

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-520221

(P2007-520221A)

(43) 公表日 平成19年7月26日(2007.7.26)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 N 9/22</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 9/22		4 B O 5 0
<b>G O 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N 33/53	M	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁)

(21) 出願番号	特願2006-551320 (P2006-551320)	(71) 出願人	501425360 ニュー・イングランド・バイオラプズ・インコーポレイティッド New England Biolabs, Inc. アメリカ合衆国 01938-2723 マサチューセッツ州 イプスウィッチ カントリー・ロード 240
(86) (22) 出願日	平成17年1月21日 (2005.1.21)	(74) 代理人	100089118 弁理士 酒井 宏明
(85) 翻訳文提出日	平成18年9月25日 (2006.9.25)	(72) 発明者	マイナ, クロード, ヴィ. アメリカ合衆国, 01985 マサチューセッツ州, ウェスト ニュープリー, メイン ストリート 837
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/002029		
(87) 国際公開番号	W02005/072272		
(87) 国際公開日	平成17年8月11日 (2005.8.11)		
(31) 優先権主張番号	60/538, 805		
(32) 優先日	平成16年1月23日 (2004.1.23)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/543, 880		
(32) 優先日	平成16年2月12日 (2004.2.12)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/572, 240		
(32) 優先日	平成16年5月18日 (2004.5.18)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

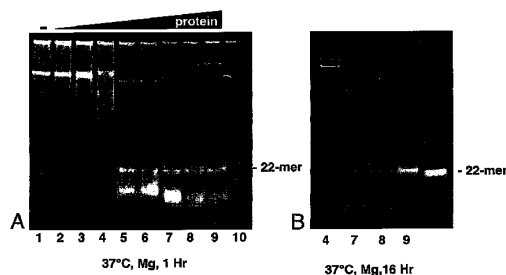
(54) 【発明の名称】 突然変異RNA分解酵素を用いた短い二重鎖RNAの組成物および製造方法

(57) 【要約】

h s i RNA混合物を調製し、遺伝子発現をイン・ピボで沈黙化する組成物および方法が提供される。組成物は尻にRNA分解酵素I I Iに関する。方法はd s RNAの調製物を有効量の変異RNA分解酵素I I Iと反応させてh s i RNA混合物を製造することを対象とする。

【選択図】 図3

RNase Activity of E38A



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

h s i R N A 混合物を調製する方法であって、二本鎖 R N A ( d s R N A ) の調製物を有効量の変異 R N A 分解酵素 I I I と反応させて前記 h s i R N A 混合物を生成することを含む方法。

## 【請求項 2】

前記変異 R N A 分解酵素 I I I はマグネシウムバッファまたはマンガンバッファに含まれていることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記変異 R N A 分解酵素 I I I は大腸菌 R N A 分解酵素 I I I の E 3 8 に対応する位置に変異を有することを特徴とする、請求項 2 に記載の方法。 10

## 【請求項 4】

前記変異は大腸菌 R N A 分解酵素 I I I の E 3 8 A、E 3 8 T、E 3 8 W または E 6 5 A であることを特徴とする、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 5】

h s i R N A 混合物の形成方法であって、  
大きい d s R N A を変異 R N A 分解酵素 I I I と有効時間の間結合させて前記大きい d s R N A を切断して前記 h s i R N A 混合物を形成し、  
( i ) ゲル電気泳動により決定されるように前記大きい d s R N A の少なくとも 9 0 % が切断され、かつ 20

( i i ) 前記 h s i R N A 調製品を構成する前記切断された d s R N A の少なくとも 3 0 % が 1 8 ~ 3 0 n t のフラグメントサイズを有する方法。

## 【請求項 6】

前記有効時間は約 1 分間 ~ 2 0 時間であることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記工程 ( i ) および ( i i ) は 2 0 分後に達成されることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記工程 ( i ) および ( i i ) は 5 時間後に達成されることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。 30

## 【請求項 9】

前記工程 ( i ) および ( i i ) は 1 0 時間後に達成されることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記変異 R N A 分解酵素 I I I は E 3 8 A または E 6 5 A であることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記大きい d s R N A は少なくとも 5 0 n t の長さを有することを特徴とする、請求項 1 および 5 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 12】

対象遺伝子の遺伝子発現の下方制御方法であって、  
( a ) 大きい d s R N A の調製品から変異 R N A 分解酵素 I I I を用いて d s R N A フラグメントを含有する非均質 s i R N A 混合物を調製すること、  
( b ) 前記 s i R N A 混合物から選択された d s R N A に対象遺伝子から転写された m R N A を分解させること、および  
( c ) 前記対象遺伝子の遺伝子発現を下方制御することを含む方法。 40

## 【請求項 13】

前記変異 R N A 分解酵素 I I I は E 3 8 A または E 6 5 A であることを特徴とする、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 14】

工程 ( a ) および ( b ) の少なくとも一方はイン・ピトロで起きることを特徴とする請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

工程 ( a ) および ( b ) の少なくとも一方はイン・ピボで起きることを特徴とする請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記前記イン・ピボ工程は真核細胞内で起きることを特徴とする、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記真核細胞は哺乳類に 1 つ以上の対象遺伝子の発現を低減すると表現型変化を引き起こすように存在することを特徴とする、請求項 1 6 に記載の方法。 10

【請求項 1 8】

前記表現型変化は哺乳類における病気の診断を提供することを特徴とする、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記表現型変化は前記哺乳類における所望の特徴の向上であることを特徴とする、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記表現型は選択された表現型に対して診断的であることを特徴とする、請求項 1 6 に記載の方法。 20

【請求項 2 1】

遺伝子発現の下方発現は遺伝子生産物が機能する生化学的経路を分析するツールであることを特徴とする、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記生化学的経路はさらに診断試薬と組み合わせてさらに分析することができることを特徴とする、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記診断試薬は 1 種以上の抗体であることを特徴とする、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記真核細胞は非ヒト動物中に存在するものであることを特徴とする、請求項 1 6 に記載の方法。 30

【請求項 2 5】

前記真核細胞は前記 DNA 配列を含有する受精卵細胞から創出される遺伝子同導入動物の成分であることを特徴とする、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記工程 ( a ) はさらに第 1 の h s i R N A 遺伝子表現を下方制御するために第 1 の h s i R N A 混合物を 1 つ以上の追加の h s i R N A 混合物と結合することを含むことを特徴とする請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 2 7】

個々の s i R N A フラグメントを h s i R N A 混合物から選択し、前記個々の s i R N A フラグメントを遺伝子表現下方制御のために真核細胞内に導入することをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 2 に記載の方法。 40

【請求項 2 8】

前記調製品の少なくとも 30 % が 18 ~ 30 n t のサイズのフラグメントを用いてなり、前記調製品は 10 を越える異なるシーケンスのフラグメントを含み、前記調製品は細胞における対象遺伝子表現を下方制御することが可能であり、前記対象遺伝子は A k t 1 , 2 , 3 , E r k 1 , 2 , M s k 1 , p 3 8 , I R S 1 , P K R , p T E N , C R E B , E R a , E r b , D A X , p 5 3 , D N M T 1 , D n M T 3 B , D n M T 3 A , T R I P , R b , M e C p 2 , カスパーゼ ( C a s p a s e ) 3 , L a , F u r i n , E G F P , R F F P , F f l u c およびレニラ ( R e n i l l a ) からなる群から選ばれる、h s i R N 50

A 混合物。

【請求項 29】

1つ以上の変異を含む変異RNA分解酵素IIIを含む組成物であって、1つの変異が大腸菌のRNA分解酵素IIIのE38に相当する位置に配置され、グルタミン酸(E)がアラニン(A)に変異したものである組成物。

【請求項 30】

さらに大きいdsRNAを含むことを特徴とする、請求項29に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、突然変異RNA分解酵素を用いた短い二重鎖RNAの組成物および製造方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

短い二重鎖RNA(sRNA)を用いたRNA干渉(RNAi)は遺伝子発現を沈黙化(silence)する強力なツールである(特許文献1、特許文献2、特許文献3)。二重鎖RNA(dsRNA)の大きいフラグメントは哺乳類においてインターフェロン(IFN)応答経路の活性化による非特異的応答を導き、翻訳を抑制し、細胞の死をもたらす(非特許文献1および非特許文献2)。sRNAの標準的な生成方法は所定の短いシーケンスの化学的合成に基づいている。この方法のコストが高いことに加えて、RNAi実験に有効な短いシーケンスを予測するのに一般にコンピュータモデルが必要である。

【0003】

マグネシウムイオンバッファの存在下で大きいdsRNAの部分的消化により得られた短い長さのdsRNAの混合物は培養哺乳類細胞系統における同起源(cognate)遺伝子の発現をRNAiを介してロックダウンすることが示されている(非特許文献3)。しかしながら、適切なサイズ範囲の生産物を生じる部分消化を達成することはしばしば困難でありかつ時間のかかるプロセスであり、所望のサイズのフラグメントを得るのにゲル分離を必要とする。さらに、出発物質に含まれている全ての可能なシーケンスを含むことが保証されない。特許文献4は、引用により本明細書において参照されるが、遷移金属イオンの存在下でRNA分解酵素IIIが遺伝子沈黙化(silencing)に適したサイズのフラグメントの非均質な混合物をどのようにして生成することが可能であるかについては記載していない。これはsRNAフラグメントを作製する既存の方法に対する顕著な改善である。

【0004】

【特許文献1】国際出願公開第01/29058号パンフレット

【特許文献2】国際出願公開第01/68836号パンフレット

【特許文献3】国際出願公開第01/75164号パンフレット

【特許文献4】米国特許出願公開第2004-0038278号明細書

【非特許文献1】Yang等著「モレキュラー・セル・バイオロジー」第21巻第7807-7816頁(2001年)[Yang et al., Mol. Cell Biol. 21: 7807-7816(2001)]

【非特許文献2】ウィアンニ二等著「ナチュラル・セル・バイオロジー」第2巻第70-25、25-33頁(2000年)[Wianny, et al., Nat. Cell Biol. 2: 70-25, 25-33(2000)]

【非特許文献1】Yang等著「プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス」米国第99巻第9942-9947頁(2002年)[Yang et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. 99: 9942-9947]

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

10

20

30

40

50

しかしながら、方法論の自由度を向上させて、例えば実験者の都合により決定される広い範囲内で変化し得る非臨界的培養時間を可能にし、および/または非均質 s i R N A 混合物を創出するのに用いられるバッファの範囲を広げることを許容するようにすることが望ましい。

【課題を解決するための手段】

【0006】

一実施形態において、本発明は、非均質 s i R N A ( h s i R N A ) 混合物を調製する方法であって、 d s R N A を有効量の変異 R N A 分解酵素 I I I と反応させて h s i R N A 混合物を生成する工程を含む方法を提供する。

【0007】

本明細書において記載したいかなる実施形態においても、変異 R N A 分解酵素 I I I は、例えば大腸菌 R N A 分解酵素 I I I の E 3 8 に対応する位置、例えば E 3 8 A、E 3 8 T、E 3 8 W における変異、または大腸菌 R N A 分解酵素 I I I の E 6 5 に対応する位置、例えば E 6 5 A における変異を特徴としている。

【0008】

本発明の一実施形態では、h s i R N A の調製品形成方法であって、大きい d s R N A を変異 R N A 分解酵素 I I I と有効時間結合させて前記大きい d s R N A を切断して h s i R N A 調整品を形成することを含み、( i ) ゲル電気泳動により決定されるように前記大きい d s R N A の少なくとも 9 0 % が切断され、かつ ( i i ) 前記 h s i R N A 調整品を構成する前記切断された d s R N A の少なくとも 3 0 % が 1 8 ~ 3 0 n t (ヌクレオチド) のフラグメントサイズを有する方法が提供される。有効時間は約 1 分 ~ 2 0 時間、例えば 1 0 分以上、5 時間以上または 1 0 時間であってもよい。

【0009】

本明細書に記載のいずれの実施形態においても、前記大きい d s R N A は少なくとも約 5 0 n t の長さを有する。

【0010】

本発明の一実施形態では、対象遺伝子の遺伝子発現の下方制御方法であって、( a ) 大きい d s R N A の調製品から変異 R N A 分解酵素を用いて d s R N A フラグメントを含有する非均質 s i R N A 混合物を調製すること、( b ) 前記 s i R N A 混合物から選択された d s R N A に対象遺伝子から転写された m R N A を分解させること、および ( c ) 前記対象遺伝子の遺伝子発現を下方制御することを含む方法が提供される。工程 ( a ) および ( b ) の少なくとも 1 つはイン・ピボで起きるようにすることができる。それらの場合、前記イン・ピボ工程は真核細胞内行われ、前記真核細胞は哺乳類、または、より一般的には人以外の動物内に、1 つ以上の対象遺伝子の発現を低減すると表現型変化を引き起こすように存在することが可能である。表現型変化は哺乳類における病気の診断を提供することが可能であり、または選択された表現型に対して診断的であることが可能である。遺伝子発現の下方制御は遺伝子生産物が機能する生化学的経路を分析するツールとして使用することができる。この生化学的経路はさらに診断試薬、例えば 1 つ以上の抗体である診断試薬と組み合わせてさらに分析することが可能である。

