzung nach Anspruch 23, wobei das pharmazeutisch akzeptable Abgabesystem aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Liposomen, Virosomen, Mikrokügelchen und Mikrokapseln besteht.
25. Ex-vivo-Verfahren zur Spaltung eines Target-RNA-Moleküls, das die folgende Stufe umfasst: In-Kontakt-Bringen von RNase P, dem Target-RNA-Molekül und einem Oligonukleotid gemäß Anspruch 1 unter Bedingungen, die eine durch RNase P vermittelte Spaltung fördern.
26. Ex-vivo-Verfahren zur Hemmung eines Virus durch Verabreichung eines gentechnisch hergestellten Expressionsvektors mit Codierung für ein Oligonukleotid nach Anspruch 1 an Zellen von einem Patienten.
27. Verfahren nach Anspruch 26, wobei der Vektor ein viraler Vektor ist, der aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus retroviralen Vektoren, adeno-assoziierten viralen Vektoren und viralen Epstein-Barr-Vektoren besteht.
28. Verwendung eines Oligonukleotidmoleküls bei der Herstellung eines Medikaments zur Bindung und Förderung einer durch RNase P vermittelten Spaltung eines viralen Target-RNA-Moleküls in einem mit dem Virus infizierten Patienten, wobei das Oligonukleotidmolekül eine Erkennungssequenz umfasst, die zu Regionen einer Zielsequenz in

dem Target-RNA-Molekül komplementär ist, wobei die Erkennungssequenz einen ersten Bindungsbereich und einen zweiten Bindungsbereich umfasst, und die Zielsequenz in 5'- zu 3'-Richtung eine erste Targetregion, eine Ausbuchtungsregion und eine zweite Targetregion umfasst, wobei der erste Bindungsbereich komplementär zur ersten Targetregion ist, der zweite Bindungsbereich komplementär zur zweiten Targetregion ist und der zweite Bindungsbereich sich 5' von dem und benachbart zu dem ersten Bindungsbereich in dem Oligonukleotid befindet und bei Bindung an das Target-RNA-Molekül der erste Bindungsbereich und die erste Targetregion eine Struktur bilden, die dem A-Stamm einer tRNA ähnelt, und der zweite Bindungsbereich und die zweite Targetregion eine Struktur bilden, die dem T-Stamm einer tRNA ähnelt.

29. Ex-vivo-Verwendung eines Oligonukleotidmoleküls bei der Herstellung eines Medikaments zur Bindung und Förderung einer durch RNase P vermittelten Spaltung eines viralen Target-RNA-Moleküls in einem mit dem Virus infizierten Patienten, wobei das Oligonukleotidmolekül eine Erkennungssequenz umfasst, die zu Regionen einer Zielsequenz in dem Target-RNA-Molekül komplementär ist, wobei die Erkennungssequenz einen ersten Bindungsbereich und einen zweiten Bindungsbereich umfasst und die Zielsequenz in 5'- zu 3'-Richtung eine erste Targetregion, eine Ausbuchtungsregion und eine zweite Targetregion umfasst, wobei der erste Bindungsbereich komplementär zur ersten Targetregion ist, der zweite Bindungsbereich komplementär zur zweiten Targetregion ist und der zweite Bindungsbereich sich 5' von dem und benachbart zu dem ersten Bindungsbereich in dem Oligonukleotid befindet und bei Bindung an das Target-RNA-Molekül der erste Bindungsbereich und die erste Targetregion eine Struktur bilden, die dem A-Stamm einer tRNA ähnelt, und der zweite Bindungsbereich und die zweite Targetregion eine Struktur bilden, die dem T-Stamm einer tRNA ähnelt.

30. Verfahren zur Herstellung eines Oligonukleotids, das an eine durch eukariontische RNase P-vermittelte Spaltung eines Target-RNA-Moleküls bindet und diese fördert, wobei das Verfahren die folgenden Stufen umfasst:

(a) Auswählen einer Targetsequenz in einem Target-RNA-Molekül und

(b) Synthetisieren eines Oligonukleotidmoleküls, das eine Erkennungssequenz umfasst, die komplementär zu Regionen der Zielsequenz in dem Targetmolekül ist, wobei die Erkennungssequenz einen ersten Bindungsbereich und einen zweiten Bindungsbereich umfasst und die Zielsequenz in 5'- zu 3'-Richtung eine erste Targetregion, eine Ausbuchtungsregion und eine zweite Targetregion umfasst, wobei der erste Bindungsbereich komplementär zur ersten Targetregion ist, der zweite Bindungsbereich komplementär zur zweiten Targetregion ist und der zweite Bindungsbereich sich 5' von dem und benachbart zu dem ersten Bindungsbereich in dem Oligonukleotid befindet, und bei Bindung an das Target-RNA-Molekül der erste Bindungsbereich und die erste Targetregion eine Struktur bilden, die dem A-Stamm einer tRNA ähnelt, und der zweite Bindungsbereich und die zweite Targetregion eine Struktur bilden, die dem T-Stamm einer tRNA ähnelt.

