

Sensorische Nukleinsäuren zur Diagnose und Behandlung von viralen und neoplastischen Erkrankungen

Beschreibung

5

Eine Vielzahl von medizinisch und wirtschaftlich bedeutsamen Erkrankungen wird durch das Vorhandensein abweichender molekularer Entitäten, insbesondere unphysiologischer Nukleinsäuresequenzen als Trägern „maligner Information“, im Organismus verursacht und charakterisiert. Dies gilt insbesondere für die großen Bereiche der Infektionskrankheiten einerseits und der Neoplasien andererseits, zwischen denen sich aus dieser Sicht eine erhebliche Überschneidung ergibt, wie das Vorhandensein von Onkoviren belegt; ohne Beschränkung auf oder durch die Theorie weisen wir darauf hin, dass aus einer streng molekularen Perspektive virale und neoplastische Zustände insofern so viel gemeinsam haben, als beide durch das Vorhandensein abweichender genetischer Informationen in den betroffenen Zellen verursacht werden, dass man so weit gehen könnte, Krebs im Wesentlichen als nicht übertragbare quasi-virale Störung der Zelldifferenzierung aufgrund der Präsenz unphysiologischer Nukleinsäuresequenzen zu verstehen, während Infektionen und Infestationen mit zellulär strukturierten Pathogenen, ob Bakterien, Protozoen oder Mehrzellern, sich deutlich vom viral-onkologischen Komplex unterscheiden, da jedes dieser Pathogene grundsätzlich einen eigenen Metabolismus aufweist, der sich funktionell und räumlich von dem der befallenen Zelle oder des betroffenen Gewebes unterscheidet und dementsprechend durch eine chemische Behandlung gegen Bestandteile des Stoffwechsels und/oder der molekularen Anatomie des infektiösen Agens, die dem Wirtsorganismus fehlen, gezielt behandelt werden kann – bekannte Beispiele umfassen die auf bakterielle Zellwände wirkenden β -Laktame und die auf bakterielle Ribosomen wirkenden Aminoglykoside. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die antivirale und antineoplastische Forschung in Ermangelung chemischer Achillesfersen der verantwortlichen molekularen Entitäten bisher weit weniger zufriedenstellende Ergebnisse erbracht hat als die antibakterielle und antiparasitäre Forschung; die meisten antiviralen und antineoplastischen Wirkstoffe sind mit einer schlechten Wirksamkeit und ausgeprägten Nebenwirkungen belastet, was zu einem ungünstigen therapeutischen Index führt, zusammen mit einer engen Spezifität und einer Tendenz zur Resistenzentwicklung.

30

Im Stand der Technik finden sich für antivirale Therapeutika derzeit hauptsächlich die folgenden Angriffsziele:

- Proteasen, die virale Proteine durch Zuschneiden in die reife, d.h. funktionsfähige Form bringen;

35

- für RNA- und Retroviren: Polymerasen (Replikasen und Reverstranskriptasen);
- für große DNA-Viren: Thymidinkinasen.

40

Die ersten beiden sind für ihre Anpassungsfähigkeit bekannt, und die Entwicklung eines niedermolekularen Inhibitors für ein virales Enzyme, der zugleich für den Wirtsorganismus ungiftig ist, ist ein höchst aufwendiger empirischer Prozess. Für viele Viren sind indes nicht einmal solche Angriffsziele charakterisiert, sonderlich für solche, die weitgehend darauf setzen, Wirtsproteine zu ihren Zwecken umzufunktionieren. Für die Papovaviren etwa wird ohne Beschränkung durch oder auf die Theorie angenommen, dass einerseits Expression der onkogenen T-Proteine und deren Komplexbildung mit Wirtsproteinen, andererseits Transsplicing, möglicherweise durch N-terminale Fusion des Agnoproteins an zelluläre Proteine, dem gesamten Virusmechanismus zugrunde liegt, ohne dass eine einzige virusspezifisch katalysierte biochemische Reaktion identifiziert werden könnte. Es liegt in der Natur der Sache, dass diese Komplexbildungen und Fusionierungen schwierig zu erforschen und noch schwieriger zu inhibieren sind.

45

50

Daher werden heute in beiden Bereichen Alternativen zur „frontalen“, d.h. unmittelbar auf das infektiöse Agens gerichteten, Pharmakotherapie bevorzugt: In der Onkologie wurde eine breite Palette von Inhibitoren und Immunmodulatoren entwickelt, um Krebszellen ohne Verabreichung allgemein zytotoxischer Substanzen möglichst weitgehend in Schach zu halten; in der Virologie ist

ebenfalls die Immunmodulation in Form von Impfungen der aktuelle Goldstandard. An dieser Stelle sei flankierend angemerkt, dass die entwickelten Welt über lange Zeit hinweg Viruserkrankungen als geringfügiges Ärgernis betrachten und sich auf „Zivilisationskrankheiten“ wie den metabolisch-kardiovaskulären Komplex konzentrieren konnte – ein Vorurteil, das mit dem Auftreten der coronaviralen SARS/Covid-19-Pandemie im Jahr 2020 widerlegt wurde.

Während die Impfung mit lebenden, toten oder rekombinanten Vakzinen zweifellos von unschätzbarem Wert im Kampf gegen viele virale Krankheiten ist – hier sind die von der WHO als ausgerottet gemeldeten Pocken und der Masern/Rinderpest-Komplex als bekannte Erfolge zu nennen –, sollten ihre Nachteile nicht vergessen werden:

Die Geschwindigkeit der Impfstoffentwicklung ist – gleich der Entwicklung von chemischen Virustatika – für emergente Krankheiten, die in unserer globalisierten Welt ein zunehmendes Problem darstellen, unzureichend; insbesondere eine großflächige Anwendung von Impfstoffen zum Pandemieschutz führt aufgrund der notwendigerweise hohen Anzahl der Impfungen – grundsätzlich gelten für prophylaktische höhere ethische Anforderungen als für kurative Mittel – zu sehr strengen Sicherheitsanforderungen, die in der Zeitspanne vom Auftreten bis zur Pandemie offensichtlich nicht erfüllt werden können.

Darüber hinaus sind viele Viren, insbesondere RNA-basierte Viren, anfälliger für Mutationen, als es z.B. Pockenviren sind, was unter Umständen zur Entstehung von „Escape-Mutationen“ führt, also Ausbildung von viralen Formen, die – in Analogie zu den Resistenzbildungen gegen Proteaseinhibitoren – vom geimpften Immunsystem nicht mehr erkannt werden und so einen Impfstoff faktisch unbrauchbar machen, und tatsächlich wurde im Zusammenhang mit der Covid-19-Pandemie vermutet, dass Impfstoffe mit geringer Wirksamkeit und verspäteten Verabreichungsschemata die Bildung von Escape-Mutationen begünstigen. Ohne Beschränkung durch oder auf die Theorie wird darauf hingewiesen, dass Tumorzellen ebenso wie viele Viren, insbesondere RNA-Viren, eine R-Strategie mit kurzen Generationszeiten und hohen Nachkommenszahlen verfolgen, was eine schnelle Anpassung an einen neuen Selektionsdruck ermöglicht.

Drittens steigt mit den Fortschritten in der Biotechnologie auch das Risiko, dass Bioterroristen absichtlich Escape-Mutationen von „ausgerotteten“ Krankheitserregern erzeugen – neben vielen anderen denkbaren Möglichkeiten entweder durch die Veränderung entscheidender Epitope oder durch die Einführung aktiv immunsuppressiver Elemente wie dem Nef-Protein von HIV oder andere Komponenten, die z.B. in die Peptidpräsentation durch MHC-Moleküle eingreifen, aktivierende Signalwege blockieren, inhibitorische Signalwege verstärken, Signalstoffe inaktivieren usw. Es liegt auf der Hand, dass dergleichen aktiv immunsuppressive und damit immunologisch tarnende Elemente ein unauflösliches immunologisches Dilemma bilden und eine prophylaktische Impfung in hohem Maße erschweren.

