(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7222715号
(P7222715)

(45)発行日　令和5年2月15日(2023.2.15)

(24)登録日　令和5年2月7日(2023.2.7)

(51)国際特許分類

Ｃ１２Ｎ　15/115(2010.01)	Ｃ１２Ｎ	15/115	Ｚ
Ｃ１２Ｎ　15/113(2010.01)	Ｃ１２Ｎ	15/113	Ｚ ＺＮＡ
Ａ６１Ｋ　35/76　(2015.01)	Ａ６１Ｋ	35/76	
Ａ６１Ｋ　35/761(2015.01)	Ａ６１Ｋ	35/761	
Ａ６１Ｋ　45/00　(2006.01)	Ａ６１Ｋ	45/00	

ＦＩ

請求項の数　47　（全38頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-559687(P2018-559687)
(86)(22)出願日　平成29年2月2日(2017.2.2)
(65)公表番号　特表2019-503205(P2019-503205A)
(43)公表日　平成31年2月7日(2019.2.7)
(86)国際出願番号　PCT/US2017/016303
(87)国際公開番号　WO2017/136608
(87)国際公開日　平成29年8月10日(2017.8.10)
審査請求日　令和2年1月20日(2020.1.20)
(31)優先権主張番号　62/290,187
(32)優先日　平成28年2月2日(2016.2.2)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/290,209
(32)優先日　平成28年2月2日(2016.2.2)
最終頁に続く

(73)特許権者　518274098
メイラジーティーエックス・ユーケー・ザ・セカンド・リミテッド
イギリス・Ｎ１・７ＮＱ・ロンドン・ブリタニア・ウォーク・９２
(74)代理人　100108453
弁理士　村山 靖彦
(74)代理人　100110364
弁理士　実広 信哉
(74)代理人　100133400
弁理士　阿部 達彦
(72)発明者　マイケル・ジェイ・ヴォレス
アメリカ合衆国・マサチューセッツ・０２１４０・ケンブリッジ・ボルトン・ストリート・６９・アパートメント・１０
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　自己切断リボザイムのアプタマー媒介性制御を通じての遺伝子発現制御

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ステムによりアプタマーに連結されたツイスター型リボザイムを含むリボスイッチを含む、標的遺伝子の発現を制御するポリヌクレオチド・カセットであって、前記ツイスター型リボザイムを前記アプタマーに連結している前記ステムは、前記ツイスター型リボザイムのＰ３ステム位置で前記リボザイムに結合しており、前記標的遺伝子は前記ツイスター型リボザイムのＰ１ステムに連結しており、前記ポリヌクレオチド・カセットは、標的遺伝子に組み込まれると、アプタマーリガンドの存在下で、リボザイム切断活性を増大させ、標的遺伝子の転写物を切断することにより標的遺伝子の発現を阻害する、前記ポリヌクレオチド・カセット。