31. Verfahren nach Anspruch 30, wobei das Target-RNA-Molekül ein virales RNA-Molekül ist.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen



Anhängende Zeichnungen

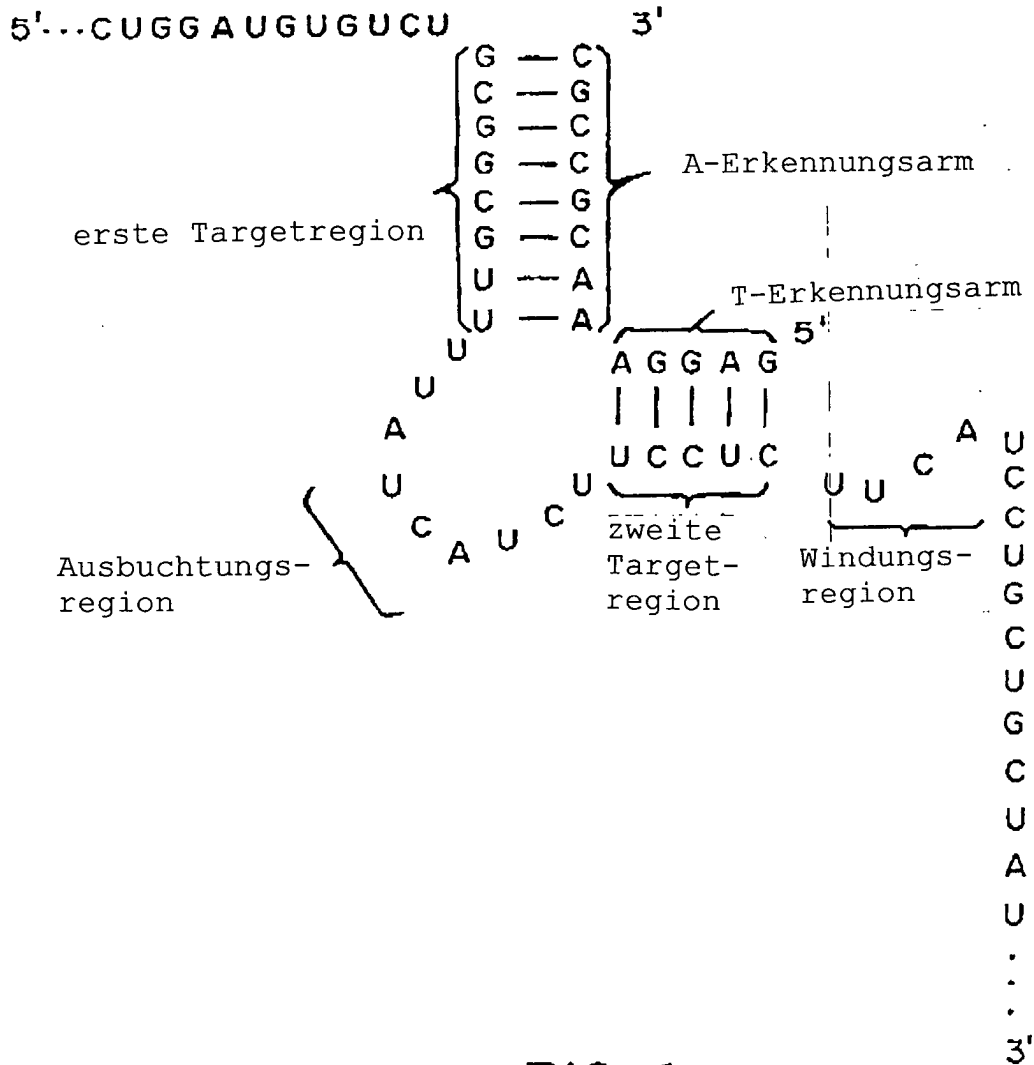
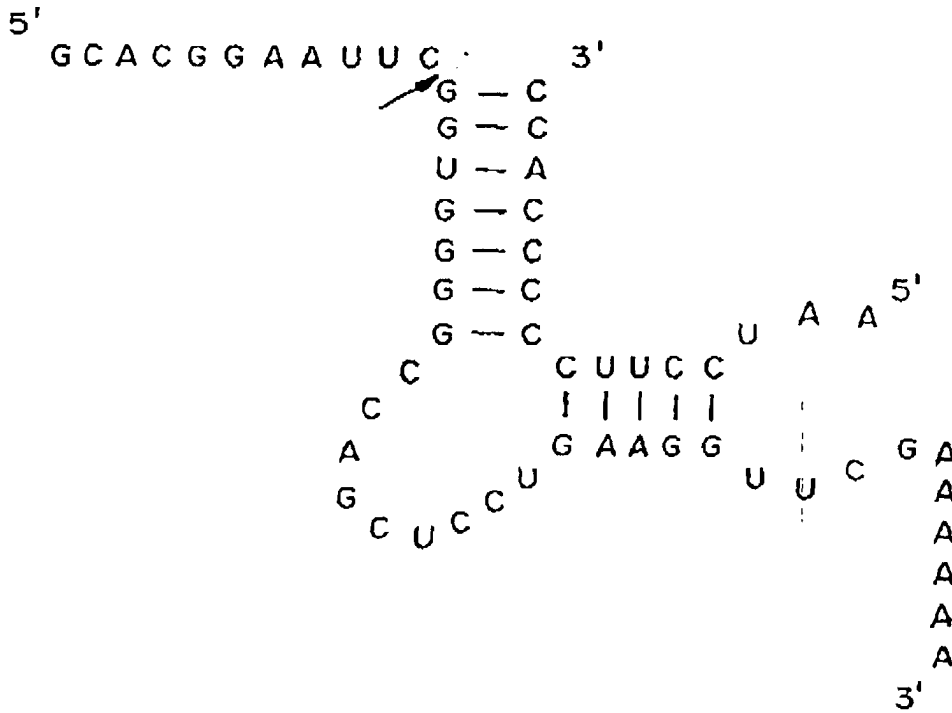