Nicht vergessen werden sollte auch die grundsätzliche Problematik, die sich aus der inneren Zweiteilung des Immunsystems in einen antikörperbasierten und einen zellvermittelten – auch zytolytisch oder zytotoxisch genannten – Zweig ergibt: Induktion von Antikörpern gegen ein bestimmtes Zielantigen ist sowohl leichter zu erreichen als auch leichter nachzuweisen als Induktion einer zellvermittelten Immunantwort, jedoch sind Antikörper aus einer Reihe von Gründen von begrenztem Wert gegen viral bedingte Erkrankungen – Viruspartikel bieten wenig Angriffspunkte für Antikörper, die überdies in vielen Fällen auch leicht mutieren und sich damit der Immunreaktion entziehen können; sobald eine Infektion etabliert ist, ist die Hauptmasse der Viren intrazellulär zu finden, wo sie auch ihren physiologischen Schaden verursachen, und damit außerhalb der Reichweite von Antikörpern, nur für die zytolytische Immunreaktion erreichbar. Im schlimmsten Fall kann es sogar zur Bildung aktivierender Antikörper kommen, die den Viren das Eindringen in Zielzellen erleichtern und das Krankheitsbild damit exazerbieren. Überdies gelten die Dauer und „Erinnerbarkeit“ einer antikörpervermittelten Immunantwort als geringer als die einer zytolytischen.

Auf der sozialen Ebene bestehen bei vielen Völkern und Kulturen überdies unterschiedlich gelagerte Vorurteile gegen eine Impfung gesunder Personen, die von Sorgen vor Fertilitätsstörungen bis zu diffusen Ängsten vor einer „Belastung des Immunsystems“ reichen.

Beim gegenwärtigen Stand der Technik sind diese Probleme nicht grundsätzlich unüberwindlich, aber hinreichend groß, um bei emergenten oder schnell mutierenden Viren eine wirksame Impfung in der Praxis unmöglich zu machen.

5 Es besteht also ein ungedeckter medizinischer Bedarf an einer „zweiten
Verteidigungslinie“ im Sinne einer Entwicklungsstrategie für Therapeutika für
emergente Krankheiten, die es erlaubt, ausreichend schnell eine kurative Be-
handlung für jedwede (bekannte oder) neu identifizierte Viruserkrankung zu
schaffen, um sie zu heilen oder zu lindern, die Symptome zu reduzieren, das Überleben des Pati-
enten zu verlängern oder wahrscheinlicher zu machen, bleibende Schäden zu vermeiden oder zu
10 verringern und/oder die Ausbreitung einer neuartigen Krankheit zu reduzieren, anstatt gesunde
Menschen vor einer Infektion bzw. dem Ausbruch einer Krankheit nach einer Infektion zu schützen
zu versuchen. In Anbetracht der obigen Ausführungen wäre eine solche Strategie auch bei neoplasti-
schen Erkrankungen anwendbar und von Vorteil, da aus molekularer Sicht jeder einzelne Krebsfall als
eine neu entstehende Krankheit interpretiert werden kann, weswegen hat die Idee der „personali-
15 sierten Therapie“ trotz der damit verbundenen enormen Kosten viel Interesse geweckt hat.

Die vorliegende Erfindung erfüllt diese Aufgabe durch eine funktionell
zweiteilige Nukleinsäure, die einen Effektor und einen molekularen Kontroll-
schalter für denselben umfasst, wobei der Kontrollschalter die unabhängige An-
wesenheit „maligner Information“, insbesondere spezifischer viraler oder neo-
plastischer Elemente innerhalb der Zelle erfordert, um den Effektor in seine
wirksame Form zu bringen. Damit ist sichergestellt, dass die Nukleinsäure – in der vorliegen-
den Anmeldung auch als „sensorische Nukleinsäure“ bezeichnet – in gesunden Zellen keine schädli-
chen Wirkungen entfalten kann, was den therapeutischen Index stark erhöht und grundsätzlich den
Einsatz von aggressiveren Effektoren erlaubt. Der Kontrollschalter ist am effektivsten, wenn er in der
20 Lage ist, die zweiteilige Nukleinsäure quantitativ zu kontrollieren, d.h. wenn Kopien oder Transkripte
derselben nur in Anwesenheit der abweichenden molekularen Entität produziert werden, anstatt
nur ihre Aktivität zu regulieren. Bevorzugt, aber nicht notwendig, ist es hierbei, dass der Effektor sei-
nerseits eine Spezifität für die maligne Information besitzt oder anderweitig von einer Art ist, dass er
in gesunden Zellen keine Wirkung entfaltet. Ferner ist eine Ausführungsform bevorzugt, in der die
erfindungsgemäße Nukleinsäure vorzugsweise in oder in die Nähe befallener Zellen oder Gewebe
abgegeben wird, etwa durch Verwendung von Drug- oder Gene-Delivery-Systemen, wie von Flaig
1997 (*Konstruktion pseudoviraler Gentransfersysteme als Grundlage für die Therapie arterioskleroti-
scher Erkrankungen*: Promotionsschrift zur Erlangung des akademischen Grades des Dr. sci. hum.,
vorgelegt der Universität Heidelberg) und Flaig 2001 (*Bdellosomen, ein neuartiges Arzneimitteltrans-
portsystem auf der Basis monomolekularer Polymerpartikel*: Promotionsschrift zur Erlangung des
30 akademischen Grades des Dr. rer. nat., vorgelegt der Universität Heidelberg) beschrieben.

Dementsprechend betrifft die vorliegende Erfindung eine Substanz zur Behandlung eines
medizinischen Zustands eines Menschen oder nicht-menschlichen Wirbeltiers, der die Expression
eines nicht-physiologischen Proteins umfasst, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanz eine Nuk-
leinsäure umfasst, die mindestens (I) eine Kontrollsequenz umfasst, die mit einem nicht-physiolo-
gisch exprimierten Protein interagiert, um die Replikation und/oder Expression von (II) einer Effektor-
sequenz zu ermöglichen, deren Replikation und/oder Expression der Manifestation des medizini-
schen Zustands entgegenwirkt.

Die vorliegende Erfindung offenbart insbesondere eine Substanz wie oben beschrieben, die
45 dadurch gekennzeichnet ist, dass der Zustand, von dessen Wirkstoff sie abgeleitet ist und für dessen
Behandlung sie bestimmt ist, eine akute oder chronische Virusinfektion oder ein Zustand ist, der
kausal mit einer akuten oder chronischen Virusinfektion zusammenhängt. Hier kann durch die Aus-
wahl einer Kontrollsequenz, die als Startsignal für die Replikation durch das
Replikationssystem des Virus dient, eine quantitative Kontrolle erreicht werden. Bei RNA-
Viren, die den Großteil der humanpathogenen Viren ausmachen, ist dies vorzugsweise die Erken-
50 nungssequenz für die RNA-Replikase, aka. RNA-abhängige RNA-Polymerase, die jedes RNA-

Virus benötigt, und die, ohne darauf beschränkt zu sein, in den meisten Fällen am 5'-Ende der viralen genomischen RNA zu finden sein wird. Für DNA-Viren sind deren komplexere und vielfältigere Mechanismen zur Initiierung der Replikation im Stand der Technik beschrieben und können von jeder Person mit durchschnittlichem Fachwissen auf die vorliegende Erfindung übertragen werden.

5 Das oben beschriebene Problem einer immunologischen Tarnung des Pathogens kann durch den beschriebenen kurativen Ansatz überwunden werden, indem ein Effektor so gewählt wird, dass er den immunologischen Tarnmechanismus des Virus stört oder überbrückt – eine Möglichkeit, die es bei einem prophylaktischen Ansatz grundsätzlich nicht gibt.