【請求項２】

前記アプタマーは小分子リガンドに結合する、請求項１に記載のポリヌクレオチド・カセット。

【請求項３】

前記ツイスター型リボザイムはＮａｓｏｎｉａ　ｖｉｔｒｉｐｅｎｎｉｓに由来する、請求項１に記載のポリヌクレオチド・カセット。

【請求項４】

前記ツイスター型リボザイムは配列番号３８を含む、請求項１に記載のポリヌクレオチド・カセット。

【請求項５】

前記ツイスター型リボザイムは環境試料に由来する、請求項１に記載のポリヌクレオチド・カセット。
【請求項６】
前記ツイスター型リボザイムは配列番号３９を含む、請求項１に記載のポリヌクレオチド・カセット。
【請求項７】
前記ツイスター型リボザイムの前記Ｐ１ステムを１～３塩基対だけ延長する配列を含む、請求項１～６のいずれか１項に記載のポリヌクレオチド・カセット。
【請求項８】
前記ツイスター型リボザイムの前記Ｐ１ステムは４～７塩基対である、請求項１～６のいずれか１項に記載のポリヌクレオチド・カセット。
【請求項９】
前記リボザイムを前記アプタマーに連結している前記ステムは、前記リボザイムＰ３ステムからの配列及び／または前記アプタマーＰ１ステムからの配列を含む、請求項１～６のいずれか１項に記載のポリヌクレオチド・カセット。
【請求項１０】
前記リボザイムを前記アプタマーに連結している前記ステムは、３～７塩基対長である、請求項１～６のいずれか１項に記載のポリヌクレオチド・カセット。
【請求項１１】
標的遺伝子の発現を調節する方法で使用するための、請求項１～６のいずれか１項に記載のポリヌクレオチド・カセットを含む組成物であって、前記方法は、
ａ．請求項１～６のいずれか１項に記載のポリヌクレオチド・カセットを標的遺伝子に挿入すること、
ｂ．前記ポリヌクレオチド・カセットを含む前記標的遺伝子を細胞に導入すること、及び
ｃ．前記細胞を、前記アプタマーに特異的に結合する、前記標的遺伝子の発現を減少させるのに有効な量の小分子リガンドに曝露すること
を含む、前記組成物。
【請求項１２】
前記ポリヌクレオチド・カセットは、前記標的遺伝子の５’非翻訳領域に挿入される、請求項１１に記載の組成物。
【請求項１３】
前記ポリヌクレオチド・カセットは、前記標的遺伝子の３’非翻訳領域に挿入される、請求項１１に記載の組成物。
【請求項１４】
前記ポリヌクレオチド・カセットは、翻訳開始コドンの下流に挿入される、請求項１１に記載の組成物。
【請求項１５】
前記ポリヌクレオチド・カセットは、前記リボスイッチの３’末端と前記標的遺伝子コード配列の間に２Ａペプチド配列を含む、請求項１４に記載の組成物。
【請求項１６】
２つ以上の前記ポリヌクレオチド・カセットが前記標的遺伝子に挿入される、請求項１１に記載の組成物。
【請求項１７】
前記２つ以上のポリヌクレオチド・カセットは、異なる小分子リガンドに特異的に結合する異なるアプタマーを含む、請求項１６に記載の組成物。
【請求項１８】
前記２つ以上のポリヌクレオチド・カセットは、同じアプタマーを含む、請求項１６に記載の組成物。
【請求項１９】
前記ポリヌクレオチド・カセットを含む前記標的遺伝子は、前記標的遺伝子の発現のた

めにベクターに組み込まれている、請求項１１に記載の組成物。
【請求項２０】
前記ベクターはウイルスベクターである、請求項１９に記載の組成物。
【請求項２１】
前記ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、及びレンチウイルスベクターからなる群より選択される、請求項２０に記載の組成物。
【請求項２２】
請求項１～６のいずれか１項に記載のポリヌクレオチド・カセットを含む標的遺伝子を含む、ベクター。
【請求項２３】
前記ベクターはウイルスベクターである、請求項２２に記載のベクター。
【請求項２４】
前記ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、及びレンチウイルスベクターからなる群より選択される、請求項２３に記載のベクター。
【請求項２５】
アプタマーに連結されたツイスター型リボザイムを含むリボスイッチを含む、標的遺伝子の発現を制御するポリヌクレオチド・カセットであって、
前記ツイスター型リボザイムのＰ１ステム及び前記アプタマーのＰ１ステムは、ステムアームを含み、かつステムアームを選択的に共有し、
前記アプタマーは、前記ツイスター型リボザイムのＰ１ステムの３’または５’末端に連結されており、
前記アプタマーが前記ツイスター型リボザイムＰ１ステムの３’末端に連結されている場合は、前記ツイスター型リボザイムＰ１ステムの３’アームの一部分が前記アプタマーＰ１ステムの５’アームの選択的部分であり、また、
前記アプタマーが前記ツイスター型リボザイムＰ１ステムの５’末端に連結されている場合は、前記ツイスター型リボザイムＰ１ステムの５’アームの一部分が前記アプタマーＰ１ステムの３’アームの選択的部分であり、
前記ポリヌクレオチド・カセットは、標的遺伝子に組み込まれると、アプタマーリガンドの存在下で、リボザイム切断活性を阻害し、標的遺伝子の転写物の切断を減少させることにより標的遺伝子の発現を増大させる、前記ポリヌクレオチド・カセット。
【請求項２６】
前記アプタマーは小分子リガンドに結合する、請求項２５に記載のポリヌクレオチド・カセット。
【請求項２７】
前記ツイスター型リボザイムはＮａｓｏｎｉａ　ｖｉｔｒｉｐｅｎｎｉｓに由来する、請求項２５または２６に記載のポリヌクレオチド・カセット。
【請求項２８】
前記ツイスター型リボザイムは配列番号３８を含む、請求項２５または２６に記載のポリヌクレオチド・カセット。
【請求項２９】
前記ツイスター型リボザイムは環境試料に由来する、請求項２５または２６に記載のポリヌクレオチド・カセット。
【請求項３０】
前記ツイスター型リボザイムは配列番号３９である、請求項２５または２６に記載のポリヌクレオチド・カセット。
【請求項３１】
選択的に前記アプタマーＰ１ステムのアームである、前記ツイスター型リボザイムＰ１ステムの前記アームの前記一部分は、５～８ヌクレオチドである、請求項２５または２６に記載のポリヌクレオチド・カセット。
【請求項３２】