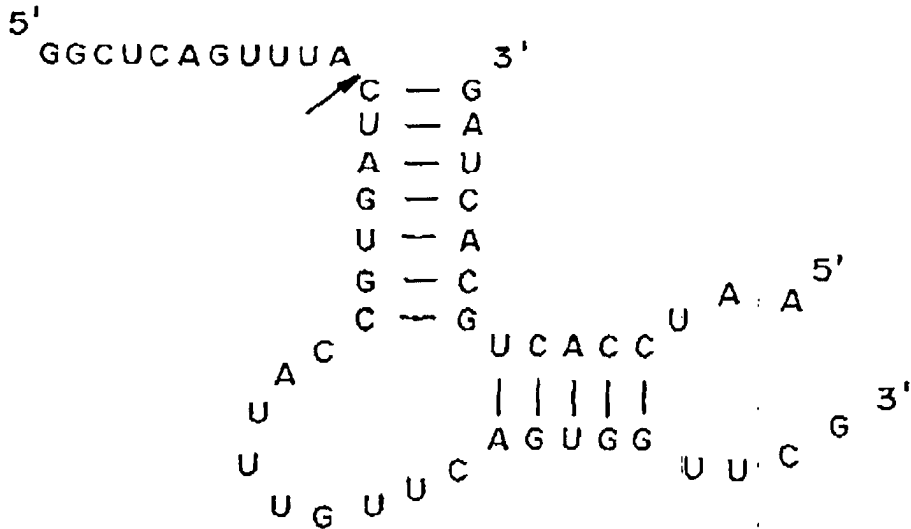
FIG. 1



GCA CGG AAU UCG GUG GGG CCA GCU CCU GAA GGU UCG AA  
 AAA A 43 Nukleotide

AAU CCU UCC CCC ACC 15 Nukleotide

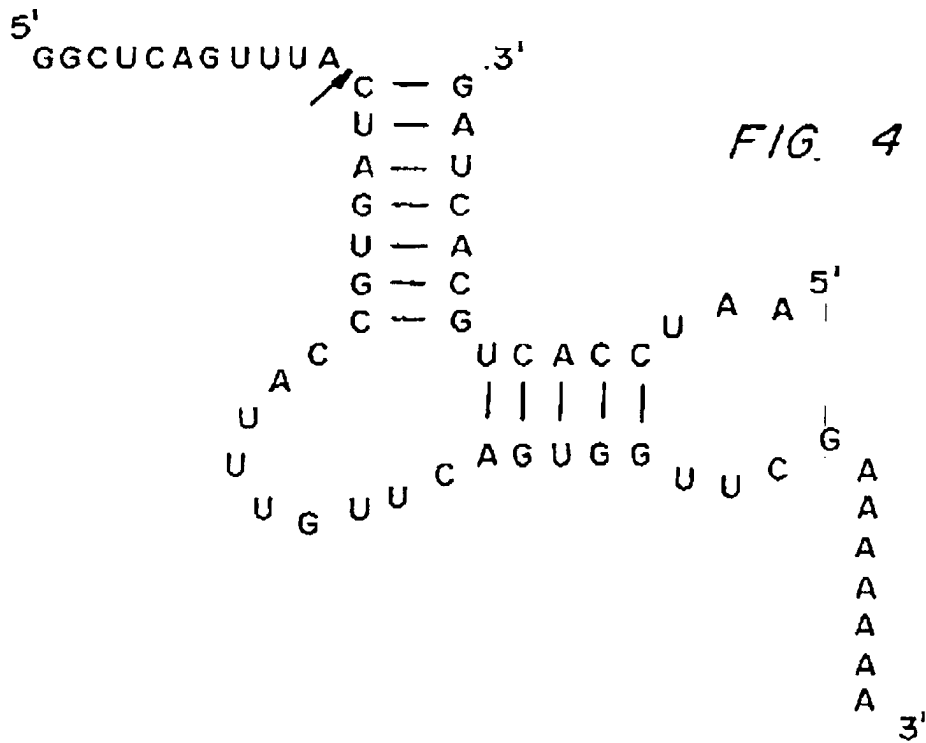