10 Im Falle einer antiviral konzipierten Substanz ist es weiterhin bevorzugt, aber nicht notwendig, dass die Nukleinsäure gemäß der vorliegenden Erfindung das vom zugrundeliegenden Wirkstoff verwendete Verpackungssignal umfasst, d.h. eine Nukleotidsequenz, die in der Lage ist, mit anderen viralen Komponenten so zu interagieren, dass eine Nukleinsäure, die diese Sequenz umfasst, in die entstehenden viralen Kapside integriert oder „verpackt“ wird. Ein solches Vorhandensein eines Verpackungssignals bietet je nach den Details des Virus einen oder beide der folgenden Vorteile: (A) 15 Die Nukleinsäure-Bindungsstellen der naszierenden Virionen werden durch die Nukleinsäure der vorliegenden Erfindung besetzt, und die Verpackung der viralen Nukleinsäure wird dadurch kompetitiv gehemmt; und (B) Kopien der Nukleinsäure gemäß der vorliegenden Erfindung werden in die naszierenden Virionen verpackt und verbreiten sich so auf weitere Zellen des Menschen oder nicht-menschlichen Wirbeltiers, die für eine Infektion durch das Virus empfänglich sind, wodurch die 20 schützende Wirkung der Nukleinsäure gemäß der vorliegenden Erfindung in allen Geweben und Organen verbreitet wird.

Ohne Beschränkung auf oder durch die Theorie wird hierbei angenommen, dass viele Viren, insbesondere solche mit polyedrischen Kapsiden, obere und untere Größengrenzen für die effiziente Verpackung von Nukleinsäure, die das Verpackungssignal trägt, und möglicherweise auch andere Be- 25 schränkungen wie Zusammensetzung und Sekundärstruktur haben; dass dort, wo diese Verpackungsanforderungen im Wesentlichen vollständig erfüllt sind, Aspekt B dominiert; dass dort, wo sie nicht erfüllt sind, Aspekt A dominiert, indem eine unvollkommene Erfüllung der Verpackungsanforderungen zur Produktion von „Blindgängern“ oder unvollständigen Kapsiden führt, während eine wesentliche Nichterfüllung der Anforderungen zu einer Gesamthemmung der Virionenproduktion trotz laufender viraler Proteinsynthese führt, wobei in beiden Fällen angenommen wird, dass sie die 30 immunologische Erkennung und damit das Auftreten einer Immunantwort unterstützen. Dabei kann sich das Verpackungssignal an beliebiger Stelle auf der erfindungsgemäßen Nukleinsäure befinden, d.h. entweder in der Kontrollsequenz, der Effektorsequenz, in beiden oder in keiner von beiden enthalten sein oder diese überlappen. Der Stand der Technik offenbart Sequenzen, die als Kontrollsequenzen in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, die untrennbar mit Verpackungssignalen verbunden sind; so umfasst z.B. die Promotorregion von Papovaviren deren Verpackungssignal. In Anbe- 35 tracht seiner gesonderten Funktion ist das Verpackungssignal als Element (III) zu betrachten, selbst wenn es strukturell nicht von anderen Elementen trennbar ist, wenn und soweit es eine gesonderte Funktion ausübt.

40 NB – Das Taxon der Papovaviren (Papillomaviren, Polyomaviren und Vakuolisierungsviren) wird von vielen Autoren als nicht mehr gültig angesehen, da SV40, das archetypische Vakuolisierungsvirus, als Polyomavirus neuklassifiziert worden ist. In der vorliegenden Offenlegung verwenden wir der Einfachheit halber noch den alten Begriff.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die virale Infektion 45 eine Infektion mit einem RNA-Virus, wie einem Mitglied der Filovirus-Gruppe, z.B. dem Ebola-Virus, oder einem Mitglied der Coronavirus-Gruppe, z.B. einem Virus der SARS/MERS/Covid-Verwandtschaft, und die Kontrollsequenz umfasst eine Erkennungssequenz für die Replikase des RNA-Virus. Es versteht sich von selbst, dass hier die aktive Form der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in RNA-Form vorliegen muss; es versteht sich jedoch, dass jede erfindungsgemäße RNA in Form einer DNA 50 implementiert werden kann, aus der die aktive RNA beschrieben werden kann, sowie umgekehrt, wenn eine reverse Transkription beteiligt ist.

In einer spezifischen Ausführungsform der Erfindung wird ein indirektes oder amplifizierendes System verwendet, indem die Kontrollsequenz (a) ein Element, das auf die Anwesenheit abweichender molekularer Einheiten reagiert, (b) eine spezifische Nukleinsäurepolymerase und (c) ein Signal für die spezifische Nukleinsäurepolymerase, z.B. die RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 und einen von dieser adressierten Promotor, am meisten bevorzugt TAATACGACTCACTATAGGGAGA, umfasst. Dies ermöglicht die Verwendung von schwachen oder vorzugsweise streng geregelten Steuersequenzen. In einem solchen Fall kann die Nukleinsäure gemäß der vorliegenden Erfindung gegebenenfalls verschachtelt oder rekursiv sein, indem auf der ersten Ebene die Transkription der ursprünglichen DNA reguliert wird und auf der zweiten Ebene wiederum die Aktivität des RNA-Transkripts reguliert wird.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die virale Infektion eine Infektion mit einem Papovavirus, und die Kontrollsequenz umfasst den späten Genpromotor des Papovavirus, vorzugsweise auch den papovaviralen Replikationsursprung. Ohne Beschränkung auf oder durch die Theorie wird in dieser Ausführungsform angenommen, dass die viralen und neoplastischen Aspekte konvergieren und sowohl in akut infizierten Zellen als auch in den daraus abgeleiteten Neoplasmen die viralen T-Proteine exprimiert werden, die die Zelle in den Wachstumsmodus schalten, ursprünglich mit dem Zweck, Bausteine für die virale Nachkommenschaft zu liefern, und regelmäßig die Replikation induzieren und die „späten“ Gene des Virus aktivieren, nämlich die Gene, die für die Kapsidproteine kodieren, die in Papovavirus-induzierten Neoplasmen normalerweise durch Rekombination deletiert werden. Eine cccDNA, die in der Lage ist, unter dem Einfluss der papovaviralen T-Proteine repliziert und in papovavirale Kapsiden verpackt zu werden, wie von Flaig 1997 beschrieben, kann also sowohl zur Unterdrückung einer papovaviralen Infektion als auch zur immunologischen Eliminierung neoplastischer Zellen eingesetzt werden. Nebenbei bemerkt wurde auch vorgeschlagen, dass das von Flaig 1997 beschriebene ψ SV40-System so eingestellt werden kann, dass es genetisches Material an professionelle antigenpräsentierende Zellen liefert und so eine Immunreaktion mit Schwerpunkt auf dem zytotoxischen und nicht auf dem antikörperabhängigen Zweig, der gegen Viren zweckmäßig ist, induziert; diese Funktionen können kombiniert werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der Zustand neoplastisch; hier ist es bevorzugt, dass die Kontrollsequenz ein Element umfasst, von dem bekannt ist, dass es an einem Prozess der genetischen Hochregulierung beteiligt ist, der für die interessierende Neoplasie spezifisch ist. Solche Elemente sind aus der Technik bekannt.