【0011】

本発明の一実施形態では、上述の方法の工程 ( a ) は、さらに、遺伝子表現を下方制御するために第 1 の h s i R N A 混合物を 1 つ以上の追加の h s i R N A 混合物と組み合わせることを含んでもよい。

【0012】

本発明の一実施形態では、個々の s i R N A フラグメントを h s i R N A 混合物から選択し、前記個々の s i R N A フラグメントを遺伝子表現下方制御のために真核細胞内に導入する方法が提供される。

【0013】

本発明の一実施形態では、h s i R N A 調製品が提供され、この調製品では前記調製品の少なくとも 3 0 % が 1 8 ~ 3 0 n t のサイズのフラグメントを用いてなり、前記調製品

10

20

30

40

50

は10を越える異なるシーケンスのフラグメントを含み、前記調製品は細胞における対象遺伝子表現を下方制御することが可能であり、前記対象遺伝子はAkt1, 2, 3、Erk1, 2、Msk1、p38、IRS1、PKR、pTEN、CREB、Era、Erbb、DAX、p53、DNMT1、DnMT3B、DnMT3A、TRIP、Rb、MeCp2、カスパーズ(Caspase)3、La、Furin、EGFP、RFP、Fflucおよびレニラ(Renilla)からなる群から選ばれる方法が提供される。

【0014】

本発明の一実施形態では、1つ以上の変異を含む変異RNA分解酵素IIIを含む組成物であって、1つの変異が大腸菌のRNA分解酵素IIIのE38に相当する位置に配置され、グルタミン酸(E)がアラニン(A)に変異したものである組成物が提供される。この組成物はさらに大きいdsRNAを含んでいてもよい。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

本発明者はマグネシウムイオン(図3~11)またはマンガンイオンを含む標準バッファの存在下でRNA分解酵素III変異体を用いた消化により遺伝子発現を有効に沈黙化するのに適したdsRNAフラグメントの選択的生成を報告する。異なるタイプの変異体は、RNA結合または切断残基を変える単一点変異と、二点変異体を含むものとして記載されている。マンガン含有バッファ(米国特許出願公開第2004-0038278号明細書)中の野生型RNA分解酵素IIIに対して記載された活性に匹敵または改善された活性を有する変異体の例は図面(図12)および実施例(例えば実施例1参照)に提供される。

20

【0016】

変異RNA分解酵素IIIは組換により高収率で製造することができる。これらの酵素は使用するのが便利であるが、その理由としては：基質と一緒に酵素をインキュベートする時間は臨界的に重要ではないこと、および酵素はそれぞれの使用のための特定の濃度を決定するために滴定する必要がないことが挙げられる。これらの特徴により変異RNA分解酵素IIIは高処理量反応に特に有効である。変異RNA分解酵素III消化後に得られるdsRNA生産物はここに遺伝子沈黙化に有効であることが示された。

【0017】

ここに、野生型または活性変異RNA分解酵素IIIを不活性変異体(E117D)と混合すると図13~図16に示されるように拡散サイズラダーを形成することができる。図13において、E38A変異RNA分解酵素IIIおよびE117DをプレートDNAと反応させて種々のサイズの生産物を生成する。これはE117Dがプレートに結合するが基質を切断してE38A用の潜在的な切断サイトをブロックすることはないからである。この効果は図14に示される。同様に、野生型RNA分解酵素IIIおよびE117Dと一緒に混合すると、異なるサイズのフラグメントのラダーが観察される(図16)。

30

【0018】

明細書および任意の請求項において使用されている下記の用語は以下に定義される。これらの定義はこれらの用語が用いられている文脈が別様であることを必要としない限り適用されるべきである。

40

【0019】

「hsiRNA混合物」は、遺伝子発現を沈黙化するのに適した少なくとも1つのフラグメント(sRNA)を含む短い二本鎖RNAフラグメントの非均質(h)混合物をいう。hsiRNA混合物のRNAフラグメントは一貫して、エチジウム染色生(native)ポリアクリルアミドゲル分析により決定した18~25塩基対の長さを有するかなりの部分(フラグメントの総数の約15%より大きい)を含む。25ヌクレオチドより大きいかまたは18ヌクレオチドより小さいフラグメントの存在は除外されない。hsiRNA混合物は「大きい」dsRNAを変異RNA分解酵素IIIで消化することにより得るのが好ましい。

50

## 【0020】

「沈黙化 (Silencing)」は細胞内の遺伝子発現を標的阻害することにより部分的または完全に機能喪失させることをいい、「ノックダウン (knock down)」ともいわれる。場合によって、および対応すべき生物学的課題に応じて、遺伝子発現を部分的に低減するのが好ましいことがある。あるいはまた、遺伝子発現をできるだけ低減するのが望ましいことがある。沈黙化の程度は当技術において既知の任意の方法により決定することが可能であり、それらの方法のあるものは引用により本明細書において参照される国際出願公開第99/32619号パンフレット中にまとめられている。検定に応じて、遺伝子発現の定量により種々の量、例えば10%、33%、50%、90%、95%または99%よりも大きい量の阻害の検出が可能になる。

10

## 【0021】

「大きい二本鎖RNA (large double-stranded RNA)」は約40塩基対 (bp) よりも大きい、例えば100bp以上、特に300bpよりも大きい二本鎖領域を有する任意のdsRNAまたはヘアピンをいう。大きいdsRNAの配列は1つ以上のmRNAまたは全RNAの1つ以上のセグメントを表すものであってもよい。大きいdsRNAの最大サイズはここでは限定されない。dsRNAは修飾された塩基を含んでいてもよく、この修飾はリン酸糖骨格にまたはヌクレオチドになされていてよい。そのような修飾としては窒素またはイオウヘテロ元素または当技術において既知の任意の修飾を挙げることができる。dsRNAは酵素的に、組換え技術により、および/または化学合成により、あるいは市販のキット例えばメガスクリプト (MEGASCRIPT (登録商標) (アンピオン社、テキサス州オースチン市) および当技術において既知の方法を用いて作製することができる。本発明の一実施形態では、大きいdsRNAを作製するのにハイスクライプ (HiScribe™) (ニュー・イングランド・バイオラプズ・インコーポレイテッド、マサチューセッツ州ビバリー市) が使用される。大きいdsRNAを作製し保存する他の方法が国際出願公開第99/32619号パンフレットに記載されている。

20

## 【0022】

二本鎖構造はヘアピンやマイクロRNAに生じるような自己相補的RNA鎖により、または2つの異なる自己相補型RNA鎖により形成することができる。

## 【0023】

hsRNA混合物の文脈における「非均質」は、RNA分解酵素IIIまたはその変異体で切断した後の単一の大きいdsRNAまたは大きいdsRNAの混合物から生成された同一でない配列を有するdsRNAフラグメントをいう。これらのフラグメントは集合的に大きいRNAの全長からの配列を含み、それ故非均質な混合物を形成する。

30

## 【0024】

「RNA分解酵素III」は天然の酵素またはその組換え体をいう。dsRNA特異的エンドヌクレアーゼのRNA分解酵素IIIファミリーは高度に保存された9アミノ酸ストレッチがRNA分解酵素IIIシグナチュア・モチーフ (signature motif) として知られる触媒センターに存在することを特徴としている (下記参照)。変異体も誘導体もこの定義に含まれる。ここに記載されているバクテリアRNA分解酵素IIIの哺乳類細胞において沈黙化を達成する用途を持つことにより、共通の特徴的コンセンサス配列の存在に基づいて、本実施形態において真核生物、原核生物、ウイルスまたは始原細菌 (archaea) 由来のRNA分解酵素を使用することの根拠を与えている。本発明の実施形態は1つより多いRNA分解酵素を使用してRNAフラグメント混合物を調製することを除外していない。ここでは、RNA分解酵素がアミノ酸コンセンサス配列 [DEQ][kRQT][LM]E[FYW][LV]GD[SARH] (PROSITE: RNA分解酵素III用のPD0C00448資料) を含む任意のRNA分解酵素を使用することができる。理論に拘束されるつもりはないが、ここで示唆されることは、このタイプのRNA分解酵素IIIには基質RNAに特異的に接触する領域があるということである。この領域は4つの特異的アミノ酸を含み、ここでは、この領域の少なくとも1つの特

40

50

定のアミノ酸が変異すると dsRNA フラグメントを生成するための RNA 分解 III の活性が増加することが示されている。図 1 は RNA 分解酵素の特徴的機能を示し、図 2 は異なる出所の RNA 分解酵素に保存された配列を示し、図 1 2 は本出願人により試験された RNA 分解酵素 III の異なる領域における種々の変異を示す。

#### 【0025】

変異体に対する名称指定は特定の RNA 分解酵素単離物におけるアミノ酸位置により割り当てられる。これらのアミノ酸位置は出所の異なる RNA 分解酵素 III 同士の間で変えることができる。例えば大腸菌における E38 は超好熱細菌 (*Aquifex aeolicus*) における E37 に対応する。大腸菌における位置 E38 と超好熱細菌における位置 E37 は上記のコンセンサス配列の第 1 のアミノ酸位置に対応し、公開データベースからの RNA 分解酵素 III のアミノ酸配列をそれらのコンセンサス配列により整理することにより決定される。本発明の実施形態は実際の数に限定されるものではない。好ましい実施形態は RNA 分解酵素 III のコンセンサス配列におけるアミノ酸の相対的位置に言及している。

10

#### 【0026】

RNA 分解酵素 III における変異は点変異、追加、欠失 (切断ドメインではないことが好ましい)、再配置 (ドメイン結合領域内であることが好ましい) のいずれにも言及している。変異は RNA 分解酵素 III タンパク質の単一のサイトまたは複数のサイトのいずれにおいてもよい。変異はランダム突然変異生成および標的遺伝学を含む標準的技法により生成することができる。実施例 1 は変異体の作製に対する一つのアプローチを与えるが、このアプローチは限定的であることを意図したものではない。

20

#### 【0027】

変異体の例としては、23bp 生産物を生成した E38A、E38T、E38W および E65A が挙げられる。ゲル電気泳動により決定された E65A、E38T、E38W は 16 時間インキュベーションにおける安定性 (図 11 参照) に関して E38A とは異なるが、dsRNA フラグメントの生成においては野生型 RNA 分解酵素 III と少なくとも同程度に有効であった。E38A、E38T、E38W および E65A 変異体は Mg<sup>2+</sup> バッファにおいて野生型 RNA 分解酵素 III と比べて 23bp 生産物の収率が増加した。理論に拘束されるつもりはないが、ここでは、E38A が dsRNA テンプレートを結合および切断しそのため dsRNA 生産物から容易に分離されないことが想定される。この複合体は比較的安定であり、dsRNA 生産物は RNA 分解酵素 III、野生型 (wt) または変異体、によるさらなる切断に利用できない。このことが変異体 RNA 分解酵素 III の消化が、全サンプルが 11nt フラグメントのような小さなフラグメントに切断されることなく、一夜行うことが可能であることの説明になるであろう。

30

#### 【0028】

「完全消化」は、約 30 塩基対よりも大きなサイズの dsRNA のフラグメント (装荷ウェル内に保持されたまたは酵素に結合された消化された材料を除く) がエチジウムブロマイド染色 20% ポリアクリルアミドゲル上で容易に検出されないような低濃度である RNA 分解酵素 III 反応をいう。

#### 【0029】

「宿主細胞」は培養真核細胞またはヒトを含む哺乳類のような脊椎動物および昆虫のような無脊椎動物を含む動物の細胞をいう。宿主細胞はまた植物および微生物由来の細胞もいう。

40

#### 【0030】

「重複 (Overlapping)」は、2 つの RNA フラグメントが 1 本鎖上の複数のヌクレオチドで重複する配列を有する場合、例えば、複数のヌクレオチド (nt) 数が 2 ~ 5 ヌクレオチドと少数または 5 ~ 10 ヌクレオチド以上の場合をいう。

#### 【0031】

「相補的配列」は当該配列がハイブリッド形成する配列と 100% 同等である必要はないが、特定の核酸にストリンジェントな条件でハイブリッド形成することが可能である配

50

列をいい、この場合、ストリンジェントな条件としては、400 mM NaCl、40 mM PIPES pH 6.4、1 mM EDTA、50 または 70 、12 ~ 16 時間反応させた後水洗することを含む。配列変動は、遺伝子突然変異、株多型性、進化的分岐 (evolutionary divergence) または化学的修飾により起きるもののように、許容し得る。