FIG. 2



GGC UCA GUU UAC UAG UGC CAU UUG UUC AGU GGU UCG  
 36 Nukleotide

AAU CCA CUG CAC UAG 15 Nukleotide

FIG. 3



GGC UCA GUU UAC UAG UGC CAU UUG UUC AGU GGU UCG AA/

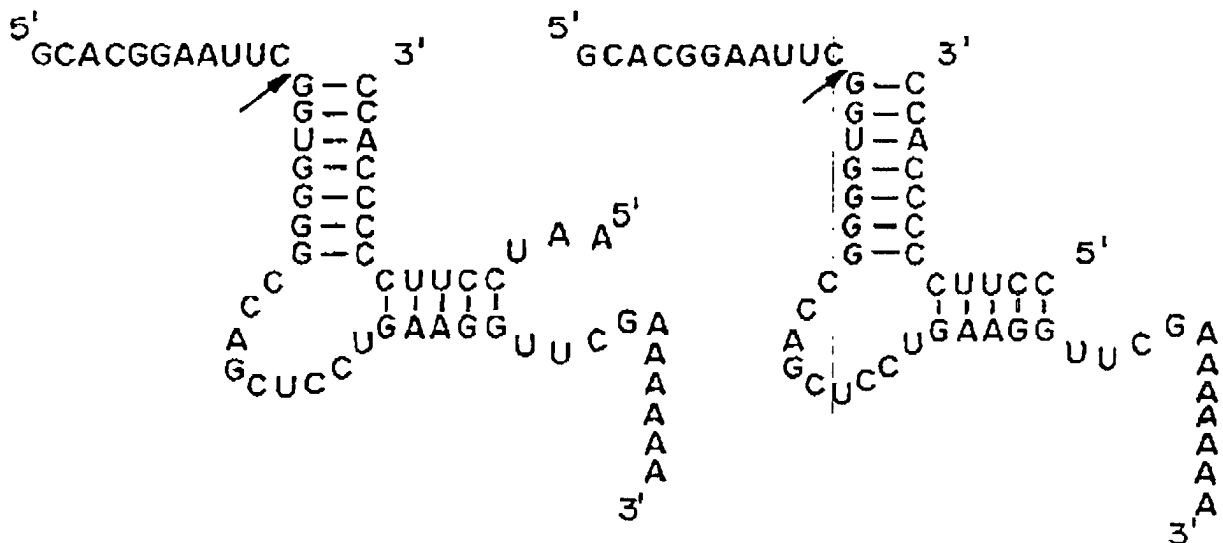