Die vorliegende Erfindung offenbart insbesondere eine Substanz wie oben beschrieben, die eine Effektorsequenz umfasst, die aus den folgenden ausgewählt ist:

- Gegensequenzen zu dem betreffenden Virus oder Onkogen, insbesondere Sequenzen, die als siRNAs wirken und dadurch virale genomische RNA zerstören, die Expression einzelner viraler Gene selektiv hemmen oder beides;

- kodierende Sequenzen für Zelloberflächenproteine, die die Erkennung der Zelle mit unphysiologischer Proteinexpression durch T-Zellen und/oder natürliche Killerzellen erhöhen;

- Gegensequenzen zu kodierenden Sequenzen für Zelloberflächenproteine, die die Erkennung der Zelle mit unphysiologischer Proteinexpression durch T-Zellen und/oder natürliche Killerzellen hemmen;

- kodierende Sequenzen für Interferone, Tumorsuppressor-Gene und/oder pro-apoptotische Proteine;

- Gegensequenzen zu kodierenden Sequenzen für anti-apoptotische Proteine;

- kodierende Sequenzen für DNAsen, RNAsen und/oder Proteasen, wobei DNAsen, RNAsen und/oder Proteasen mit Spezifität für virale Komponenten besonders bevorzugt sind;

- kodierende Sequenzen für immunogene Proteine;

- kodierende Sequenzen für Antikörper oder antikörperähnliche Proteine, wobei Antikörper oder antikörperähnliche Proteine mit Spezifität für virale Komponenten besonders bevorzugt sind;

- kodierende Sequenzen für Enzyme, die in der Lage sind, ein unwirksames Prodrug in ein antiviral, antineoplastisch oder anderweitig therapeutisch wirksames Medikament umzuwandeln;

sowie Fusionen der oben genannten mit einander oder anderen Sequenzen.

Unter Gegenseinsequenz ist hierbei jede zu einer gegebenen Sequenz im Sinne des Watson-Crick-Basenpaarungsmodells komplementäre Sequenz zu verstehen, unabhängig von einem etwaigen Mechanismus der Suppression und/oder Inaktivierung; in einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Gegenseinsequenz eine siRNA.

Insbesondere bei Neoplasien umfassen die Effektorsequenzen darüber hinaus kodierende Sequenzen für Marker- oder Reporterproteine, insbesondere fluoreszierende Proteine, die eine qualitative und quantitative Bestimmung von neoplastischen Zellen ermöglichen. Viele geeignete Effektorsequenzen sind im Wesentlichen aus dem Stand der Technik bekannt, und die hier beschriebenen Methoden können verwendet werden, um weitere zu identifizieren und ihre Eignung im Zusammenhang mit einem System gemäß der vorliegenden Erfindung zu ermitteln.

Der Fachmann versteht, dass das erfindungsgemäße System auch seine eigenen Screening-Systeme zur Identifikation geeigneter Kontrollsequenzen, Effektorsequenzen und/oder Verpackungs-signale umfasst. In einer besonderen Ausführungsform umfasst die Erfindung daher ein System zur Identifizierung einer Effektorsequenz für ein isoliertes, jedoch noch nicht charakterisiertes RNA-Virus, in welchem eine Bibliothek von Fragmenten der genomischen RNA des Virus, insbesondere ihres 5'-Endes, in eine Bibliothek von cDNA-Fragmenten reverstranskribiert wird, welche in ein Plasmid stromabwärts eines CMV- oder RSV-Promotors zwischen einem Leserahmen für RFP (rotes Fluoreszenzprotein) und einem Leserahmen für GFP (grünes Fluoreszenzprotein) eingefügt wird. Nach Transfektion der Zielzellen mit der so erhaltenen Plasmidbibliothek werden die eukaryontischen Zielzellen mit dem zu untersuchenden Virus infiziert, und die Zellen mit dem höchsten Verhältnis von grüner zu roter Fluoreszenz werden durch Zytometrie (Laserfluoreszenzmessung, „FACS“) isoliert und aus ihnen die Plasmide zurückgewonnen: In normalen Zellen findet aufgrund der monocistronischen Natur von eukaryontischer RNA keine nennenswerte Expression des grünen, nur des roten Fluoreszenzproteins statt; in Zellen, die eine für das zu untersuchende Virus geeignete Replikase-Erkennungssequenz zwischen dem RFP- und dem GFP-Leserahmen tragen, wird hingegen durch die Wirkung der Replikase der GFP-Leserahmen herauskopiert und gegenüber dem RFP-Leserahmen vervielfacht, so dass sich eine weit stärkere grüne Fluoreszenz ergibt.

In einer besonderen Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Nukleinsäure codierende Sequenzen für zwei verschiedenfarbige, d.h. sich hinsichtlich ihrer Emissionsspektren unterscheidenden, Fluoreszenzproteine, wovon eines auf der 5'- und das andere auf der 3'-Seite der Kontrollsequenz, wobei das Verhältnis der beiden Fluoreszenzen, z.B. durch Zytometrie oder Lasermikroskopie gemessen, ein Maßstab für die Präsenz und Aktivität des auf die Kontrollsequenz wirkenden Faktors ist, indem ein hohes Verhältnis von 3'-Fluoreszenz zu 5'-Fluoreszenz ein hohes Maß an Präsenz und Aktivität anzeigt und umgekehrt. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Nukleinsäure hierbei Kontrollsequenzen aus neoplastischen Phänomenen oder subklinischen und/oder im Organismus persistierenden Viren. Der Fachmann erkennt, dass bei hinreichender Verfügbarkeit von charakterisierten Effektorsequenzen sich dies auch für ein Kit zur Schnellklassifizierung emergenter Viren anhand ihrer Replikasen einsetzen lässt.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung ist die Effektorsequenz entweder funktional Null oder umfasst keine weiteren funktionalen Elemente außer der Verpackungssequenz; diese minimalistische Ausführungsform ist dafür vorgesehen, ausschließlich durch Competition um die RNA-Replikase bzw. ausschließlich durch Competition um die RNA-Replikase und die entstehenden Kapside die Vermehrung des Virus zu unterdrücken. Ohne Beschränkung durch oder auf die Theorie werden hierbei in dem Fehlen einer wie auch immer gearteten Wirkung auf die Zelle des Menschen oder nichtmenschlichen Säugers praktische, zulassungsrechtliche und psychologische Vorteile gesehen, ebenso wie die geringe Länge einer solchen Sequenz die schnelle Massenproduktion mit chemischen Mitteln erleichtert.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung ist die Effektorsequenz konterintuitiv, indem sie immunologische Tarnmechanismen des Virus verstärkt. Dieser Ausführungsform liegt der Umstand zugrunde, dass das Immunsystem „single points of failure“ weitgehend vermeidet, indem

z.B. eine vollständige Unterdrückung der Peptidpräsentation auf MHCs und damit Tarnung gegenüber dem T-Zell-System ersatzweise zu einem Angriff von NK-Zellen auf die virusinfizierten Zellen im Sinne des „missing self“ führt; es ist für das Virus daher essentiell, die zellulären Mechanismen genau in einem solchen Maß zu manipulieren, dass es in die Wahrnehmungslücke zwischen zwei Mechanismen fällt. Besonders bevorzugt ist hierbei eine Effektorsequenz, die die Peptidpräsentation auf MHCs unterdrückt und gleichzeitig die Expression von NK-aktivierenden Zelloberflächenmolekülen steigert.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung ist die Effektorsequenz darauf ausgelegt, speziell aktivierte T- oder NK-Zellen anzusprechen. Hierbei ist es bevorzugt, dass entsprechende Zellen dem Patienten selber entnommen werden, durch physiologische Aktivierung oder Transfektion in einen aktivierten Zustand versetzt und in den Patienten refundiert werden.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich ferner auf eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Diagnose oder Behandlung eines medizinischen Zustands eines Menschen oder eines nicht-menschlichen Wirbeltiers, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Substanz gemäß der vorliegenden Erfindung und Liposomen, insbesondere Liposomen mit positiver Oberflächenladung, umfasst, und ein Arzneimittel zur Behandlung eines medizinischen Zustands eines Menschen oder eines nicht-menschlichen Wirbeltiers, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Substanz gemäß der vorliegenden Erfindung und Liposomen, insbesondere Liposomen mit positiver Oberflächenladung, umfasst. Geeignete Liposomen sowie Materialien und Verfahren zu deren Herstellung sind aus dem Stand der Technik bekannt.