前記ツイスター型リボザイムの前記Ｐ１ステムは４～９塩基対である、請求項２５または２６に記載のポリヌクレオチド・カセット。
【請求項３３】
前記アプタマーの前記Ｐ１ステムは５～８塩基対である、請求項２５または２６に記載のポリヌクレオチド・カセット。
【請求項３４】
標的遺伝子の発現を調節する方法で使用するための、請求項２５または２６に記載のポリヌクレオチド・カセットを含む組成物であって、前記方法は、
ａ．請求項２５または２６に記載のポリヌクレオチド・カセットを標的遺伝子に挿入すること、
ｂ．前記ポリヌクレオチド・カセットを含む前記標的遺伝子を細胞に導入すること、及び
ｃ．前記細胞を、前記アプタマーに特異的に結合する、前記標的遺伝子の発現を増加させるのに有効な量の小分子リガンドに曝露すること、
を含む、前記組成物。
【請求項３５】
前記ポリヌクレオチド・カセットは、前記標的遺伝子の５’非翻訳領域に挿入される、請求項３４に記載の組成物。
【請求項３６】
前記ポリヌクレオチド・カセットは、前記標的遺伝子の３’非翻訳領域に挿入される、請求項３４に記載の組成物。
【請求項３７】
前記ポリヌクレオチド・カセットは、翻訳開始コドンの下流に挿入される、請求項３４に記載の組成物。
【請求項３８】
前記ポリヌクレオチド・カセットは、前記リボスイッチの３’末端と前記標的遺伝子コード配列の間に２Ａペプチド配列を含む、請求項３７に記載の組成物。
【請求項３９】
２つ以上の前記ポリヌクレオチド・カセットが前記標的遺伝子に挿入される、請求項３４に記載の組成物。
【請求項４０】
前記２つ以上のポリヌクレオチド・カセットは、異なる小分子リガンドに特異的に結合する異なるアプタマーを含む、請求項３９に記載の組成物。
【請求項４１】
前記２つ以上のポリヌクレオチド・カセットは、同じアプタマーを含む、請求項３９に記載の組成物。
【請求項４２】
前記ポリヌクレオチド・カセットを含む前記標的遺伝子は、前記標的遺伝子の発現のためにベクターに組み込まれている、請求項３４に記載の組成物。
【請求項４３】
前記ベクターはウイルスベクターである、請求項４２に記載の組成物。
【請求項４４】
前記ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、及びレンチウイルスベクターからなる群より選択される、請求項４３に記載の組成物。
【請求項４５】
請求項２５または２６に記載のポリヌクレオチド・カセットを含む標的遺伝子を含む、ベクター。
【請求項４６】
前記ベクターはウイルスベクターである、請求項４５に記載のベクター。
【請求項４７】
前記ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、及

びレンチウイルスベクターからなる群より選択される、請求項４６に記載のベクター。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、アプタマーによる自己切断リボザイムの調節によって遺伝子発現を制御するためのポリヌクレオチド・コンストラクト、及び、アプタマーに結合するリガンドの存在または不存在に応答して該コンストラクトを用いて遺伝子発現を制御する方法を提供する。
【背景技術】
【０００２】
小分子ヌクレオチド鎖切断性リボザイムは、固有のＲＮＡ切断活性をもつ約５０～１５０ヌクレオチド（「ｎｔ」）長のＲＮＡモチーフを含む。小分子ヌクレオチド鎖切断性リボザイムには、ハンマーヘッドやヘアピンなど、いくつかの分類型がある。最近では、ツイスター、ツイスターシスター、ピストル、及びハチェットなど、自己切断リボザイムの新しい分類型が特定されている。
【０００３】
本発明は、アプタマーに連結させたリボザイムを用いて、アプタマーに結合するリガンドの存在または不存在に応答して標的遺伝子発現を制御するポリヌクレオチド・カセットを作製する。
【発明の概要】
【０００４】
一態様では、本発明は、ステムによりアプタマーに連結されたツイスター型リボザイムを含むリボスイッチを含む、標的遺伝子の発現を制御するポリヌクレオチド・カセットを提供し、ここでツイスター型リボザイムをアプタマーに連結しているステムは、ツイスター型リボザイムのＰ３ステム位置でリボザイムに結合しており、標的遺伝子はツイスター型リボザイムのＰ１ステムに連結している。この場合は、リボスイッチは「オフ・リボスイッチ」である。それは、アプタマー／リガンド結合によってツイスター型リボザイムのリボヌクレアーゼ機能が高まり、ポリヌクレオチド・カセットが含まれる標的遺伝子ＲＮＡの切断をもたらすので、結果として標的遺伝子発現が低下するからである。一実施形態では、アプタマーは小分子リガンドに結合する。
【０００５】
一実施形態では、ツイスター型リボザイムはＮａｓｏｎｉａ　ｖｉｔｒｉｐｅｎｎｉｓに由来する。一実施形態では、ツイスター型リボザイムは、配列番号３８を含む。一実施形態では、ツイスター型リボザイムは、環境試料に由来する。一実施形態では、ツイスター型リボザイムは、配列番号３９を含む。
【０００６】
一実施形態では、Ｐ１ステムは、ツイスター型リボザイムのＰ１ステムを１～３塩基対だけ延長する配列を含む。一実施形態では、ツイスター型リボザイムのＰ１ステムは３～９塩基対である。一実施形態では、ツイスター型リボザイムのＰ１ステムは４～７塩基対である。一実施形態では、ツイスター型リボザイムのＰ１ステムは６塩基対である。一実施形態では、ツイスター型リボザイムのＰ１ステムは７塩基対である。一実施形態では、ツイスター型リボザイムのＰ１ステムは８塩基対である。
【０００７】
一実施形態では、リボザイムをアプタマーに連結しているステムは、リボザイムＰ３ステムからの配列及び／またはアプタマーＰ１ステムからの配列を含む。一実施形態では、リボザイムをアプタマーに連結しているステムは、リボザイムＰ３ステムからの配列を含まず、かつ／またはアプタマーＰ１ステムからの配列を含まない。一実施形態では、リボザイムをアプタマーに連結しているステムは、約３～約７塩基対長である。一実施形態では、リボザイムをアプタマーに連結しているステムは、３～７塩基対長である。一実施形態では、リボザイムをアプタマーに連結しているステムは、４塩基対長である。一実施形態では、リボザイムをアプタマーに連結しているステムは、３塩基対長である。