AAA A 43 Nukleotide

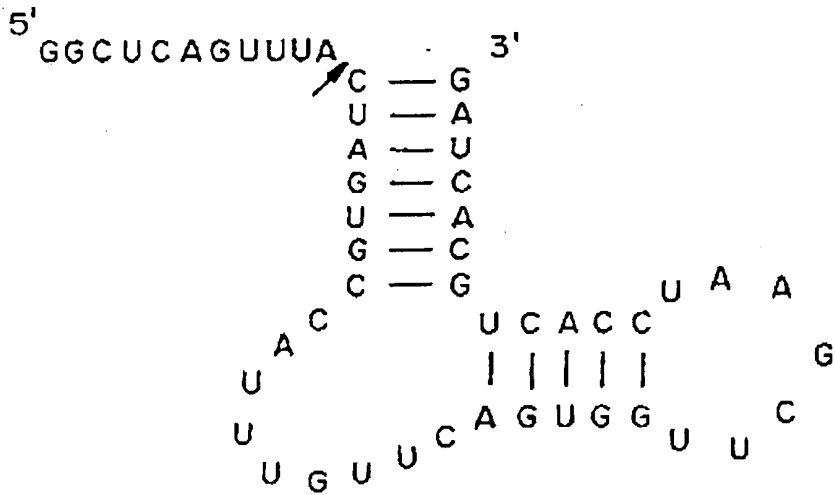
AAU CCA CUG CAC UAG 15 Nukleotide

FIG. 5

EGS mit 15 Nukleotiden

EGS mit 12 Nukleotiden





GGC UCA GUU UAC UAG UGC CAU UUG UUC AGU GGU UCG AAU  