In einer besonderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird für die räumlich fokussierte Verabreichung der Nukleinsäure gemäß der vorliegenden Erfindung ein virales oder pseudovirales System, z.B. das von Flaig 1997 beschriebene ψ SV40-System, insbesondere ein System, das auf einem anderen Virus als dem zu behandelnden basiert, verwendet.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird ein Bakteriophage als Träger für die Nukleinsäure gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet. Hierbei ist es besonders bevorzugt, dass der Bakteriophage in der Lage ist, Bakterien zu infizieren, die im Darm als Teil der normalen Flora vorhanden sind, und dass der Bakteriophage zusätzlich zu der erfindungsgemäßen Nukleinsäure ein Expressionskonstrukt für ein Protein umfasst, das in der Lage ist, die erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein Transkript oder eine Kopie davon in ein pseudovirales Kapsid zu verpacken, das in der Lage ist, in die Darmzellen einzudringen und die erfindungsgemäße Nukleinsäure oder das Transkript oder eine Kopie davon dorthin abzugeben, wobei das Expressionskonstrukt Promotoren umfasst, die die Transkription und Translation in prokaryotischen, aber nicht in eukaryotischen Zellen vermitteln. Dabei ist es besonders bevorzugt, dass das Expressionskonstrukt zur Expression der Proteine des Enterovirus-Kapsids fähig ist, und dass die Substanz in einer magensaftresistenten Darreichungsform verabreicht wird, am zweckmäßigsten zur Behandlung einer viralen oder neoplastischen Erkrankung des Darmtraktes.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Virus das Covid-19-Virus; die relevante Nukleinsäure ist eine RNA, umfassend eine Sequenz mit der folgenden Struktur: I. Die Erkennungssequenz für die Replikase des Covid-19-Virus; II. Die Verpackungssequenz des Covid-19-Virus; III. Eine zweite Instanz der Erkennungssequenz für die Replikase des Covid-19-Virus; IV. Eine kodierende Sequenz für das CD48-Protein; V. Eine dritte Instanz der Erkennungssequenz für die Replikase des Covid-19-Virus; VI. Eine siRNA-Sequenz für das E-Protein des Covid-19-Virus; und die Liposomen umfassen positive Oberflächenladungen. Ohne durch die Theorie eingeschränkt zu sein, wird angenommen, dass in diesem Fall und nur in Gegenwart des Covid-19-Virus in der Zelle das System eine begrenzte Anzahl von Kopien in voller Länge liefert, die in Covid-19-Virionen verpackt werden können und sich so im Gewebe ausbreiten; eine mäßige Menge von III.-IV.-V.-VI.-Kopien, die CD48 exprimieren und so die durch das Virus verursachte immunologische „Tarnung“ überwinden; und eine reichliche Menge von V.-VI.-Kopien, die an virale RNA binden und diese inaktivieren, die das Leseraster für das E-Protein umfasst, wodurch seine Expression blockiert

und die Bildung reifer Virionen behindert wird, ohne die Synthese anderer Strukturproteine wie des Spike-Proteins zu stören, die so vom Immunsystem angegriffen werden können.

In einer alternativen Ausführungsform sind die obigen Elemente I.-IV.-V.-VI.-II. angeordnet, wobei jede einzelne Kopie, auch die Teilkopien, ein Verpackungssignal trägt, wobei der Aspekt A, kompetitive Hemmung der Virionenbildung, gegenüber dem Aspekt B, Ausbreitung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure, hervorgehoben wird. Viele andere Anordnungen sind ebenfalls möglich und erfindungsgemäß.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die Substanz mit Liposomen mit positiven Oberflächenladungen gemischt und als Aerosol zur direkten Applikation in die Atemwege des Menschen oder nicht-menschlichen Wirbeltieres formuliert.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich ferner auf ein Verfahren zur Entwicklung einer Substanz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es die Auswahl der Effektorsequenz aus einem Pool von Kandidaten durch den „Shotgun-Ansatz“ und den vierfachen Vergleich der zytotoxischen Aktivität von T-Zellen und/oder NK-Zellen in An- und Abwesenheit der Substanz und in An- und Abwesenheit des Virus unter Verwendung eines aus dem Stand der Technik bekannten Zytolyseassays umfasst.

	+ Substanz	– Substanz
+ Virus	A	B
– Virus	C	D

Somit ist $(A-D)/(B-D)$ die Wirksamkeit und $(A-D)/(C-D)$ die Spezifität der Nukleinsäure gemäß der vorliegenden Erfindung.

Ohne Beschränkung auf oder durch die Theorie wird in Betracht gezogen, dass der Fachmann aus dem Stand der Technik bekannte Werkzeuge verwendet, um zunächst eine geeignete Kontrollsequenz zu identifizieren, z.B. indem er ein Reporteragen wie Luziferase oder GFP oder ein Derivat davon stromabwärts eines beliebigen viralen Fragments bereitstellt und die Expressionsstärke in An- und Abwesenheit der relevanten viralen Komponente testet, im Falle eines RNA-Virus vorzugsweise eine Bibliothek von Fragmenten aus dem 5'-Ende der viralen RNA, wobei für jedes Bibliothekselement eine qualitative oder vorzugsweise quantitative Korrelation mit der Anwesenheit der viralen RNA-Replikase hergestellt wird. Mutatis mutandis kann derselbe Ansatz verwendet werden, um gewünschtenfalls ein Verpackungssignal zu identifizieren. Sobald der „Kiel“ des Systems gemäß der vorliegenden Erfindung gelegt ist, können wohldefinierte Komponenten schrittweise zugegeben und auf Expression in An- und Abwesenheit der jeweiligen viralen Komponente getestet werden, z. B. CD48 durch zytometrische Analyse in Zellen, die unterschiedliche Mengen der viralen RNA-Replikase exprimieren, oder pro-apoptische Genprodukte durch Anwendung eines beliebigen bekannten Testkits für Apoptose in Zellen, die unterschiedliche Mengen der viralen RNA-Replikase exprimieren. Schließlich können schlecht definierte Komponenten durch einen weiteren Shotgun-Ansatz selektiert werden, z. B. durch Hinzufügen beliebiger Schnipsel des Zielvirus als Kandidaten für eine gegen-sinnbasierte Inhibition, wobei zu verstehen ist, dass hier alle Arten der gegen-sinnbasierten Inhibition eingesetzt werden können, unabhängig vom genauen molekularen Mechanismus, und der so erhaltene Pool kann dem oben beschriebenen Zytolyse-Assay unterzogen werden, um Kandidaten mit herausragenden Wirksamkeits- und Spezifitätswerten für die weitere Charakterisierung zu erhalten.

Diese Schritte eignen sich zur Automatisierung, und es ist denkbar, dass die vorliegende Erfindung letztendlich zu einem Reaktionskit für emergente Viruserkrankungen führt, das in der Lage ist, automatisch eine Reihe von Nukleinsäuren gemäß der vorliegenden Erfindung zu erzeugen, wenn es mit einem neuartigen Pathogen konfrontiert wird. Im Idealfall führt dieses Kit eine subtraktive Hybridisierung gegen gesundes Gewebe durch und nutzt Datenbanken und KI-Methoden, um unter den vielen Nukleinsäuren, die in einer unbearbeiteten Probe vorhanden sind, diejenigen zu identifizieren, die einem Erreger zugeordnet werden können, wodurch die mühsame und risikoreiche manuelle Bearbeitung von infektiösen Proben entfällt.

Alle hier angeführten Beispiele sind so zu verstehen, dass sie den Umfang der vorliegenden Erfindung nicht einschränken, und alle Verweise auf hier nicht näher erläuterte Konzepte oder Einheiten als Verweise auf den einschlägigen Stand der Technik, auch wenn dies nicht ausdrücklich erwähnt wird. Es wird ausdrücklich auf frühere Anmeldungen der vorliegenden Erfinder, insbesondere

5 DE 10 2008 062 965.0, verwiesen, die unter anderem ein System zur Erzeugung von Antikörpern oder anderen Interaktionspartnern für Proteine bekannter Sequenz offenbaren.