【0032】

メッセンジャーRNAの「部分または全部」はメッセンジャーRNA (mRNA) の大きいdsRNAに相補的である部分をいう。

【0033】

「実質的部分」は、hsiRNA混合物中に含まれる配列に表される大きいdsRNAの配列の量をいう。一実施形態では、代表的配列は20%より大きい。他の実施形態では、代表的配列は30%、40%、50%、60%、70%、80%または90%よりも大きくてもよい。

【0034】

「1つ以上のdsRNA」は配列が相互に異なるdsRNAをいう。

【0035】

「対象遺伝子またはmRNA」は関心のある任意の遺伝子またはmRNAをいう。実際、遺伝学または配列決定により先に同定されている遺伝子のいずれかを対象として表すことができる。対象遺伝子またはmRNAとしては発生遺伝子および制御遺伝子並びに代謝または構造遺伝子、あるいは酵素をコードする遺伝子を挙げることができる。対象遺伝子は表現型を調査している細胞または生体において表現型特徴に直接または間接的に影響を与えるように発現させることが可能である。対象遺伝子は内生的、または外生的のいずれであってもよい。そのような細胞としては成体または配偶子を含む胚性動物または植物の任意の細胞、あるいは例えば不死の細胞系統や一次細胞培養に生じるような任意の単離細胞が挙げられる。

【0036】

「安定な調製品」という用語は本明細書および特許請求の範囲において変異RNA分解酵素IIIの存在下で切断されるテンプレートdsRNAの調製品であって出発物質の少なくとも30%が約18~30 nt、特に約21~23 ntのサイズを有するフラグメントに切断され、切断生産物が2時間より長く、特に5時間、さらに16時間安定であることを記載するのに用いられている。安定性はサイズプロファイルおよび特定の時間におけるゲル上のRNA分解酵素III反応生成物の量に検知し得る変化が存在しないことに関する。安定性は変異体RNA分解酵素生成物を野生型RNA分解酵素III反応生成物と比較することにより観察される相対的尺度であってもよい。

【0037】

hsiRNA混合物を脊椎動物、無脊椎動物、植物またはプロトプラスト細胞、あるいは微生物に導入することは直接細胞内にまたは細胞外から空腔または間質腔内に、生体の循環系内に、経口的に、入浴により、経皮的に、経粘膜ルートにより、局所的にまたはウイルスベクターを使用して宿主にDNAをトランスフェクトすることにより行うことができる。

【0038】

トランスフェクションまたは形質転換の標準的プロトコルを用いてdsRNAを培養細胞内に導入することができ、例えばNEBカタログ(ニュー・イングランド・バイオラプズ・インコーポレイテッド、マサチューセッツ州ビバリー市)のトランスフェクション試薬またはリポフェクタミン2000、オリゴフェクタミン(インビトロジェン社、カリフォルニア州カールスバード市)、トランスイットTKO(TRANS-IT TKO(登録商標))(マイラス(Mirus)社、ウィスコンシン州マジソン市)、ターゲットフェクト(ターゲットィング・システムズ社、カリフォルニア州サンティー市)、リン酸カルシウムまたはエレクトロポレーション(電気穿孔法)を用いるプロトコルである。hsiRNAまたはsiRNA由来のフラグメントを含有する改変されたベクターとしては全生体

をトランスフェクションまたは形質転換するためのバクテリアベクター、プラスミドまたはウイルスベクター改変されたベクターを挙げるができる。遺伝子銃を植物に対して用いて dsRNA を例えば葉緑体内に指向させることも可能である。外来の拡散を生体および細胞内に導入するための方法論は当技術において周知である。dsRNA 混合物を、特定の dsRNA 混合物由来の個々のフラグメントを発現する DNA クローンを介して全体動物に導入することは拡散を導入するための標準的技法を用いて達成することが可能である。

#### 【0039】

本明細書および特許請求の範囲において、単数形で表現されていても、文脈が明かに別様に規定していない限り、単数形に限定されるものではない。

10

#### 【0040】

本発明の方法の利点としては下記の点が挙げられる。

(a) さらなるサイズ分離工程に依存しない急速かつ経済的な方法による遺伝子発現の沈黙化に適したサイズの、高濃度の dsRNA フラグメントを急速に(数分内に)得ること。この方法は複数の重複する dsRNA フラグメントで約 20% 未満が未切断の大きい dsRNA であり、約 30% 超が 18~30 塩基対、特に 21~23 bp のフラグメントサイズを有するものから dsRNA フラグメント調製品を提供する。本方法の好適な実施形態では、大きい dsRNA の 60% もが 21~23 nt のフラグメントに切断される。簡単であるために、このアプローチは自動化および高スループット化しやすい。

(b) 遺伝子沈黙化効果を生じる特定のフラグメントを同定する必要がなく遺伝子沈黙化活性を有する dsRNA フラグメントの調製品を形成すること。ここに、前記調製品はさらに精製することなく長期間既存の酵素的アプローチに関して実質的に安定である。

20

(c) 前記方法の生産物を個々のフラグメントをクローニングし、またはクローンのライブラリもしくはアレイを形成することにより、これらのフラグメントをそれらが由来する RNA に関してマッピングすることを可能にし、並びに個々のフラグメントを遺伝子沈黙化活性について試験してこれらのフラグメントをそれらが由来した RNA に関してマッピングすることを可能にする手段を提供し、ここで、前記ライブラリは必要であればゲノム全体に及ぶものであってもよく、かつ、イン・ピボの用途に対しては、siRNA の連続的供給を提供すること。例えば、siRNA はプラスミドまたはウイルスベクターに導入することが可能である。RNA ウイルス、例えばレンチウイルスは細胞を感染させる手段並びにクローニングベヒクルを提供する。

30

(d) 種々の用途用の dsRNA 試薬を提供すること。それら用途としては、真核細胞または生物の単一の遺伝子または遺伝子のファミリーを沈黙化して核酸に対する標準的なトランスフェクション又は形質転換技法を用いて機能を研究することが挙げられる。

(e) 例えば、対象遺伝子を一意的に表し、ゲノムの他の領域への相同性をできるだけ小さくするように設計された大きい dsRNA 構築物を選択することにより、的外れの効果を合成 dsRNA 調製物と比べて減らすこと。

(f) これらの dsRNA フラグメントを治療剤または治療剤のスクリーニングあるいは対象妥当性確認試験に用いること。

(g) dsRNA フラグメントをコードする DNA をクローニングして、各実験についてデノボ (de novo) 合成の必要がなく、遺伝子沈黙化 dsRNA の連続的またはイン・ピボの調整された供給を提供すること。

40

#### 【0041】

ここに記載された E38A のような RNA 分解酵素 III の他の利点としては、さらに、(i) 対象 mRNA の大部分または全配列に対応するより大きい dsRNA 分子の実質的に完全な消化により生成される dsRNA 生産物の所望のサイズ範囲を得て、有効な対象短配列を選択する必要をなくする能力、(ii) 標準バッファ中でインキュベーションして dsRNA を作製し、それを単一の反応容器内で所望のサイズに切断するのを容易にすること、(iii) 所望のサイズ範囲のフラグメントの野生型 RNA 分解酵素 III に関して収率が向上していること、(iv) 変異酵素を用いて得られたフラグメン

50

トの安定性が標準マグネシウムバッファにおいて野生型RNA分解酵素IIIと比較して向上していること、(v)完全な反応が10分という短い時間で達成でき、少なくとも16時間までのより長いインキュベーション時間は所望の反応生産物を得るのに有害ではないというインキュベーション時間に柔軟性があること、(vi)合成生産物に対して遺伝子沈黙化試薬のコストが低いこと、(vii)反応を多重化する機会およびフラグメントのライブラリを生成する機会があること、(viii)約50bpもの小さいサイズを持つフラグメントから約23bpのdsRNAの多数のランダムに切断されたフラグメントを形成する能力、および(viii)イン・ピボ(細胞培養または全体生物)の大きいdsRNAから、標準的プロトコルを用いてトランスフェクション、感染または注入により変異RNA分解酵素IIIを導入することにより、約23bpのフラグメントを生成する能力が挙げられる。 10

#### 【0042】

直線状dsRNAまたはヘアピンを含む大きいdsRNA分子(約40bpより大きく、少なくとも10kbまで)をフラグメント化すると、沈黙化するmRNAに対応する多数の有効な短い配列(18~30bp)を含む一群の短いRNAが提供される。

#### 【0043】

加えて、ここに記載された方法の利点により、閾値を越える消化時間または酵素使用量を較正する必要がなくなる(図2、3、4および6)。ここで、時間の閾値は数分であり、濃度の閾値は酵素:基質の1:1(w/w)の範囲を含むことができる。ゲル電気泳動または他の面倒な分離方法により不所望の消化生産物を除去する任意的な追加工程を省略して本方法を自動化し易くし、かつ高スループット様式に適したものにすることができる。RNA出発材料はイン・ピトロの酵素転写(NEBカタログ、ニュー・イングランド・バイオラズ・インコーポレイテッド、マサチューセッツ州ピバリー市)により、または化学合成により容易に得ることができ、二本鎖分子または二本鎖ヘアピンを形成する一本鎖RNAであることができる。 20

#### 【0044】

出発材料(大きいdsRNA)の一部分、例えば少なくとも30%、さらに詳しくは40%または50%より大きい部分は変異RNA分解酵素IIIで消化した後のサイズが培養した哺乳類および昆虫細胞における遺伝子沈黙化に適した18~30bp、特に21~23bpの範囲内である。これらのフラグメントも植物、微生物およびヒトを含む動物のような全体生物並びにこれらに由来する培養細胞において遺伝子沈黙化に活性であることが期待される。ダイサー(Dicer)とは異なり、21~23ntの範囲外のサイズを有するフラグメントは遺伝子沈黙化に干渉しない。 30

#### 【0045】

好適な一実施形態では、RNA分解酵素IIIのE38A変異体は標準バッファ(NEBバッファ2、ニュー・イングランド・バイオラズ・インコーポレイテッド、マサチューセッツ州ピバリー市)中37で10分以内に基質の60%も前記好ましいサイズ範囲に変換することが可能である。大きいdsRNAのRNA分解酵素III E38A変異体で消化することによるRNAフラグメントの収率は、例えば、マンガニオンの存在下RNA分解酵素III(wt)を用いて得られる収率の2倍にもなり、マグネシウムイオンの存在下RNA分解酵素III(wt)を用いて得られる収率の約10倍にもなることがある(例えば、図7参照)。 40

#### 【0046】

遺伝子沈黙化の分野における問題の一つは、特定のメッセンジャーRNA、他のRNAまたは遺伝子を有効に標的とする所望の目標を達成することができる短いdsRNA(15~30bp)を同定する問題である。本発明の実施形態では、この問題は対象のすべてまたは一部に同等である配列を有する大きいdsRNAを用い、この大きいRNAを遺伝子の沈黙化に適したサイズの多数の重複するフラグメントに切断することにより解決される。dsRNAの適した配列を切断前に選択することは、例えば、実施例VIのアルゴリズムにより決定することができる。ここで断言されるのは、切断生産物は大きいdsRN 50

Aの全長の代表であることであり、そしてdsRNAフラグメント調製物は昆虫細胞および哺乳類細胞を含む広範囲の細胞における遺伝子沈黙化を可能にすることである。重要なことは、的外れ効果がhsiRNA混合物の使用により最小限になることである。

#### 【0047】

いったんdsRNAフラグメント混合物が得られると、混合物中の個々のdsRNAフラグメントに対応するDNA配列を含むクローンのライブラリを作製することが可能である。適切なプロモーターが提供されると、このクローンまたはそれらの混合物を用いて細胞をトランスフェクションして長期遺伝子沈黙化に使用するための短いdsRNAの連続的供給が提供されるようにすることが可能である。個々のクローンまたはクローンの選択された混合物を対象細胞または生物にトランスフェクション下結果としての遺伝子発現の沈黙化は、例えば治療用途において、細胞をdsRNA自体でトランスフェクションすることにより達成される遺伝子沈黙化効果よりも特段の利点を有することがある。これにより特定の遺伝子の遺伝子発現を特異的に調節する作用物の無制限の供給を提供する治療用途用の新しい試薬が提供される。

10

#### 【0048】

遺伝子沈黙化の特異性

特定の対象mRNA用の遺伝子沈黙化の特異性を、対象mRNAにおける配列のBLAST分析を用いて確認して、RNAの延長領域(11塩基を越える長さ)は他の遺伝子の転写物と同等ではないことが見いだされ、非特異的遺伝子沈黙化を避けることが可能である。