 CCA CUG CAC UAG 51 Nukleotide

FIG. 6

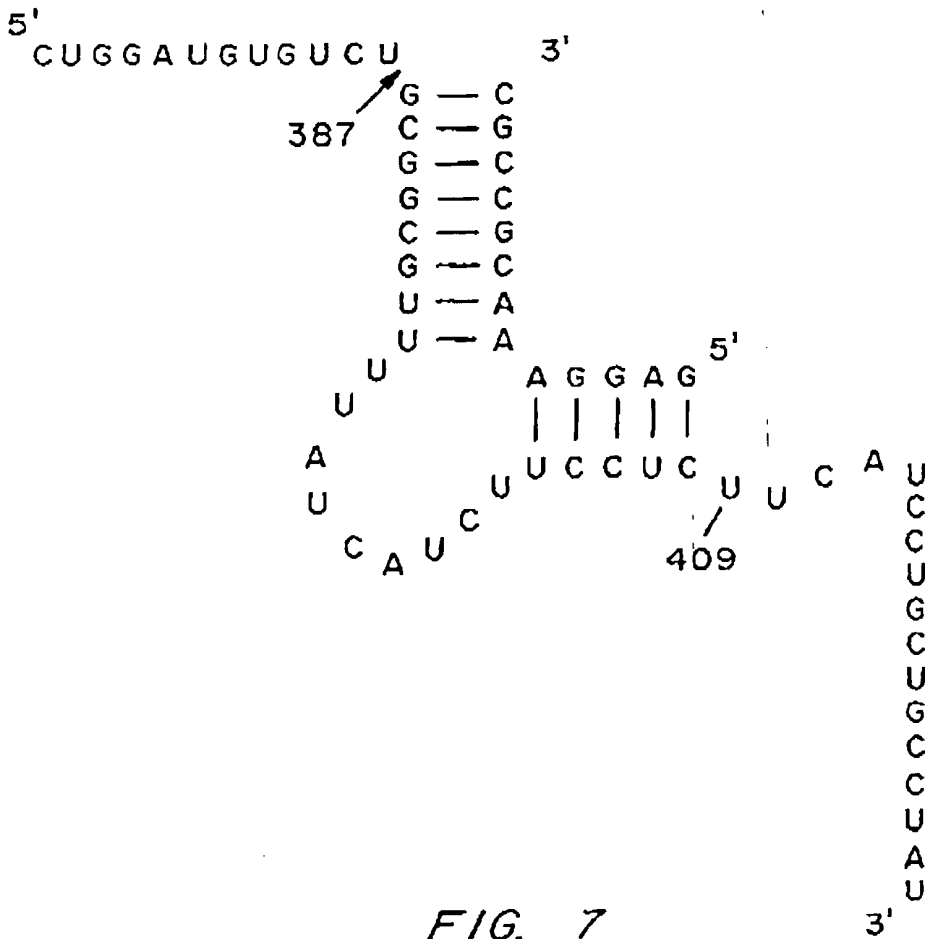


FIG. 7

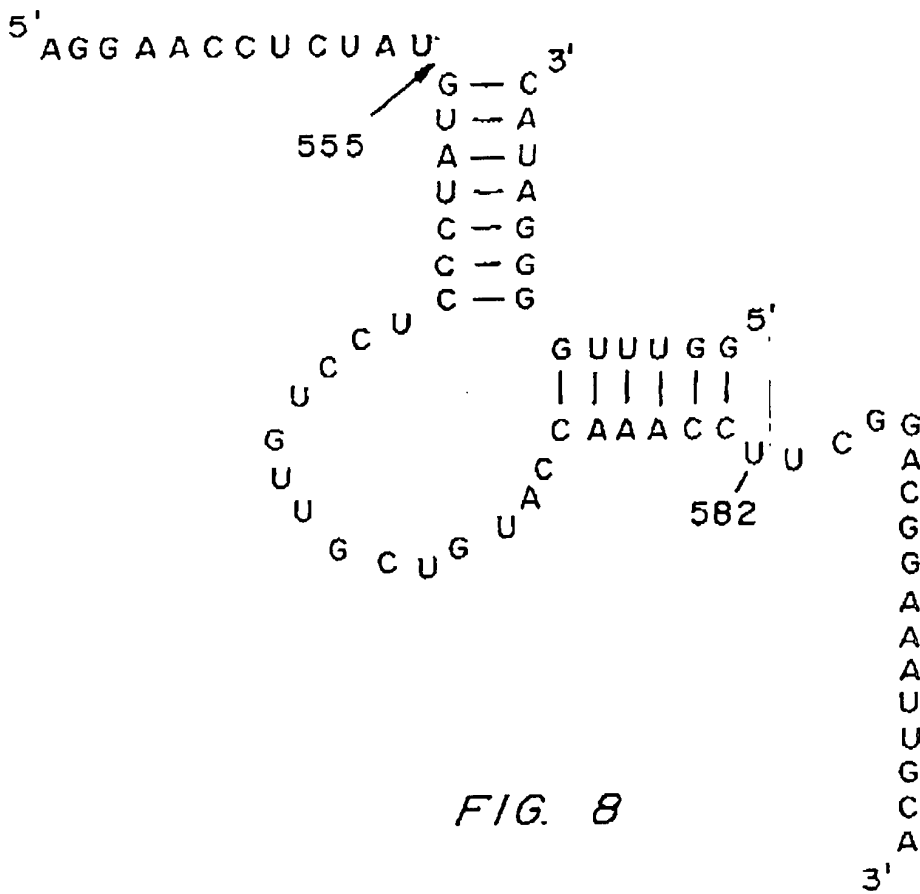


FIG. 8

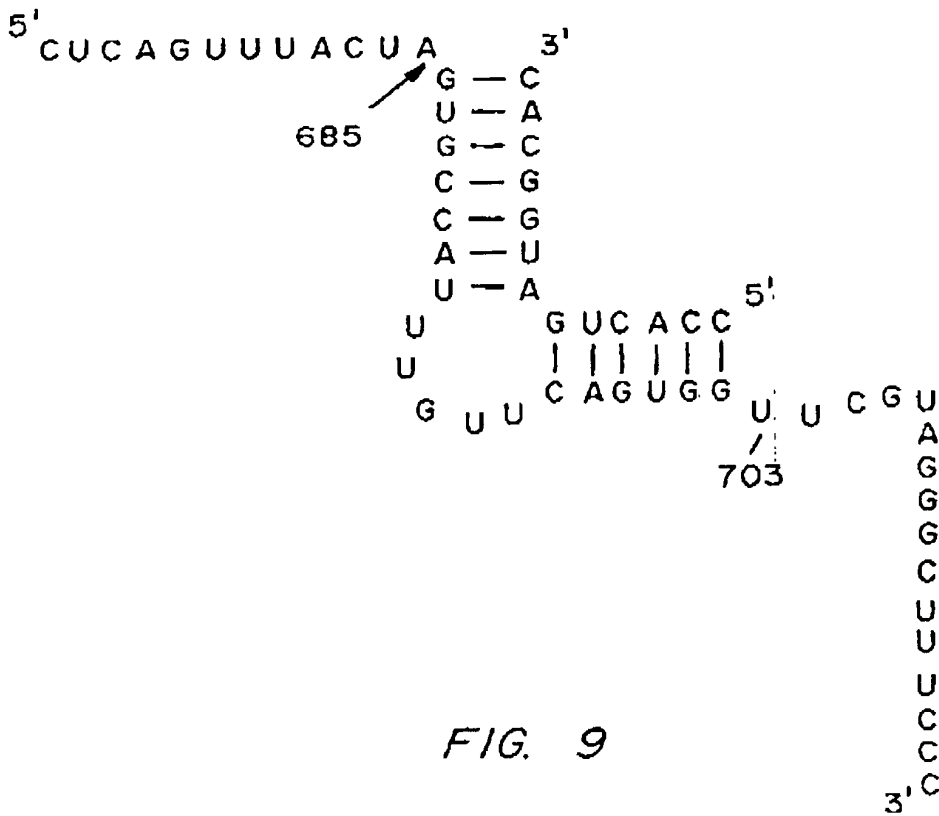