Ohne Beschränkung und zu rein illustrativen Zwecken sind verschiedene Aspekte der vorliegenden Erfindung durch die beigelegten, stark vereinfachten Zeichnungen näher erläutert:

10 Zeichnung 1 – Grundsätzliche Darstellung einer möglichen Ausführungsform zur Behandlung einer durch RNA-Viren ausgelösten Infektionskrankheit. Hierbei ist die Darstellung im Interesse leichter Verständlichkeit zum einen (Zeichnung 1a) in die beiden Teilaspekte der viralen Funktionsweise und der Funktionsweise der erfindungsgemäßen Nukleinsäure aufgeteilt, zum anderen (Zeichnung 1b) im Zusammenhang dargestellt.

15 Zeichnung 2 – Exemplarische Darstellung möglicher erfindungsgemäßer Nukleinsäuren, zum einen (Zeichnung 2a) einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure zur Behandlung einer Infektion mit dem Covid-Virus und zum anderen (Zeichnung 2b) einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure in Form eines bakteriell vermehrbaren Plasmids zur Identifikation einer geeigneten Kontrollsequenz im Sinne der

20 Erfindung aus einem noch uncharakterisierten Virus, wobei zur Suche nach der Kontrollsequenz Re-verstranskripte (cDNAs) viraler Fragmente in den sog. Polylinker eingesetzt werden. Die erforderlichen Verfahren sind im Stand der Technik eingehend beschrieben.

25 Zeichnung 3 – Beispielhafte schematische Darstellung des prinzipiellen Arbeitsgangs zur Identifikation von wirksamen Teilsequenzen der Verpackungssequenz und des immunsuppressiven Teils eines Virus durch zweifache „Shotgun-Klonierung“ und anschließende Durchmusterung auf zytolytische Wirkung von NK-Zellen in Anwesenheit des Virus und des jeweiligen Klons.

30 Es sei darauf hingewiesen, dass der Verständlichkeit halber in den Zeichnungen die Kontrollsequenz zumeist am 5'-Ende der erfindungsgemäßen Nukleinsäure dargestellt ist, dies jedoch nicht erforderlich ist. In einer besonderen Ausführungsform schließt sich auf der 5'-Seite der Kontrollsequenz ein Leserahmen für ein irrelevantes Peptid an, z.B. eine Sequenz, die die Nukleotidfolge AUGAUGUAAUAGUGA enthält, von der ohne Beschränkung auf oder durch die Theorie angenommen wird, dass ihre Aufeinanderfolge von zwei Startcodons und drei verschiedenen Stopcodons

35 wirksam zu Initiation und Beendigung der Translation führt und damit 3'-seitige Leseraster vor Translation schützt, so dass in Abwesenheit des auf die Kontrollsequenz wirkenden Virus- oder Tumorfaktors eine Translation der Effektorsequenz durch einen zusätzlichen Sicherungsmechanismus verhindert wird.

40 Abschließend sei darauf hingewiesen, dass das Hauptaugenmerk der beschriebenen Erfindung auf viralen und neoplastischen Erkrankungen liegt, hinsichtlich des Niveaus der Erreger jedoch nach beiden Seiten offen ist. Der Stand der Technik legt nahe, dass sowohl bei manchen Infektion durch zelluläre Organismen als auch bei Krankheiten durch subvirale Erreger wie Prionen unübliche Genaktivitäten in befallenen Zellen und Geweben auftreten. Auch auf diese können gegebenenfalls

45 die erfindungsgemäßen Substanzen und Verfahren angewendet werden.

Ansprüche

1. Substanz zur Diagnose oder Behandlung eines medizinischen Zustands eines Menschen oder eines nicht-menschlichen Wirbeltiers, der die Expression eines nicht-physiologischen Proteins beinhaltet, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanz eine Nukleinsäure umfasst, die mindestens (I) eine Kontrollsequenz umfasst, die mit einem nicht-physiologisch exprimierten Protein interagiert, um die Replikation und/oder Expression von (II) einer Effektorsequenz zu ermöglichen, deren Replikation und/oder Expression der Manifestation des medizinischen Zustands entgegenwirkt.
2. Substanz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Zustand eine akute oder chronische Virusinfektion oder ein Zustand ist, der kausal mit einer akuten oder chronischen Virusinfektion verbunden ist.
3. Substanz nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die virale Infektion eine Infektion mit einem RNA-Virus ist und die Kontrollsequenz eine Erkennungssequenz für die Replikase des RNA-Virus umfasst.
4. Substanz nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die virale Infektion eine Infektion mit einem Papovavirus ist und die Kontrollsequenz den Promotor der späten Gene des Papovavirus umfasst.
5. Substanz nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass sie (III) das Verpackungssignal des Virus enthält.
6. Substanz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Zustand neoplastisch ist.
7. Substanz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine Effektorsequenz ausgewählt ist aus
 - Gegensequenzen zu dem entsprechenden Virus oder Onkogen;
 - kodierenden Sequenzen für Zelloberflächenproteine, die die Erkennung der Zelle mit unphysiologischer Proteinexpression durch T-Zellen und/oder natürliche Killerzellen erhöhen;
 - Gegensequenzen zu kodierenden Sequenzen für Zelloberflächenproteine, die die Erkennung der Zelle mit unphysiologischer Proteinexpression durch T-Zellen und/oder natürliche Killerzellen hemmen;
 - kodierenden Sequenzen für Interferone, Tumorsuppressor-Gene und/oder pro-apoptotische Proteine;
 - Gegensequenzen zu kodierenden Sequenzen für anti-apoptotische Proteine;
 - kodierenden Sequenzen für DNAsen, RNAsen und/oder Proteasen;
 - kodierenden Sequenzen für immunogene Proteine;
 - kodierenden Sequenzen für Enzyme, die in der Lage sind, ein unwirksames Prodrug in ein antiviral, antineoplastisch oder anderweitig therapeutisch wirksames Medikament umzuwandeln;
 - kodierenden Sequenzen für Antikörper oder antikörperähnliche Proteine;
 sowie Fusionen der oben genannten mit einander oder anderen Sequenzen.
8. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Diagnose oder Behandlung eines medizinischen Zustands eines Menschen oder eines nicht-menschlichen Wirbeltiers, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Substanz nach Anspruch 1 und Liposomen umfasst.
9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Virus das Covid-19-Virus ist; die Nukleinsäure eine RNA ist, die eine Sequenz mit der folgenden Struktur umfasst: I. Die Erkennungssequenz für die Replikase des Covid-19-Virus; II. Die Verpackungssequenz des Covid-19-Virus; III. Eine zweite Instanz der Erkennungssequenz für die Replikase des Covid-19-Virus; IV. Eine kodierende Sequenz für das CD48-Protein; V. Eine dritte Instanz der Erkennungssequenz für die Replikase des Covid-19-Virus; VI. Eine siRNA für das E-Protein des Covid-19-Virus; und die Liposomen positive Oberflächenladungen umfassen.
10. Verfahren zur Entwicklung einer Substanz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es die Auswahl der Effektorsequenz aus einem Pool von Kandidaten durch den „Shotgun-Ansatz“ und den vierfachen Vergleich der zytolytischen Aktivität von T-Zellen und/oder NK-Zellen in An- und Abwesenheit der Substanz und in An- und Abwesenheit des Virus umfasst.