20

#### 【0049】

ここに記載された方法を用いて、遺伝子ファミリーの一成員のみに特異的でありその遺伝子ファミリーの他の成員に由来するmRNを沈黙化しないARN調製物を対象mRNAのセグメントに相補的な配列を持つ長いdsRNA(長いdsRNAセグメントともいわれる)から調製することができる。あるいはまた、遺伝子ファミリーの任意の遺伝子に特異性を有するがこの遺伝子ファミリー外の他の遺伝子に対する特異性を持たないRNA調製物を調製することができる。

#### 【0050】

特異であるか、またはmRNAのファミリーのコンセンサス領域の一部もしくは全部を形成するmRNA配列を対象とすることにより適切な遺伝子沈黙化効果を達成することが可能である。

30

#### 【0051】

変異RNA分解酵素IIIが他の酵素調製物と比べて改善された切断活性を有するかを決定するのに容易に使用することができる検定法は下記のイン・ビボおよびイン・ビトロ試験を含む。

(1)イン・ビボ検定: マーカータンパク質の転写物に相補的配列を有するdsRNAをRNA分解酵素III消化して非均質dsRNAフラグメント調製物を生成する。正常に前記マーカータンパク質を発現する宿主細胞をRNAフラグメント調製物を用いてトランスフェクションし、マーカー表現型の発現の変化を測定してRNAフラグメント混合物を用いたトランスフェクションの結果、発現におけるノックダウン効果が生じたかを確かめる。イン・ビボ検定は、引用により本明細書において参照される米国特許出願公開第2004-0038278号明細書にさらに詳細に記載されている。

40

(2)イン・ビトロ検定: dsRNAをRNA分解酵素III消化し、消化物をアクリルアミドゲルにかけて、選定されたバッファ中で種々のインキュベーション時間において生成されるフラグメントのサイズを決定する。

#### 【0052】

ここに記載された方法は複数dsRNAフラグメント混合物を生成することに適用することも可能であり、次いで、これら混合物は複数の遺伝子を同時に沈黙化するのに使用することができる。追加の用途としては、上流または下流制御領域をdsRNAを用いて標的として発現を調節することが挙げられる。したがって、単一のDNAテンプレートまた

50

は複数の異なるDNAテンプレートから得られる大きいdsRNAの非均質な集団をマグネシウムイオンの存在下に変異RNA分解酵素IIIにより消化することができる。

【0053】

選定されたsiRNAフラグメントを作製するための上述のdsRNAフラグメント混合物またはそれらのクローンの生成は実施例Vに記載されたタイプのキットを用いることにより部分的にまたは全体的に達成することができる。所望の大きいdsRNAを作製、dsRNA混合物を生成、およびそのような混合物で細胞をトランスフェクションする方法のいずれかまたは全部の記載を含む指示書を提供することができる。

【0054】

例示的用途

hsRNAフラグメントが利用できるようになったので所望のロックダウン効果を全体生物において遺伝子治療の欠点なしに達成することができる試薬または治療剤および新規な治療アプローチの供給が提供される。しかしながら、siRNAフラグメントまたはdsRNA混合物を発現するクローンを、対象遺伝子の完全な、調節されたまたは一時的なイン・ビボ沈黙化に用いることが可能である。

【0055】

病原体に由来する遺伝子を阻害の対象にすることができる。例えばこの遺伝子は宿主の免疫抑制を直接引き起こすことができるか、または病原体の複製、病原体の感染または感染の維持に重要であり得る。阻害的RNAを細胞内にイン・ビボまたはエクス・ビボで導入し、次いで生物体内に置いて治療することができ、あるいは生物体を直接イン・ビボ投与により処置することが可能である。遺伝子治療方法を想定することができる。例えば、病原体による感染の危険のある細胞または既に感染した細胞、特にヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症を本発明のRNA導入による処置の対象とすることが可能である。対象遺伝子は病原体または宿主内に病原体が侵入する原因となる宿主遺伝子、病原体または宿主による薬剤代謝、病原体のゲノムの複製または一体化、宿主における感染の確立または拡大、または病原体の次世代の組立であり得る。予防法(すなわち、感染の阻止または危険の低減)並びに感染に関連する症状の頻度および重篤度の低減を想定することができる。

【0056】

本発明の実施形態は固形腫瘍および白血病を含む任意のタイプの癌の治療または治療の開発に適用することができる。

【0057】

本発明の実施形態は以下のように例示される。これらの実施例は本発明の理解のために提供され、本発明を限定するものではない。

【0058】

本明細書に記載されている引用例は、米国仮特許出願第60/538,805号、第60/572,240号および60/543,880号明細書を含め、すべて引用により本明細書の一部を構成するものとする。

【実施例1】

【0059】

大腸菌RNA分解酵素III変異体の調製

大腸菌RNA分解酵素III変異体はすべて(PCRを用いた突然変異誘発により生成されたE117Dを除く)標準2工程PCR縫製技法[「メソツズ オブ エンザイモロジー」第185巻第60~89頁(1990年)(Methods Enzymol. 185: 60-89(1990))]により構築した。ここで用いた他のクローニング技法は当技術において標準的なものであり、サムブルック、ジェイ、フリッチュ、イー、エフ、マニアティス、ティー、著、「分子クローニング:実験室のマニュアル」、コールド・スプリング・ハーバー出版、ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー市1,989年(Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual",

10

20

30

40

50

Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)に見出すことができる。出発プラスミドとして用いたのは、pET16Bにクローニングした大腸菌RNA分解酵素III (EMDバイオサイエンス社、カリフォルニア州サンジエゴ市であり、His-タグ付きRNA分解酵素IIIタンパク質をT7プロモーターの制御下に生成した。

## 【0060】

WT RNA分解酵素III

大腸菌RNA分解酵素IIIをpMalE/RNA分解酵素IIIクローンから下記のプライマーを用いて増幅した：

ACAGGATCCCATGAACCCCATCGTAATTAAT (配列番号1)

ACAGGATCCTCTAGAGTCATTCCAGCTCCAGTTTTT (配列番号2)

## 【0061】

このPCR生産物をBamHIで切断しpET16bのBamHIサイトにクローニングし、His-タグ付きWT RNA分解酵素IIIを合成するプラスミドを得た。このHis-タグ付きWT RNA分解酵素IIIのpET16bにおけるクローンをPCR反応において基質として用いてすべてのアミノ酸置換変異体 (E117Dを除く) を下記のように形成した。

## 【0062】

E38A変異体の形成

E38A変異を有する大腸菌RNA分解酵素III (寄託番号X-02946) のカルボキシ末端半分を構築するのに用いたプライマーは下記である：

CAGTAAACATAACGCGCGTTTAGAAT (配列番号3)

ACAGGATCCTCTAGAGTCATTCCAGCTCCAGTTTTT (配列番号2)

## 【0063】

E38A変異を有する大腸菌RNA分解酵素IIIのアミノ末端半分を構築するのに用いたプライマーは下記である：

AATTCTAAACGCGCGTTATGTTTACT (配列番号4)

TAATACGACTCACTATAGGG (配列番号7)

(NEBプライマーカタログ#1248 (ニュー・イングランド・バイオラズ・インコーポレイテッド、マサチューセッツ州ビバリー市)。

## 【0064】

これら2つのPCR生産物を、次に両者を反応のための基質とプライマーとして用いて一緒に1つのPCR反応で「縫製し」た。得られた生成物をXbaIで切断し、修飾されたpET16bに戻してXbaIサイトにおいてクローニングしてE38A変異を有するHis-タグ付きRNA分解酵素IIIを得た。

## 【0065】

E65A RNA分解酵素IIIの形成

E65A RNA分解酵素IIIを同様の2工程方法で構築した。第1の工程で、His-タグ付きRNA分解酵素IIIプラスミドを2つのPCRで下記のプライマーのセットを用いて増幅した：

CTCGTGTGGATGCAGGCGATATGAGCCGGAT (配列番号5)

ACAGGATCCTCTAGAGTCATTCCAGCTCCAGTfT (配列番号2)

10

20

30

40

50

遺伝子の 3' - 端を増幅。

TCCGGCTCATATCGCCTGCATCCACACGAGGGA (配列番号 6)

TAATACGACTCACTATAGGG (配列番号 7)

遺伝子の 5' - 端を増幅。

【0066】

2つのPCR生産物を次いで次オンPCR反応の基質として用い、I.B.に記載された修飾されたpET16bベクターのXbaIサイトにクローニングした。 10

【0067】

追加のRNA分解酵素IIIの形成

任意の特異点変異を、クローニングした野生型(wt)RNA分解酵素III遺伝子からE38AおよびE65A変異体を作製するのに説明されたものと同様の方法により構築することが可能である。第1の工程で、1つはコーディング鎖用、他方は非コーディング鎖用の2つのプライマーをそれらが所望の変異を選択されたアミノ酸に導入するように設計する。これらのプライマーは十分な長さでスパンを持ち変異を導入するのに必要な不一致が与えられても依然として基質にアニールするようにしている。コーディング鎖用のプライマーはRNA分解酵素III遺伝子のこの領域を増幅する、PCRにおける対向鎖上の適切な下流プライマーと合致される。非コーディングプライマーと対向鎖上の上流の適切なプライマーとを用いて同様のPCRを行いRNA分解酵素III遺伝子の重複する上流フラグメントを得る。これら2つのフラグメントを基質と外部プライマーとして用いてこれら2つのフラグメントを「縫い合わせる」。得られたRNA分解酵素III遺伝子は所望の点変異を含み、適切なベクターに戻してクローニングすることができる。E117Dを除くすべての変異はこのようにして構築した。 20

【0068】

大腸菌RNA分解酵素III遺伝子のE38残基は超好熱細菌(Aquifex aeolicus)RNA分解酵素III遺伝子のE37残基に対応する。同様に、D45はD45に、E65はE64に、E117はE110に対応する。これはいくつかの標準多重配列一致ソフトウェアパッケージにより決定された。対応するアミノ酸残基は任意のRNA分解酵素III遺伝子について同様の方法により決定することができる。 30

【実施例2】

【0069】

RNA分解酵素III変異体の生成と精製

発現と精製

各変異体の培養物30mlとWTクローンを大腸菌ER2566(ニュー・イングランド・バイオラブズ・インコーポレイテッド、マサチューセッツ州ビバリー市)において対数期中程まで成長させ、次いでIPTGを終濃度100mMまで添加することにより誘導し、15で一夜震盪した。誘導された培養物を超音波処理により溶解した。 40

【0070】

RNA分解酵素III変異体を明澄にした溶解物からキアジェン・ニッケル(Qiagen Nickel)樹脂アフィニティー精製(製造元の指示に従う)により精製し、標準的方法により検定した。酵素反応をNEBバッファ2(ニュー・イングランド・バイオラブズ・インコーポレイテッド、マサチューセッツ州ビバリー市)中で37 1時間0.5µgの900bp dsRNAを基質として用いて行った。この反応の生成物を非変成ポリアクリルアミド電気泳動により分析した。

【0071】

0.5µgのMalE dsRNA(ハイスクライブキット(Hiscribe kit)-ニュー・イングランド・バイオラブズ・インコーポレイテッド、マサチューセツ 50

ツ州ビバリー市)をRNA分解酵素III(野生型(wt)および変異体)で20 $\mu$ lの反応混合物における最適条件と矛盾しない範囲で、NEBバッファ2(0.05M NaCl、50mM Tris-HCl、pH7.9、10mM MgCl<sub>2</sub>、1mMジチオスレートル)(ニュー・イングランド・バイオラプズ・インコーポレイテッド、マサチューセッツ州ビバリー市)中で37、1時間消化した。

【0072】

図3Aから分かるように、dsRNAをE38Aで消化した最終生産物は主に約23bp長のdsRNAフラグメントである(レーン7、8および9)。この生産物は1分という短い時間で出現し、反応は10分で「完了した」(図6)。加えて、この23bp生産物は少なくとも16時間安定であり(図3B、レーン7~9)、数日間かけて徐々に消失した(図5)。

【0073】

E65A(図10)の活性はラスチュク、ジェイ、他著、「ストラクチャー」第9巻第1225~1236頁(2001年)(Blaszczak, J., et al. Structure 9:1225-1237(2001))に報告されているものとは正対である。この報文では、著者はRNA分解酵素IIIのE65A変異をRNA分解酵素IIIの機能を無効化するものと記載している。本発明者の検定によると、E65AはE38Aと同様の生産物を精製した(図10、レーン6~8)。しかしながら、この生産物は安定性が低いと考えられ、16時間までに消失した(図10B、レーン4および6)。