FIG. 9

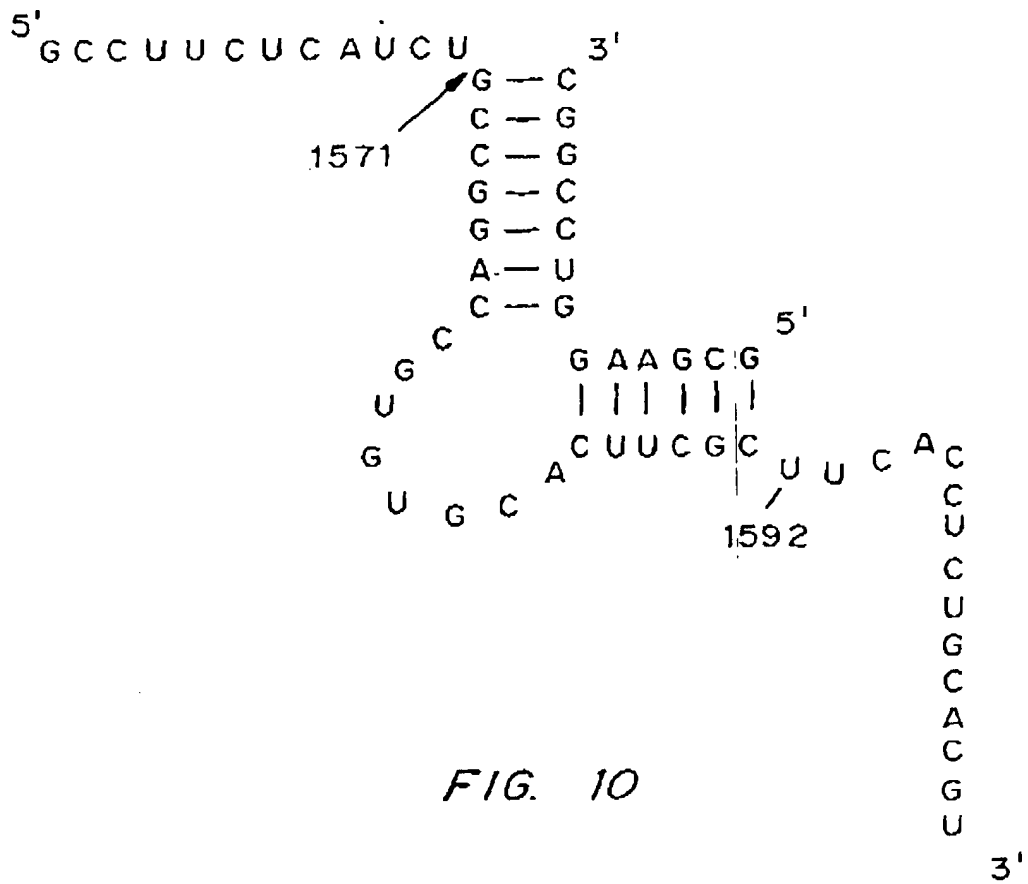


FIG. 10

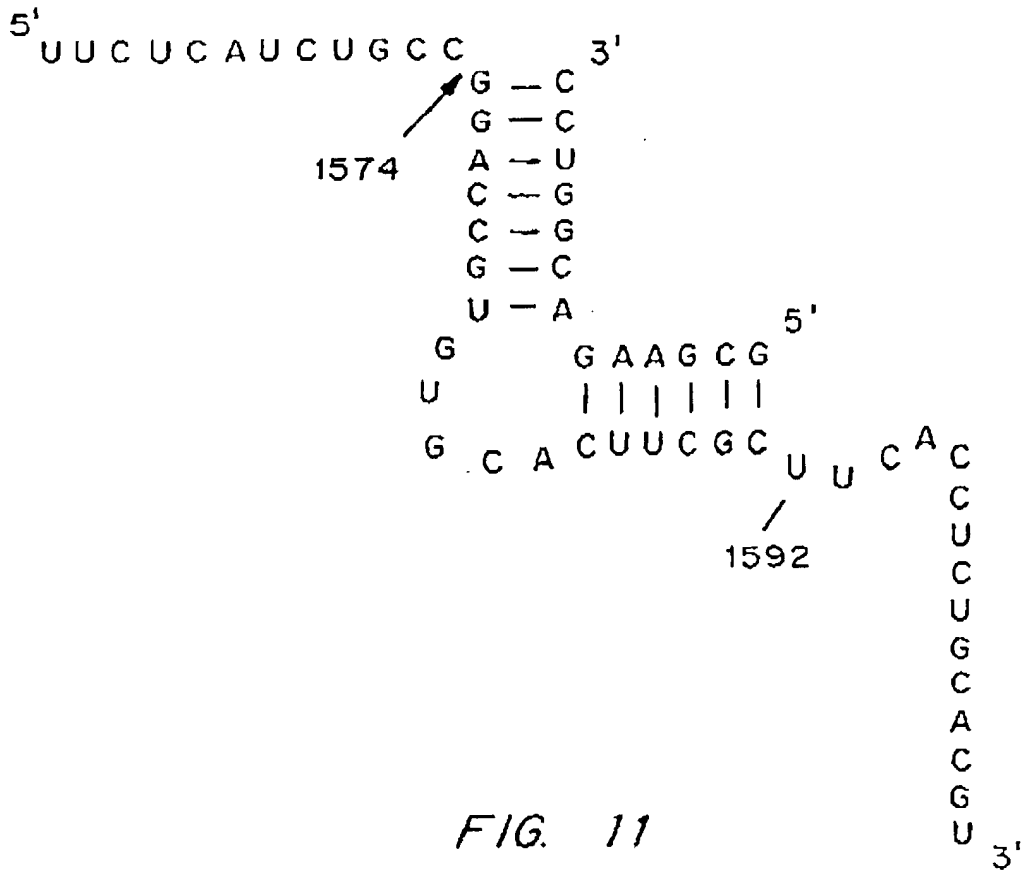
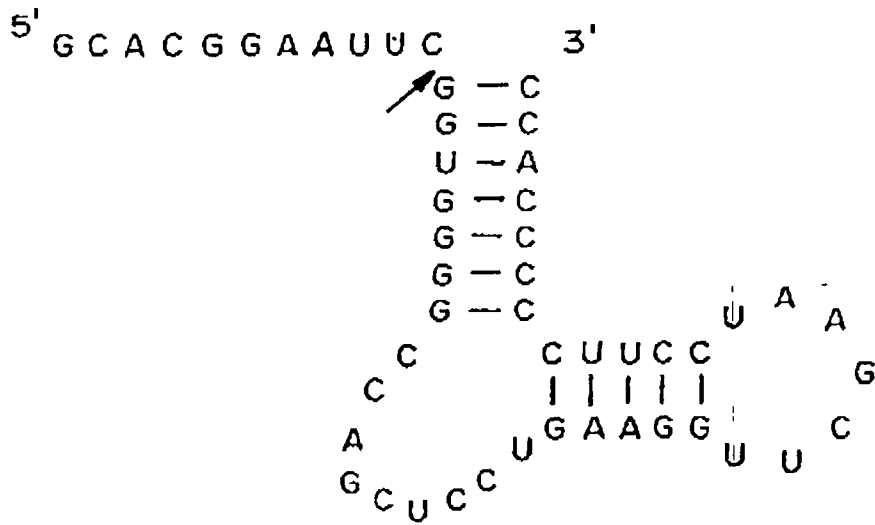
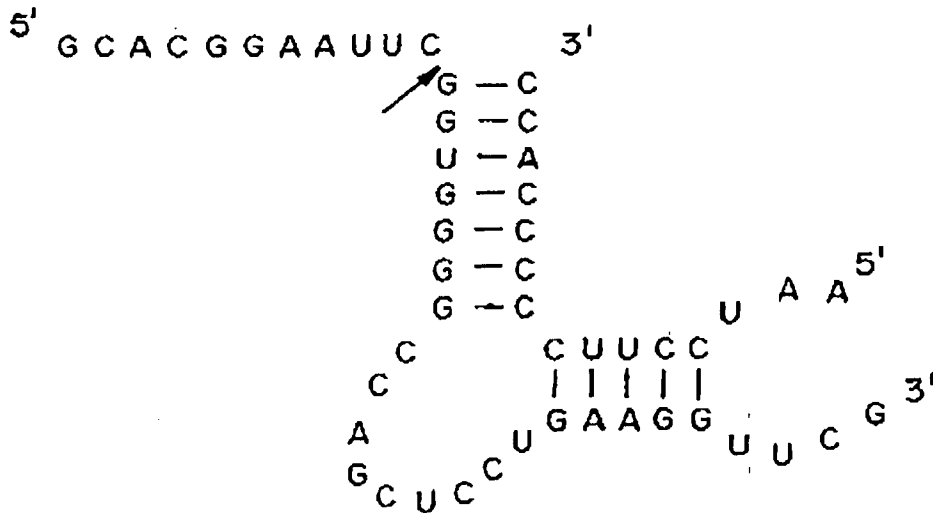


FIG. 11



GCA CGG AAU UCG GUG GGG CCA GCU CCU GAA GGU  
 UCG AAU CCU UCC CCC ACC 51 Nukleotide

FIG. 12



GCA CGG AAU UCG GUG GGG CCA GCU CCU GAA GGU UCG  
 36 Nukleotide

AAU CCU UCC CCC ACC

15 Nukleotide

FIG. 13