Zusammenfassung

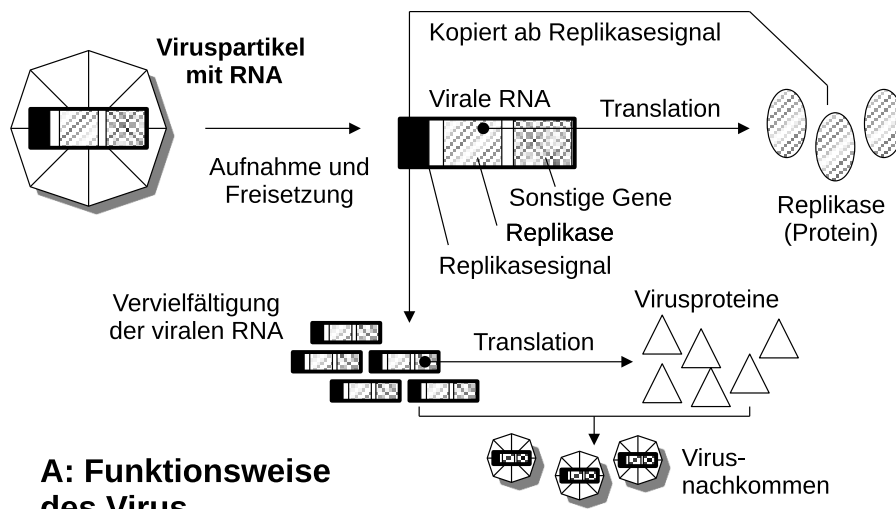
Die vorliegende Erfindung betrifft eine Substanz zur Behandlung einer viralen und/oder neoplastischen Krankheit, wobei der intrinsische molekulare Mechanismus der Krankheit ausgenutzt wird, um

5 in und nur in betroffenen Zellen Gegenmechanismen zu aktivieren, um den Krankheitsprozess selbst zu stören und/oder die Sichtbarkeit der betroffenen Zellen für das Immunsystem zu erhöhen, indem die Substanz ein Element umfasst, das in Gegenwart der viralen und/oder neoplastischen Krankheit stark transaktiviert wird. Die zugrundeliegende Aufgabe besteht in der Bereitstellung einer Entwick-

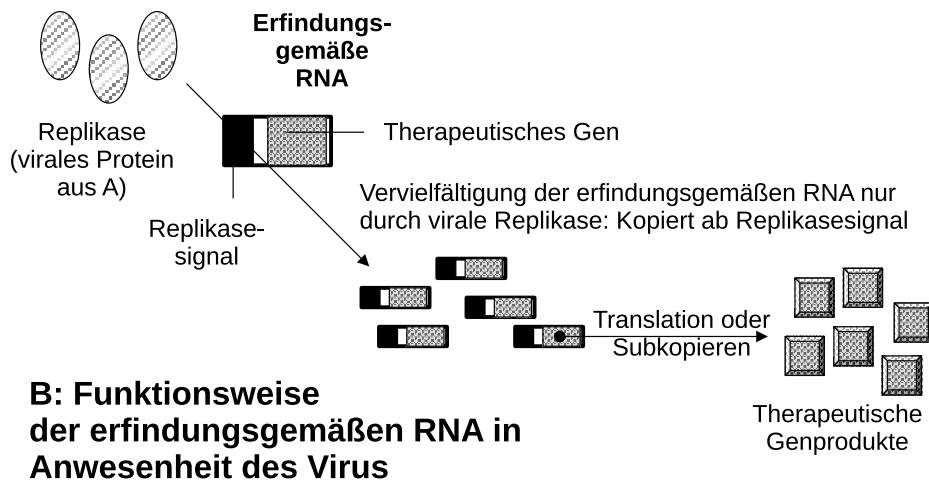
10 kurative Behandlung für jede neu identifizierte Viruserkrankung zu schaffen, um sie zu heilen oder zu lindern, die Symptome zu reduzieren, das Überleben des Patienten zu verlängern oder wahrscheinlicher zu machen, bleibende Schäden zu vermeiden oder zu verringern und/oder die Ausbreitung einer neuartigen Krankheit zu reduzieren, anstatt gesunde Menschen vor einer Infektion zu schützen, und wird gelöst durch eine funktionell zweiteilige Nukleinsäure, die einen Effektor und einen Kon-

15 trolschalter für denselben umfasst, wobei der Kontrollschalter die unabhängige Anwesenheit spezifischer viraler oder neoplastischer Elemente innerhalb der Zelle erfordert, um den Effektor freizusetzen.