【実施例3】

【0074】

培養細胞におけるdsRNA切断と遺伝子沈黙化活性

RNA分解酵素III変異体消化のdsRNA生産物のRNA干渉を誘導する能力を試験するために、米国特許出願公開第2004-0038278号明細書に従うイン・ピボ検定を以下のように行った:ホタルルシフェラーゼをコードするDNA配列から作製されたdsRNAを野生型(wt)RNA分解酵素III(ショートカット(Shortcut)またはE38A変異RNA分解酵素IIIを切断した(図9)。NIH3T3細胞を、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を発現するリポータープラスミド、トランスフェクションコントロールとして作用する他のリポーターおよびdsRNAでトランスフェクションした。リポーターでトランスフェクションしたがdsRNAではトランスフェクションしなかつた細胞、または関係のない消化dsRNAでトランスフェクションした細胞は顕著なルシフェラーゼ活性を示した。

【0075】

野生型または変異RNA分解酵素III由来のhsiRNAでトランスフェクションした細胞はルシフェラーゼ活性がノックダウンされていた。得られた結果を図9に示す。

【実施例4】

【0076】

E38A RNA分解酵素IIIでdsRNAを切断した切断生産物は一組の重複する非均質フラグメントである。

変異RNA分解酵素IIIの短いdsRNA切断生産物は親配列全体を表す配列を含む。これはdsRNA切断生産物をクローニングしdsRNA切断生産物を配列決定することにより、またはテンプレートDNA配列フラグメントにハイブリッド形成することにより決定される。クローニングしたRNA分解酵素III生産物のライブラリの生成は容易に達成される。ここで重複するフラグメントが存在することを示すのに用いられる技法は、引用により本明細書の一部を構成する米国特許出願公開第2004-0038278号明細書に記載されたものと同じである。

【実施例5】

【0077】

hsiRNAを生成するキットおよび哺乳類細胞において遺伝子を沈黙化するためのキット

10

20

30

40

50

d s R N A 混合物をイン・ピボで生成し、任意に R N A フラグメントを哺乳類細胞にトランスフェクションするキットが提供される。

【 0 0 7 8 】

本発明の一実施形態では、各キットは複数の大きい d s R N A を細胞のトランスフェクションのために処理する試薬を含むとともに、使用法の指示を含む。

【 0 0 7 9 】

キットの成分

キットは酵素と任意にベクター、プライマーおよび/またはバッファを含むことができる。キットは以下に示す試薬（それぞれニュー・イングランド・バイオラプズ・インコーポレイテッド（マサチューセッツ州ビバリー市）から得ることができる）の1つ以上を含むことができる。

10

【 0 0 8 0 】

【表 1】

T 7 RNAポリメラーゼ、150単位/μl、	25 μl
10倍バッファ/NTP（下記処方参照）	60 μl
30倍高分子量成分ミックス （HMV）（下記処方参照）	20 μl
B T 7 - 最小プライマー（19量体）、 5' - ビオチン - d C T C G A G T A A T A C G A C T C A C T A T A G G - 3'	
（配列番号26）（10 μM）	25 μl
10倍変異RNA分解酵素III（1.4 μg/μl）	100 μl
10倍h s i RNAバッファ（下記処方参照）	
10倍EDTA（250 mM）	1000 μl
リトマス38 i l u c コントロールテンプレート	1 μg
RNA分解酵素無含有グリコーゲン 10 μg/μl	50 μl
TEバッファ（10 mM T r i s - H C l、p H 8. 0、1 mM E D T A）中 プラスミドDNA 500 μg/ml	

20

【 0 0 8 1 】

さらに、キットはトランスフェクション試薬、RNAサイズマーカーおよびストレプトアビジン - 被覆ビーズを含んでいてもよい。

30

【 0 0 8 2 】

## 【表 2】

## バッファ組成

- (a) 10倍バッファ/NTP:  
 400mM Tris-HCl、pH8.1  
 190mM MgCl<sub>2</sub>  
 50mM DTT  
 10mM スペルミジン  
 40mM 各NTP
- (b) 30X高分子量(HMW)ミックス: 10  
 20mM Tris-HCl、pH8.1  
 1.5mg/ml BSA  
 100単位/ml 無機ピロホスファターゼ(酵母)  
 12,000単位/ml 膦リボヌクレアーゼ阻害剤  
 50%グリセロール
- (c) 10XhsRNAバッファ  
 0.5M Tris-HCl、pH7.5  
 0.5M NaCl  
 0.1M MgCl<sub>2</sub> 20  
 10mM DTT

## 【0083】

キットは変異RNA分解酵素IIIを最適化されたバッファ中で用いて長いdsRNAから約18~30nt(特に21~23nt)の範囲のフラグメントを生成する。dsRNA生産物を変異RNA分解酵素IIIで切断して遺伝子発現沈黙化に適したdsRNA混合物を再現可能に生成する。混合物中の異なるsiRNAの配列を全対象遺伝子の配列にマッピングする。dsRNA混合物はエタノール沈殿により生成することができ、トランスフェクションに使用することができる。

## 【0084】

30

キットに添付された指示の例としては下記が挙げられる:

(1)イン・ビトロ転写に先立ってDNAテンプレートをクローニングしてdsRNAを生成

転写用DNAテンプレートを作製する一つのアプローチは関心のあるDNAをリトマス(Litmus)28i/38i双方向転写ベクター(ニュー・イングランド・バイオラプズ・インコーポレイテッド、マサチューセッツ州ビバリー市)にクローニングすることである。次いで、関心のあるDNAを、単一のT7プロモーター特異プライマー、例えばBT7ミニマル・プライマー(Minimal Primer)を用いるPCRにより増幅することができ、このプライマーは対象配列の側面に終端をなすT7プロモーターが配列した線状生産物を生成する。

40

## 【0085】

あるいはまた、T7プロモーターを付加した対象遺伝子特異プライマーを用いて任意の特異的cDNA配列を増幅することができる。例えば、増幅プライマー:

## 【表 3】

5 TAATACGACTCACTATAG **aaggacagatggttaagtaac** - 3'  
 T7プロモーター (配列番号8)

ここでT7プロモーター(下線)は5'端にあり、対象特異配列(太字)に先行している、を任意のcDNAテンプレートを増幅するために使用することができる。

50

## 【0086】

ビオチン化BT7プライマーを用いてT7プロモーターを側面に配置した任意の配列を増幅することができる。任意に、この増幅されたビオチン化DNAテンプレートをストレプトアビジン磁性ビーズ(ニュー・イングランド・バイオラプズ・インコーポレイテッド、マサチューセッツ州ビバリー市)に結合することにより単離することができ、転写のテンプレートとして直接使用することができる。固定化DNAテンプレートを形成するために、25~50 $\mu$ lのストレプトアビジン磁性ビーズ懸濁物を等量の1M NaClとともに増幅(PCR)反応混合物に添加し、室温で10~15分間インキュベートする。上清を磁力の存在下に除去し、ビーズを0.5mlのTE、0.5M NaClで洗浄する。再懸濁したビーズは転写反応に直接用いることができる。不動化DNAテンプレートのイン・ビトロ転写によりDNA-を含まないdsRNAが生成される。

## 【0087】

増幅は任意のポリメラーゼ依存方法、例えばPCRにより達成することができる。増幅生産物をエタノール沈殿またはクロマトグラフィー法[例えばキアクイック(QiaQuick(登録商標))カラム(キアジェン(Qiagen)社、カリフォルニア州スチューディオ・シティ市)によりに精製し、TE(10mM Tris-HCl、pH8.0、1mM EDTA、ミリ-Q(Milli-Q)水または同等のものを用いて調製)に再懸濁して終濃度~500 $\mu$ g/mlにする。

## 【0088】

GL3ルシフェラーゼからなるコントロールを、GL3ルシフェラーゼ遺伝子の1.0-1.0kbpフラグメントをリトマス(Litmus)38iのSphIおよびNgoMIVサイトにクローニングしたリトマス(Litmus)38iLucプラスミドを用いて調製することができる。MfeIおよびStuIで(別個の反応で)線状化し、次いで結合した線状化されたテンプレートをイン・ビトロ転写して1.0kbp長のdsRNAが生成される。

## 【0089】

パイロット研究を行って、100~600bp長のdsRNAを切断することにより得られた、リトマス(Litmus)28i/38iベクター(ニュー・イングランド・バイオラプズ・インコーポレイテッド、マサチューセッツ州ビバリー市)にサブクローニングしたcDNAの制限フラグメントに由来するRNAを含む1つ以上のフラグメントを用いて、hsiRNA混合物を特定の遺伝子沈黙化のために提供するようにすることができる。

## 【0090】

## イン・ビトロ転写

上述のようにして調製したDNAテンプレートをを用いてイン・ビトロ転写を行う。転写反応に用いられるテンプレートの体積は精製方法によって決まる。未精製PCR産物用には、5 $\mu$ l以下が30 $\mu$ l反応毎に用いられる。添加されるテンプレートDNAの量は30 $\mu$ l毎に1 $\mu$ gを越えるべきではない。

## 【0091】

## 【表4】

RNA分解酵素を含まない水	50-x $\mu$ l
10Xバッファ/NTP	6 $\mu$ l
DNA テンプレート (~0.5-1 $\mu$ g)	x $\mu$ l
30X HMW ミックス	2 $\mu$ l
T7 RNAポリメラーゼ (150U/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l

---

60  $\mu$ l

## 【0092】

4.2 でインキュベーションを行うと大量の二次構造を含むRNA転写物の収率を改善

することができる。二次構造の含量を特定の転写物において計量することは困難であるため、本発明者は可能であればすべての転写を42で行うことを推奨する。転写収率は最初の90分間は(ほぼ)直線状に増加し、2~3時間後に最大になる。要すれば、反応を一夜行うことができるが、収率はそれ以上高くない。二本鎖RNAは37で長期間インキュベーションを行っても安定である。

【0093】

転写反応は、RNA分解酵素のコンタミネーションがないように注意しながら、1%アガロースゲル上で分析することができる。二本鎖RNAは反応において使用したDNAテンプレートとほぼ同様に移動する。リトマス(Litmus)38ilucコントロールテンプレートからの転写物の予想される長さは1000bpである。

10

【0094】

dsRNA転写生産物をエタノール沈殿により精製する。10分の1の体積の3M NaOAcをpH5.5で2体積の冷95%エタノールと一緒に添加する。氷上で15分間インキュベーションするか、または-20で一夜貯蔵する。微小遠心機(microcentrifuge)を用い15分間14,000rpmで高速回転し、2体積の80%エタノールを添加し、室温で10分間インキュベーションし、5分間延伸し、遠心管を傾斜して排液する。ペレットを風乾する。乾燥したRNAを10mM Tris-HCl、pH8.0、1mM EDTAまたは水に溶解する。

【0095】

dsRNA混合物の形成

20

1X(10倍希釈)(0.14 $\mu$ g/ $\mu$ l)の濃度のRNA分解酵素IIIおよび0.07 $\mu$ g/ $\mu$ lのdsRNAを以下の実施例のように消化反応において使用する。

【0096】

【表5】

下記を結合する：

dH <sub>2</sub> O	120-x $\mu$ l
10XhsRNAバッファ	15 $\mu$ l
dsRNA	x $\mu$ l
変異RNA分解酵素III	15 $\mu$ l

---

150  $\mu$ l

30

【0097】

消化生産物を監視するためには、10~20%生ポリアクリルアミドゲルが適している。消化生産物は、長いdsRNAが切断されて、出発材料の長いdsRNAの長さとは関係なく、18~25ヌクレオチドの範囲のサイズを有するフラグメントのdsRNA混合物を生じる。この混合物はトランスフェクションに使用する前にエタノール沈殿の単一工程により精製することができる。

【0098】

hsRNAフラグメントのエタノール沈殿

40

10分の1の体積の3M NaOAc、pH5.5、2 $\mu$ lグリセロール溶液および3体積の冷95%エタノールを添加する。-70に30分間、または-20に2時間~一夜置く。微小遠心機(microcentrifuge)を用い15分間14,000rpmで高速回転する。慎重に小さなペレットを避けながら上清を除去し、2体積の80%エタノールを添加し、室温で10分間インキュベーションし、5分間遠心し、遠心管を傾斜して排液する。ペレットを風乾する。乾燥したRNAを10mM Tris-HCl、pH8.0、1mM EDTAまたはdH<sub>2</sub>Oに溶解する。

【0099】

dsRNA濃度の決定

50

dsRNA濃度はUV分光光度計(260nmにおけるODの1は40µg/ml dsRNAに相当する)または蛍光光度計[リボグリーン(RIBO GREEN(登録商標))、モレキュラー・プローブ(Molecular Probe)社、オレゴン州ユージーン市]を用いて、または当技術において用いられるsiRNA標準との比較により測定することができる。

#### 【0100】

##### トランスフェクションのガイドライン

エタノール沈殿後、オリゴヌクレオチドのトランスフェクションに適した試薬およびプロトコル、例えばリポフェクチン(lipofectin)2000、オリゴフェクタミン(oligofectamine)、トランスイット(TRAMS-IT(登録商標)) (マイラス(Mirus)社、ウィスコンシン州マジソン市)、およびターゲフェクト(Targetfect)(ターゲティング・システムズ(Targeting Systems)社、カリフォルニア州サンティーマ市)またはニュー・イングランド・バイオラブズ・インコーポレイテッド(マサチューセッツ州ビバリー市)により提供されるトランスフェクション試薬を用いて、dsRNA混合物を直接哺乳類の細胞にトランスフェクションすることができる。さらに、リン酸カルシウムと電気穿孔法が短いRNAをトランスフェクションするのに有効であると報告されている。

#### 【0101】

トランスフェクション・ウェル(24-ウェル方式)当り25~100ngの量のdsRNAを最初の量として用い、実験的発見にしたがって調整することができる。

#### 【0102】

大きいdsRNAを上述のようなイン・ビトロトランスフェクションにより合成することができるが、これは改変されたリボヌクレオチド、例えば2-フルオロ-リボ-CMP、2-O-メチル-リボ-UTP、2-O-メチル-リボ-ATP、2-O-メチル-リボ-GTPまたはdsRNAをより安定にもしくは分解に抵抗性にする、他の2'改変体をNTPSの代わりに上述の10Xバッファ中に含む改変された転写バッファを用いて行うことができる。これらの目的のためにデュラスクライブ(DURASCRIIBE(登録商標))キット(エピセンター・テクノロジーズ(Epicenter Technologies)社、ウィスコンシン州マジソン市)を使用することができる。

#### 【実施例6】

#### 【0103】

##### 特異的siRNA混合物

同定された対象用のmRNA配列のセグメントを、各対象配列を用いて行った遺伝子データベースとの配列の比較に引き続いて選択することができる。

#### 【0104】

アルゴリズムを使用して配列を例えば16~21bpの窓を用いて走査する。次いで、BLSTスコアが各セグメントについて完全なデータベース(例えば、ユニジェン(UNIGENE))と位置合わせさせた後に得られる。設定された限界よりも高いBLASTスコアから計算した事項は報告から削除した。他の対象に対するヒットのないことを示す対象配列を選択するのが好ましい。

#### 【0105】

セグメントサイズは特に限定されないが、セグメントは約150~1000bpの範囲内、例えば200~400bpの範囲の長さのものを選択することができる。

#### 【0106】

対象dsRNAに対応する選択されたDNAセグメントを効率的に増幅するPCRプライマーを用いて、PCRプライマー設計用の標準的プロトコルを使用して増幅することができる。例えば、プライマーはT7プロモーター配列を5'端に含んでいてもよい。他の配列をT7プロモーターの代わりに用いて二重T7プロモーターベクター(リトマス(Litmus)28i、リトマス38i、リトマス-U、ニュー・イングランド・バイオラブズ・インコーポレイテッド、マサチューセッツ州ビバリー市)の一方に対するクローニ

10

20

30

40

50

ングを容易にすることが可能である。

【0107】

リトマスUについて、以下のプライマー配列を使用することができる：g g g q a a a g uおよびg g a g a c a u、ここにuはウラシルを表す。PCR反応後、増幅されたDNA生産物を、USERプロトコル（ニュー・イングランド・バイオラズ・インコーポレイテッド、マサチューセッツ州ビバリー市）を用いて直接リトマスU内でクローニングすることができる。次いで、クローニングされたフラグメントをdsRNAの製造に使用することができる（例えば、米国特許出願公開第2004-0038278号明細書参照）。

【0108】

hsiRNAの調製に使用するのに適していると決定された各配列について表1に寄託番号および配列を記載した。

【0109】

hsiRNA混合物の調製を実施例2に記載した。

【0110】

hsiRNA混合物の機能を実施例3に記載したとおおりに細胞をトランスフェクションすることにより決定することができる。さらに、ウエスタンブロット法またはタンパク質活性検定法をトランスフェクション後の種々の時点で実施して遺伝子発現が下方制御されたかを決定することができる。

【0111】

10

20

【表 6】

表 1

カテゴリー	対象	寄託番号	座標	
キナーゼ	Akt1	NM_005163	199-657	
	Erk2	NM_002745	660-940	
	MSK1	AF074393	282-736	
	p38	L35253	10-419	
	IRS1	NM005544	1026-1713	
	PKR	M35663	999-1499	
	PTEN	NM_000314	1019-1445	
転写	CREB	M34356	247-601	
ヌクレオチドシグナル伝達	ERa	NM_000125	369-905	
ナル伝達	ERb	NM_001437	587-1240	
	DAX	NM_000475	1-249	
	p53	NM_000546	717-915	
	DNMT1	X69632-G-BPR2	2124-3235	
	DnMT3B	AF331857	1150-1545	
	DnMT3A	X63692.gb-pr2	1547-2388	
	TRIP	L38810	1-445	
	Rb	m15400.gb_pr1	2239-2755	
	MeCP2	af030876.gb_pr	699-1011	
	その他	caspase3	p42574	1063-1496
		La	NM_003142	316-631
FURIN		NM002569	1781-1990	
コントロール	Lit28i polylinker	NEB#N3528S	2465-2600	
一般用途	EGFP	U55763	596-1322	
	RFP	AF272711	152-632	
	FfLUC	U47295	747-1757	
	Renilla	AF264722	3673-3951	

10

20

30

## 【0112】

表 1 はここに記載した変異 RNA 分解酵素 III を用いて調製することができ、培養されまたはイン・ピボで生じる細胞における遺伝子沈黙化のために使用することができる対象遺伝子の例を挙げている。遺伝子 (cDNA) 配列のための座標は上記の GenBank の寄託番号中に含まれている。

## 【0113】

hsRNA 混合物を形成するための適切な RNA 配列を選択のためのアルゴリズム

1. 長さ N の対象配列 SO をユーザーから入力する。
2. ユーザーにより特定された長さ L のすべての可能なオリゴヌクレオチド部分配列 ( $S_1, S_2, S_3, \dots, S_{(n-L+1)}$ ) を SO から抽出する。
3. 各オリゴヌクレオチド部分配列のヌクレオチド組成を計算する。
4. ヘリックス形成の自由エネルギーの熱安定性を各オリゴヌクレオチド部分配列に沿って計算する。この計算のために、この配列は 2 塩基の 3' オーバーハングを持つ二本鎖 RNA デュプレックス (duplex) であるとして取り扱う。
5. (任意) 二本鎖 RNA デュプレックスの 2 つの端部の安定性の差を計算する。差について、5' センス鎖末端の安定性が有利であると採点する。対向末端の差を不利であると採点する。

40

50

6. ユーザーにより選択された対象生物のトランスクリプトームを表す配列のデータベースを配列SOで検索してユーザーにより特定されたレベルのSOに対する類似性を持つ配列を突き止める。これらの類似配列を対象配列の均等物としてマークし、それらのアイデンティティを記録する。

7. ユーザーにより選択された対象生物の同じトランスクリプトーム・データベースを検索してそのトランスクリプトーム内の各オリゴヌクレオチド部分配列の出現頻度を決定する。オリゴヌクレオチド部分配列がユーザーに特定されたレベルの類似度をこのトランスクリプトーム・データベースからの部分配列に対して持つ場合、このオリゴヌクレオチド部分配列の存在を記録する。各存在について、トランスクリプトーム内の一致セグメントも同様に記録する。一致セグメントは「クロスターゲット(cross target)」または「オフターゲット(off target)」一致と呼ばれる。先行するステップの対象SOに均等であると同定された配列を抜き出し、クロスターゲット一致としては算入しない。

8. 各オリゴヌクレオチド部分配列について、トランスクリプトームにおけるクロスターゲット一致の頻度を表すデータ、ヌクレオチド組成およびその末端の熱安定性の差が提示される。

9. 一般に低クロスターゲット頻度の領域、注程度の%GC組成および高密度の好適熱安定性差が以後のプライマー選択用の望ましい領域であると考えられる。

#### 【0114】

このアルゴリズムの本実施形態において、BLASTアルゴリズムの変形例を使用するNCBIからのメガブラスト・プログラムを用いてトランスクリプトーム・データベースを検索する。クロスターゲットを同定するのに用いられる類似度の基準は、対象オリゴヌクレオチド部分配列とトランスクリプトーム・データベース中の主題(subject)配列との間のユーザーにより特定された最小数の連続ヌクレオチドの一致があることである。表示されたヌクレオチド組成の指標は%GCである。オリゴヌクレオチド部分配列の量末端における熱安定性は4末端塩基対ヌクレオチドを用いて計算し、不対合オーバーハング配列は除外する。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0115】

【図1】図1はRNA分解酵素IIIの3つのクラス-ヒトダイサー(Hs Dicer) ; ショウジョウバエ(Drosophila)ドロシャ(Drosha)、(Dm Drosha) ; サッカロマイセス・セレピシアエ(S. cerevisiae)RNA分解酵素III (ScRNT1) ; 大腸菌RNA分解酵素III (Ec RNAseIII) の例の一致を示す概略図である。一番上の線はアミノ酸残基の数を示す。クラス記号はI、IIおよびIIIで示し、相当するdsRNA生産物のサイズを塩基対数で示した。タンパク質のドメインは以下のように示した。ヘリカーゼ、点描 ; PAZ、ブロック ; RNA結合ドメイン(RBD)、格子縞 ; RNA切断ドメイン(RCD)、黒塗り ; 相同残基に1つ以上の置換があるRNA切断ドメイン、灰色。「生産物(product)」はマグネシウムイオンを含有するバッファ中で規定される非修飾酵素により生成されたdsRNAフラグメントのサイズをいう。

【図2】図2は種々のバクテリアや酵母のRNA分解酵素のアミノ酸の一致(配列番号: 9-25)を示す図である。強調されている残基: 黒色 - 図示の全ての例の間で100%保存 ; 灰色 - 図示の例の大多数の間で保存 ; 星印 - dsRNAとの接触を提案されている残基 [ ストラクチャー第9巻第1225頁2001年 (Structure 9: 1225 (2001)) ] 。

【図3】図3はE38A変異RNA分解酵素III (E38A)の活性を示す図である。His-タグ付きE38A RNA分解酵素III融合体を標準ニッケル樹脂アフィニティーにより精製し、タンパク質濃度を標準的方法により決定した。基質Male dsRNA (900bp) 0.5mgをE38A変異RNA分解酵素IIIを50mM NaCl、10mM TRIS HCl、10mM MgCl2、1mM DTT pH7.

10

20

30

40

50

9 (NEB バッファ2) (ニュー・イングランド・バイオラブズ・インコーポレイテッド、マサチューセッツ州ピバリー市) に連続希釈したものを 37 で 1 時間行った消化を示す。次いで、反応混合物を 20% ポリアクリルアミド・ゲルを通して電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色して可視化した。 図 3 A : 0.5  $\mu$ g dsRNA 基質を以下の量 : 0.03、0.06、0.125、0.25、0.5、1、2 および 4  $\mu$ g (レーン 2 ~ 9) の E38A 変異 RNA 分解酵素を用い、20  $\mu$ l の体積でそのうち 10  $\mu$ l を各ウェルに装荷し 37 で 1 時間切断した結果を示す図である。 レーン 1 - 酵素なし。 レーン 10 - 道生 dsRNA 22 量体 (サイズマーカー) レーン 7 - 0.5  $\mu$ g の dsRNA を 1  $\mu$ g の酵素とインキュベートしたところ完全に消化された。(ここで、完全消化はゲル電気泳動で 22 bp バンドより実質的に大きい dsRNA が存在しないことであると定義される。) レーン 9 は 22 bp 生産物の量が dsRNA 基質の ~ 60% であることを示す。 dsRNA は既知量の合成 dsRNA 22 量体を用いたデンシトメトリーにより低了した。 図 3 B : 消化を図 3 A の場合と同様に設定したが、一夜インキュベートしたところ、約 22 bp の生産物が完全な RNA 分解酵素 III を含有する混合物の存在下で長期間にわたって安定性が向上することが示された。 レーン番号は図 3 A の酵素条件に対応する。

【図 4】図 4 は図 3 に示す条件下で E38A 変異 RNA 分解酵素 III を用いた消化の結果を示す図である。 図 4 A : 0.5  $\mu$ g の dsRNA を、10 mM の亜鉛、ニッケル、マンガン、コバルトまたはマグネシウム塩を含有するバッファの体積 20  $\mu$ l 中の 4  $\mu$ g の変異 RNA 分解酵素で消化。 図 4 B : 0.5  $\mu$ g の dsRNA を、10 mM Mn 塩を含有するバッファの体積 20  $\mu$ l 中の 4  $\mu$ g の変異 RNA 分解酵素の 2 倍希釈シリーズを用いて消化 : レーン 1 - 酵素なし。 レーン 10 - 合成 dsRNA 22 量体。