Zeichnungen

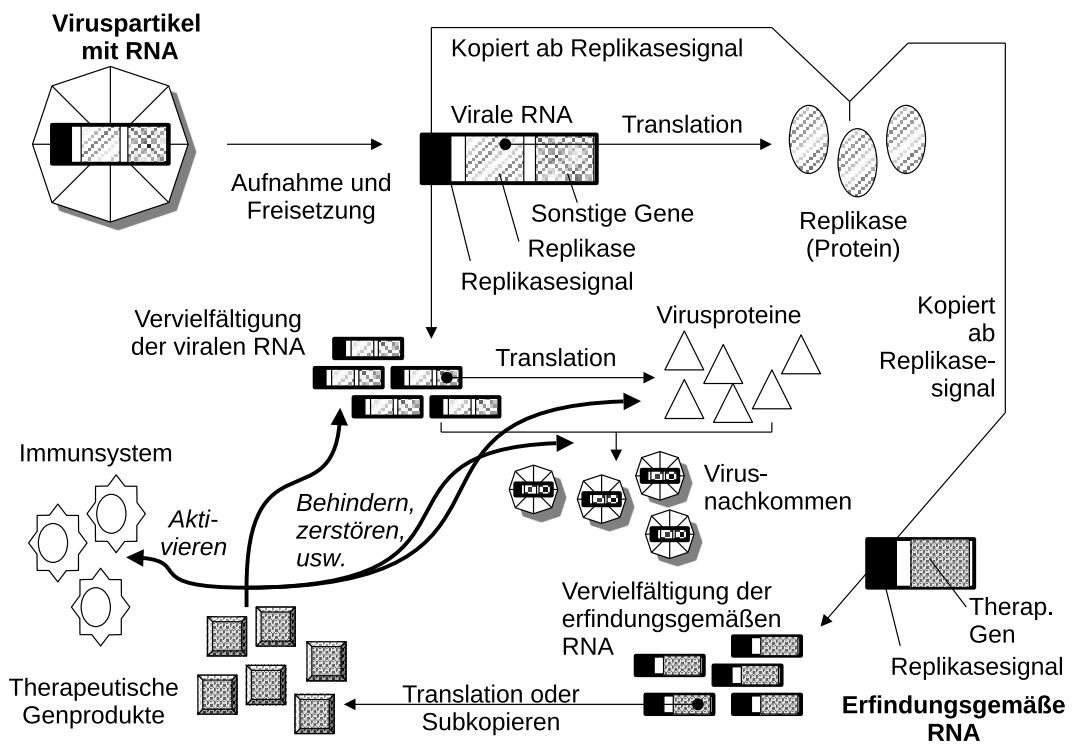


A: Funktionsweise des Virus

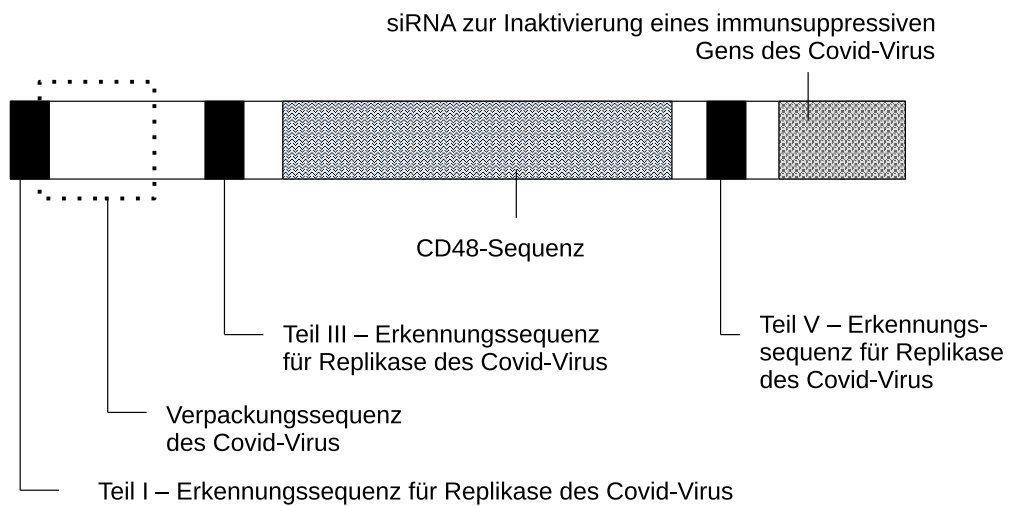


B: Funktionsweise der erfindungsgemäßen RNA in Anwesenheit des Virus

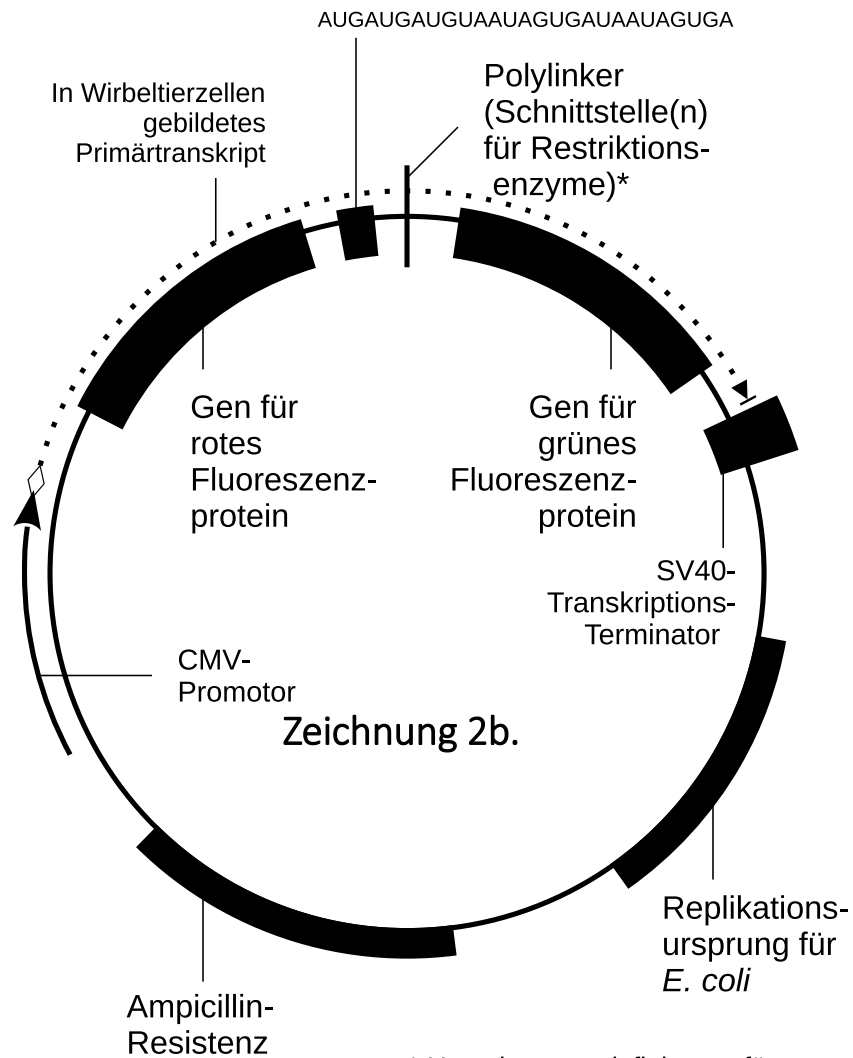
Zeichnung 1a.



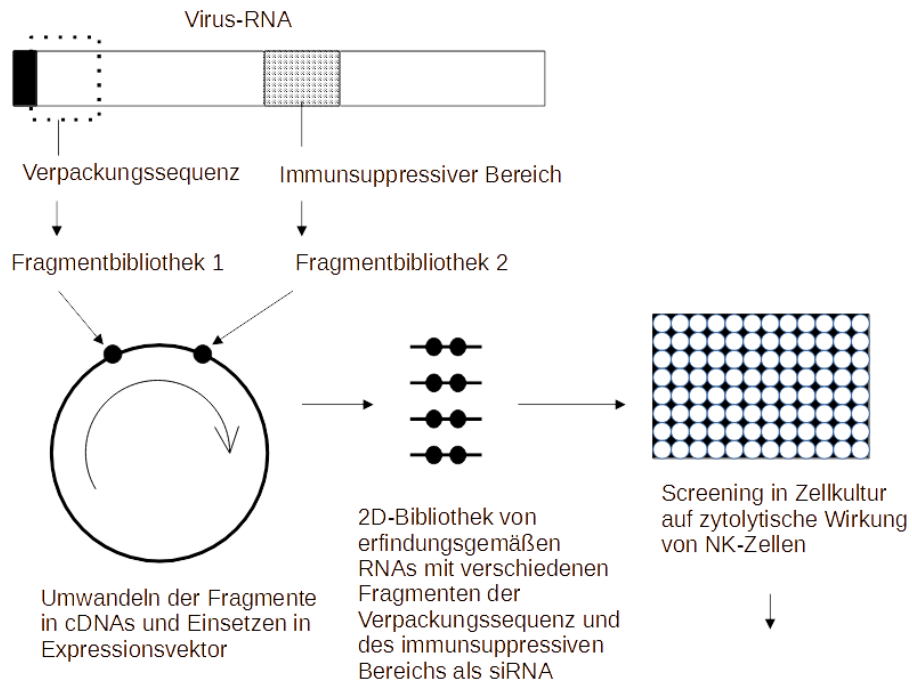
Zeichnung 1b.



Zeichnung 2a.

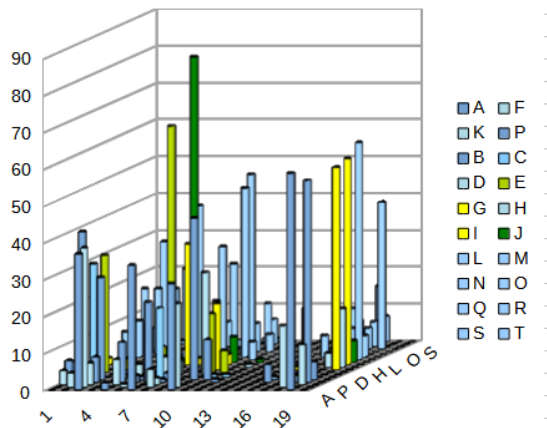


* Umgeben von definierten, für PCR und Sequenzierung geeigneten Sequenzen.



Zeichnung 3a.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
1	0	5	2	0	0	0	0	1	2	0	4	0	7	0	0	6	2	0	0	2
2	0	0	31	19	32	4	0	1	3	0	0	0	10	18	0	41	6	5	3	2
3	37	28	0	0	3	38	3	1	0	0	6	0	18	30	7	0	16	1	20	
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	2	0	0	3	2	0	0	0	5	4	7	0	0	0	4	11	0	0	6	0
6	0	1	1	0	0	1	2	0	0	1	2	3	0	0	2	2	0	0	0	0
7	34	0	19	5	67	0	2	0	33	83	0	42	10	0	14	22	28	7	22	0
8	0	2	1	4	0	5	0	0	2	2	2	3	0	0	0	1	0	2	1	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
10	29	44	0	28	16	23	18	3	3	7	0	0	46	49	8	0	0	12	7	1
11	0	11	1	0	6	0	0	0	0	0	0	5	0	0	5	0	0	0	0	0
12	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	1	0	5	10	0	1	5	7	0	0	0	6	0	12	5	3	15	10	6
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	2	19	0	0	17	0	4	1	12	1	0	8	0	0	2	6	7	16	7
19	59	5	0	0	0	0	55	16	56	6	11	59	6	0	0	55	40	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



Zeichnung 3b.