【図 5】図 5 は 900 bp Male dsRNA および 32  $\mu$ g の E38 RNA 分解酵素 III を全量 160 ml の NEB バッファ 2 に溶解したものを 37 で用いた経時反応を示す図である。 10 ml のサンプルを指定された時間 - 1 時間、1 日、2 日、3 日、4 日および 5 日において取り出し、終濃度 25 mM の EDTA を添加することにより反応を停止した。 ゲルの左端の第 1 のレーンは合成 22 bp dsRNA サイズ標準を含む ; ゲルの右端の最終レーンは 5 日模擬消化 dsRNA の生産物を含む。

【図 6】図 6 は分で示された時間の間、図 5 に記載されたように酵素反応を行った結果を示す図である。 左から右に : 合成 22 量体 dsRNA サイズマーカー ; 1、5、10、20、30、40 および 50 分消化および未消化 dsRNA。

【図 7】図 7 は図 3 に記載されたように酵素反応を行った結果を示す図である。 レーン 1、合成 dsRNA の 50 量体の模擬消化 ; レーン 2、合成 dsRNA の 50 量体の E38A 消化 ; レーン 3、合成 dsRNA 22 量体。

【図 8】図 8 は dsRNA 切断用の種々の市販酵素キットと E38A 変異 RNA 分解酵素 III との比較を示す図である。それぞれの基質は 0.5  $\mu$ g の 900 bp Male dsRNA であった。市販キット用の条件は製造元の指示に従う。E38A 用の反応条件は図 3 に記載されている通りである。「-」模擬反応 ; 「23」- 合成 dsRNA の 23 量体。百分率は示されたレーンにおけるそれらの反応条件に対する生産物収率である。dsRNA フラグメントの生産物収率は図 3 に記載されている通りに定量した。 図 8 A : サイレンサー (Silencer<sup>TM</sup>) siRNA カクテルキット (RNA 分解酵素 III) (アンピオン (Ambion) 社、テキサス州)。 図 8 B : ダイサー (Dicer) - 組換ダイサー (ヒト) (ストラタジーン (Stratagene) 社、カリフォルニア州ラ・ホラ市)。 図 8 C : ショートカット (ShortCut) (RNA 分解酵素 III) - ショートカット RNAi キット (ShortCut RNAi Kit) (ニュー・イングランド・バイオラブ社、マサチューセッツ州ピバリー市)。 図 8 D : E38A - 左側パネルは 4  $\mu$ g (右) から出発し 0.5  $\mu$ g (左) で終わる連続希釈力価を示す。示されたレーン (ボックス) に示される反応条件を用い、分で表す以下の時間 - 1、5、10、20、30、40、50、60 にわたってより短い消化を行った。 上記比較により、ダイサーおよび E38A 変異 RNA 分解酵素 III の消化産物は大きい dsRNA の

かなりの部分がダイサー消化において切断されなかったのに対して、E38Aについては、大きいdsRNAは観られなかった。この差は、ダイサー切断産物とは異なり、E38A変異切断産物には細胞にトランスフェクションする前に大きいdsRNAを除去するさらなる分離工程が必要ではないことを意味する。

【図9】図9はショートカットRNA分解酵素IIIか、またはE38Aのいずれかで切断したホタルルシフェラーゼdsRNAのRNA干渉活性を示す図である。ホタルルシフェラーゼdsRNAを調製し製造元の指示に従ってショートカットRNA分解酵素IIIで消化するか、または図3に記載された条件に従ってE38Aで消化した。NIH3T3細胞を1日目に24ウェルプレートに50%の密度で播き、一夜培養した。細胞は2日目に、ホタルルシフェラーゼ遺伝子をリポーターとして含むpGL3ベクターと、加えてウミシイタケ(*renilla*)ルシフェラーゼをコントロールとして含むもの0.3mg/ウェルで、製造元の指示に従いトランスフェクション試薬としてFugeneを用いてトランスフェクションした。3日目に、ショートカットRNAiキット(黒棒)またはE38A(灰色棒)により調製されたルシフェラーゼdsRNAまたはバッファ(白棒)を細胞にトランスフェクションした。4日目に細胞を収穫し、プロメガ(Promega)社のデュアル・ルシフェラーゼ・アッセイ・キット(Dual Luciferase Assay Kit)を用い、製造元(プロメガ(Promega)社、ウイスコンシン州、マジソン市)の指示に従いルシフェラーゼ活性を測定した。

10

【図10】図10はE65A変異RNA分解酵素IIIにより切断されたdsRNAを示す図である。RNA分解酵素IIIのHis-タグ付きE65A変異体を図3に記載されている通りに精製し、定量した。図10A:図3に記載された条件に従って0.5mgのMalE dsRNAを、レーン8の4mgから出発してレーン1の32ngまでのE65A変異RNA分解酵素IIIのNEBバッファ2中の連続希釈溶液で消化(ニュー・イングランド・バイオラブ社、マサチューセッツ州ピバリー市)。レーン9-合成dsRNA22量体。図10B:図10Aのレーン4および8の反応条件を繰り返して、消化を16時間行った。

20

【図11】図11はE38TおよびE38W変異体の活性を示す図である。RNA分解酵素のHis-タグ付きE38TおよびE38W変異体を精製し、図3に記載された通りに定量した。0.5μgのMalE dsRNA(900bp)をRNA分解酵素を、レーン10(図11A)およびレーン9(図11B)に出発する4μgの変異酵素の2倍希釈におけるRNA分解酵素IIIのE38T(図11A)およびE38W(図11B)変異体のNEBバッファ2中の連続希釈溶液で消化(ニュー・イングランド・バイオラブ社、マサチューセッツ州ピバリー市)。消化は37°Cで30分間行った。模擬消化をレーン2(図11Aおよび図11B)に示し、レーン1(図11Aおよび図11B)に示される各変異体4μgを用い一夜消化した。dsRNAサイズ標準はレーン11(図11A)およびレーン10(図11B)である。

30

【図12】図12は超好熱細菌[アクイフェックス・エオリクス(*Aquifex aeolicus*)]と大腸菌(*E. coli*)由来のRNA分解酵素IIIの一致を示す図であり、ハイライトした領域とタンパク質の特定アミノ酸がdsRNAと相互作用してdsRNAの切断に関与するものと考えられる(Blaszczyk, J., et al. Structure 9:1225(2001))。数字は右側のアミノ酸の残基の数を示す。一番上の行は超好熱細菌由来のRNA分解酵素IIIの配列を示し、第2行目は大腸菌由来のRNA分解酵素IIIの配列を示す。以下の行はすべて活性を測定した大腸菌のRNA分解酵素III変異体の配列を示す。変異体の名称は第1欄にリストされている。第2欄にリストとされている各変異体の活性-wt-野生型活性、23-活性により約23ntのdsRNAフラグメントが生成される。i-不活性変異残基はボックスで囲みハイライトした;灰色、不活性;黒色、23量体dsRNAを生成;ハイライトなし、野生型。大腸菌残基:38、45、65、117は超好熱細菌の残基37、44、64、110にそれぞれ対応する。

40

【図13】図13はRNA分解酵素III E38AおよびE117Dの活性の漫画描写

50

を示す図である。上のパネル - (灰色六角形) は dsRNA を結合子、それを切断して dsRNA 23 量体を生じる。中央のパネル - E117D (黒色六角形) は dsRNA を結合するが、切断はしない。下のパネル - E38A および E117D を一つの反応において混合することからの提案された結果。dsRNA は切断され、E38A 単独の 23 量体の多量体からなる dsRNA ラダーを生じる。このサイズラダーは 2 つの変異体の比率を変えることにより上下にシフトすることが可能である。

【図 14】図 14 は E38A / E117D 混合実験を示す図である。E38A と E117D を種々の比率で混合し、氷の上に置き、次いで、図 3 に記載された条件下で dsRNA 消化に用いる。4 mg の全酵素を 0.5  $\mu$ g の dsRNA と混合した。レーン 1, 2 - dsRNA サイズ標準、サイズを示す。レーン 3 ~ 13、ゲルの頂部に示した比率を用い、消化。レーン 14 - 模擬消化。

10

【図 15】図 15 は RNA 分解酵素 III WT および E117D の活性を描く漫画を示す図である。上のパネル - WT (白色六角形) が dsRNA を結合し (平行線)、それを切断して dsRNA 11 量体またはそれより小さいものを生じる。中央のパネル - E117D (黒色六角形) が dsRNA を結合するが、切断はしない。下のパネル - WT および E117D を一つの反応において混合することからの提案された結果。dsRNA は切断されて 2 組の生産物: ゲル上に観られなかった 11 量体またはそれより小さい生産物、および E38A 変異 RNA 分解酵素 III 消化のみに由来する 23 量体生産物の多量体からなる dsRNA ラダーを生じる。このサイズラダーは 2 つの変異体の比率を変えることにより上下にシフトすることが可能である。

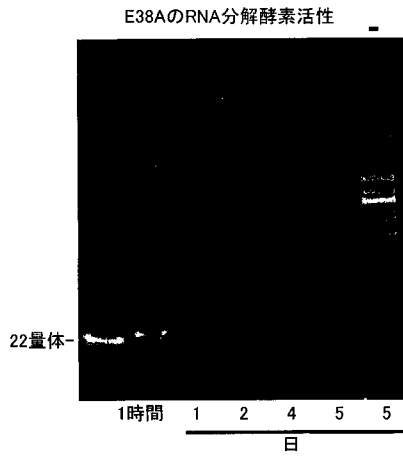
20

【図 16】図 16 は混合実験において変異 E117D と混合した WT RNA 分解酵素 III を示す図である。WT および E117D を種々の比率で混合し、氷の上に置き、次いで図 3 に記載されている条件下で dsRNA 消化に使用した。4 mg の全酵素を 0.5 mg の dsRNA と混合した。レーン 1, 2 - dsRNA サイズ標準、サイズを示す; レーン 3 ~ 13、ゲルの上に示す比率を用いて消化; レーン 14 - 模擬消化。

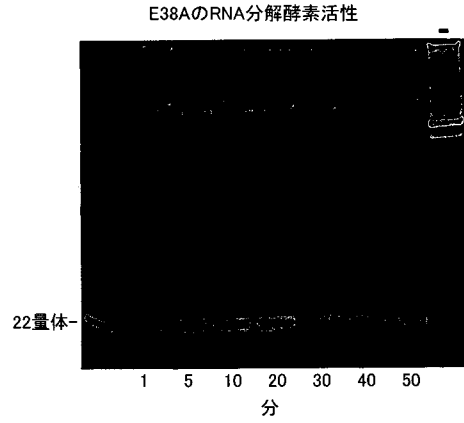
【図 17】図 17 は実施例 VI のアルゴリズムに従って分析されたヒト P53 配列用の出力を示す図である。



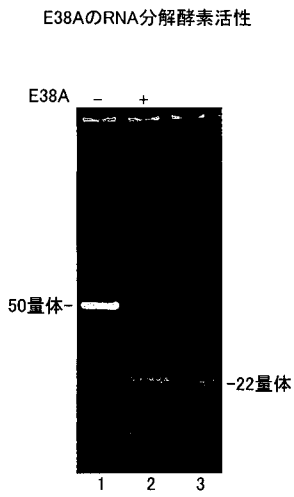
【 図 5 】



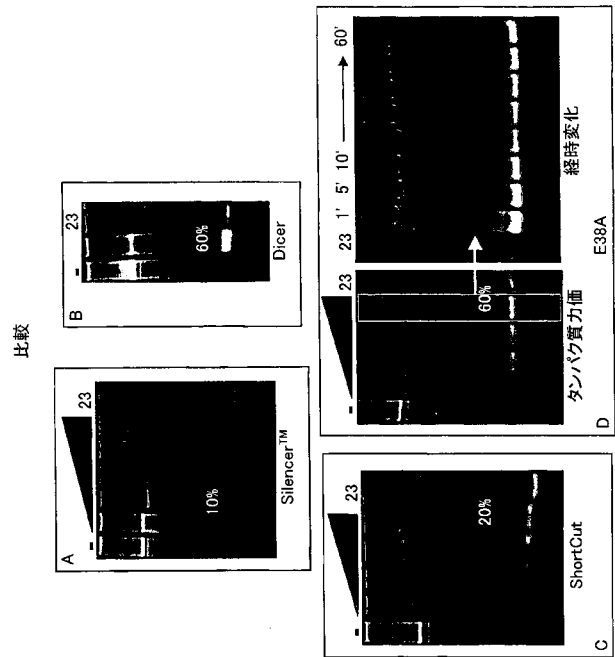
【 図 6 】



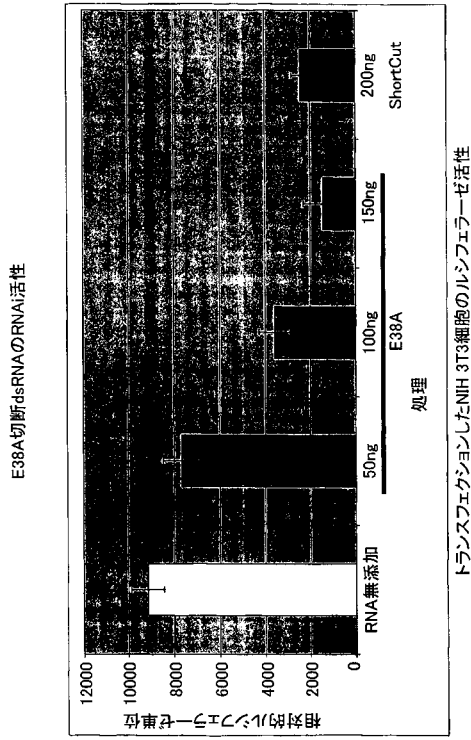
【 図 7 】



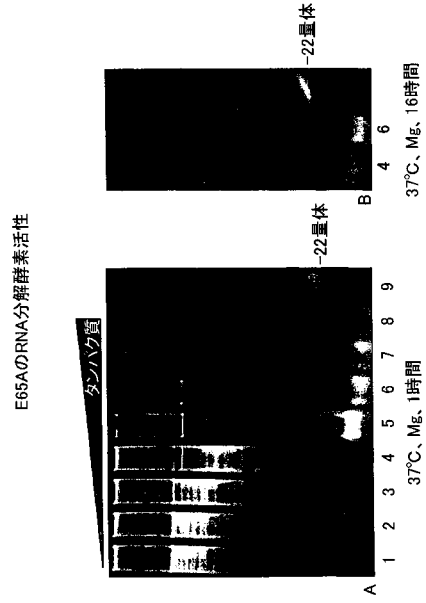
【 図 8 】



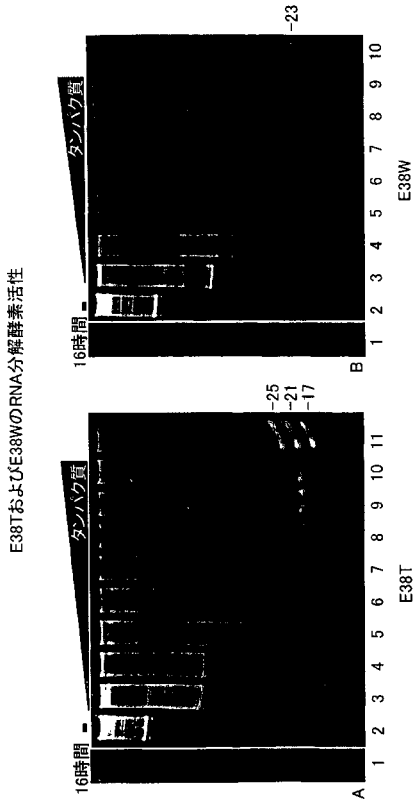
【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 11 】

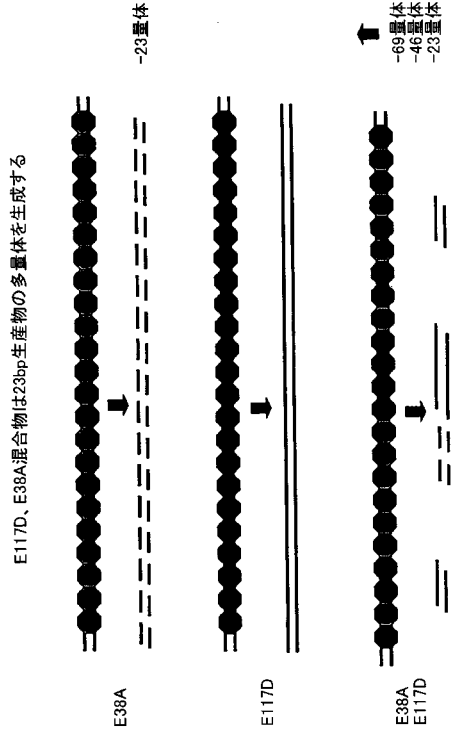


【 図 12 】

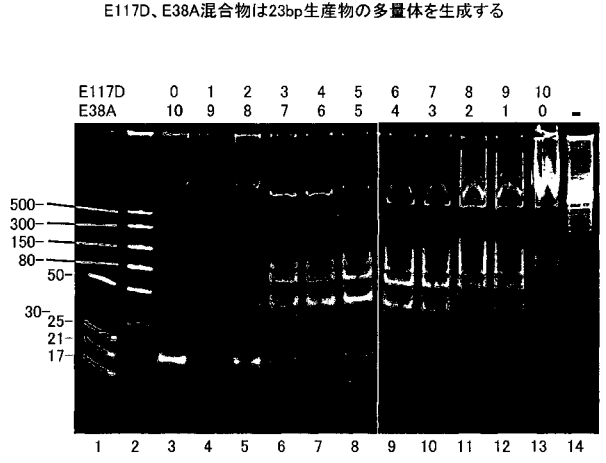
大腸菌RNA分解酵素III変異体

<i>Aquifex aeolicus</i>	wt	37	ETLEFLGDA	63	REGFLS	107	DVFEAL
<i>E. coli</i>	wt	38	ERLEFLGDS	64	DEGDMS	114	DTVEAL
E38D	wt	38	DRLEFLGDS	64	DEGDMS	114	DTVEAL
E38K	wt	38	KRLEFLGDS	64	DEGDMS	114	DTVEAL
E38Q	wt	38	QRLEFLGDS	64	DEGDMS	114	DTVEAL
E38P	wt	38	PRLEFLGDS	64	DEGDMS	114	DTVEAL
E38V	wt	38	VRLEFLGDS	64	DEGDMS	114	DTVEAL
E38A	23	38	ARLEFLGDS	64	DEGDMS	114	DTVEAL
E38T	23	38	TRLEFLGDS	64	DEGDMS	114	DTVEAL
E38W	23	38	WRLEFLGDS	64	DEGDMS	114	DTVEAL
D45V	wt	38	ERLEFLGV	64	DEGDMS	114	DTVEAL
D45A	7	38	ERLEFLGAS	64	DEGDMS	114	DTVEAL
E65P	wt	38	ERLEFLGDS	64	PDGMS	114	DTVEAL
E65A	23	38	ERLEFLGDS	64	ADGMS	114	DTVEAL
E117D	7	38	ERLEFLGDS	64	DEGDMS	114	DTVEAL
E38Q,E65P	wt	38	QRLEFLGDS	64	PDGMS	114	DTVEAL
E38A,E65A	wt	38	ARLEFLGDS	64	ADGMS	114	DTVEAL

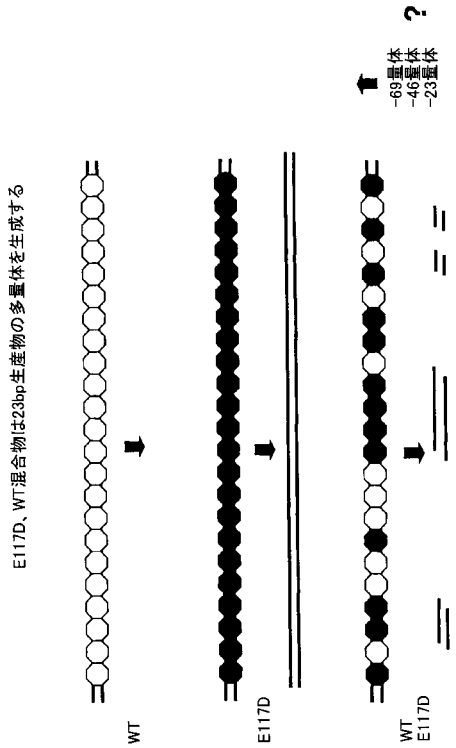
【 図 1 3 】



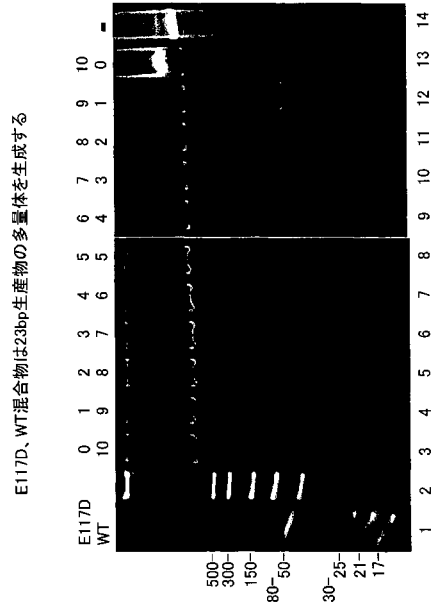
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【 図 1 7 】

siRNA評価ツール(EXPERIMENTAL)V0.57の結果 - 1月13日 本曜日 15:59:54 2005  
 クエリー: ホモ・サビエンス癌タンパク質p53(L1-フラグメン) (Fraumeni)症候群  
 NM\_000546 (TP53), mRNA  
 クエリー長: 2629nt  
 表示領域: 1~2608  
 検索したデータベース: Homo\_sapiens NCBI:hs.fna  
 最小台致長: 21nt

下記DB配列へのヒットを結果から振るい落とした  
 (クエリー-カutoff1.0E-70)  
 # | 8400737 | ref | NM\_000546.2 | E-val:0.0  
 現在の精確度は4塩基である。



【 配列表 】

2007520221000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US05/02029
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) : C12Q 1/68; A01N 43/04; C07H 21/04; A61K 31/07 US CL : 435/6, 91.1, 325, 375; 536/23.1, 24.3, 24.33, 24.5; 514/44 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6, 91.1, 325, 375; 536/23.1, 24.3, 24.33, 24.5; 514/44 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BYROM et al. Inducing RNAi with siRNA cocktails generated by RNase III. Ambion TechNotes Newsletter, 2003 Vol. 10, No. 1, pages 4-7, see Abstract.	1, 2, 5-9, 11, 12, 15, 24, and 26-28
Y	SUN et al. Mechanism of action of Escherichia coli ribonuclease III. Stringent chemical requirement for the glutamic acid 117 side chain and Mn2+ rescue of the Glu117 Asp Mutant. Biochemistry, 2001 Vol. 40, pages 5102-5110, see Abstract.	1, 2, 5-9, 11, 12, 15, 24, and 26-28
A	Caplen et al. RNAi as a gene therapy approach. Gene Therapy, 2003 Vol. 3, pages 575-586, see entire article.	14, 16-23, and 25
A	Coburn et al. siRNAs: a new wave of RNA-based therapeutics. J Anti Chemo, 2003 Vol. 51, pages 753-756, see entire article.	14, 16-23, and 25
A	Agami et al. RNAi and related mechanisms and their potential use for therapy. Curr Opin in Chem Bio, 2002 Vol. 6, pages 829-834, see entire article.	14, 16-23, and 25
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 04 January 2006 (04.01.2006)		Date of mailing of the international search report 24 MAR 2006
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Terra C Gibbs Telephone No. 571-272-0564

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US05/02029

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:  
databases: WEST, STN, Medline, and NPL  
search terms: dsRNA, double stranded RNA, short dsRNA, mutat?, mutan?, RNA iii

## フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ツェルツィニス, ジョージ  
アメリカ合衆国, 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州, ケンブリッジ, # 2, ウスター ストリート  
1 0

(72) 発明者 クマー, サンジェイ  
アメリカ合衆国, 0 1 9 3 8 マサチューセッツ州, イプスウィッチ, オールド ライト ロード  
8 3

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA11 CA04 CA11 DA06 EA04 GA11 HA12  
4B050 CC03 DD11 LL03

专利名称(译)	使用突变体RNase的短双链RNA的组成和生产方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2007520221A</a>	公开(公告)日	2007-07-26
申请号	JP2006551320	申请日	2005-01-21
[标]申请(专利权)人(译)	新英格兰生物实验室公司		
申请(专利权)人(译)	新英格兰生物实验室, 成立		
[标]发明人	マイナクロードヴィ ツエルツイニスジョージ クマーサンジェイ		
发明人	マイナ, クロード, ヴィ. ツエルツイニス, ジョージ クマー, サンジェイ		
IPC分类号	C12N15/09 C12N9/22 G01N33/53 C12N15/11 G01N33/50		
CPC分类号	C12N9/22 C12N15/111 C12N2330/30 C12Q1/6813 G01N33/5023		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N9/22 G01N33/53.M		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA11 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/LL03		
代理人(译)	酒井宏明		
优先权	60/538805 2004-01-23 US 60/543880 2004-02-12 US 60/572240 2004-05-18 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

提供了在体内制备hsiRNA混合物和沉默基因表达的组合物和方法。该成分通常与RNase III有关。该方法涉及使dsRNA制剂与有效量的突变RNase III反应以产生hsiRNA混合物。 [选择图]图3

RNase Activity of E38A