【０００８】
別の態様では、本発明は、標的遺伝子の発現を調節する方法を提供し、該方法は、
【０００９】
（ａ）本明細書で説明するオフ・リボスイッチを含むポリヌクレオチド・カセットを標的遺伝子に挿入すること、
【００１０】
（ｂ）該ポリヌクレオチド・カセットを含む該標的遺伝子を細胞に導入すること、及び
【００１１】
（ｃ）該細胞を、該アプタマーに特異的に結合する、該標的遺伝子の発現を減少させるのに有効な量の小分子リガンドに曝露すること、
を含む。
【００１２】
一実施形態では、ポリヌクレオチド・カセットは、標的遺伝子の５’非翻訳領域、標的遺伝子の３’非翻訳領域、及び／または標的遺伝子の翻訳開始コドンの下流に挿入される。
【００１３】
一実施形態では、ポリヌクレオチド・カセットが標的遺伝子の翻訳開始コドンの下流（すなわち３’）に挿入される場合、リボスイッチは開始コドンに隣接している。他の実施形態では、リボスイッチは、標的遺伝子の開始コドンから約１～約１００、約１～約５０、または約１～約２０ヌクレオチドである。一実施形態では、ポリヌクレオチド・カセットは、リボスイッチの３’末端と標的遺伝子コード配列の間に２Ａペプチド配列を含む。一実施形態では、ポリヌクレオチド・カセットは、２Ａペプチド配列に隣接するリンカー配列を含む。
【００１４】
一実施形態では、２つ以上のポリヌクレオチド・カセットが標的遺伝子に挿入される。一実施形態では、この２つ以上のポリヌクレオチド・カセットは、異なる小分子リガンドに特異的に結合する異なるアプタマーを含む。一実施形態では、この２つ以上のポリヌクレオチド・カセットは、同じアプタマーを含む。
【００１５】
一実施形態では、ポリヌクレオチド・カセットを含む標的遺伝子は、該標的遺伝子発現のためにベクターに組み込まれる。一実施形態では、ベクターはウイルスベクターである。一実施形態では、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、及びレンチウイルスベクターからなる群より選択される。
【００１６】
別の態様では、本発明は、アプタマーに連結されたツイスター型リボザイムを含むリボスイッチを含む、標的遺伝子の発現を制御するポリヌクレオチド・カセットを提供し、ここで該アプタマーは、ツイスター型リボザイムＰ１ステムの３’または５’末端に連結されており、アプタマーがツイスター型リボザイムＰ１ステムの３’末端に連結されている場合は、ツイスター型リボザイムＰ１ステムの３’アームの一部分があるいはアプタマーＰ１ステムの５’アームであり、また、アプタマーがツイスター型リボザイムＰ１ステムの５’末端に連結されている場合は、ツイスター型リボザイムＰ１ステムの５’アームの一部分があるいはアプタマーＰ１ステムの３’アームである（たとえば、図６ａ～図６ｂを参照されたい）。この場合は、リボスイッチは「オン・リボスイッチ」である。それは、アプタマー／リガンド結合によりツイスター型リボザイムのリボヌクレアーゼ機能が阻害され、ポリヌクレオチド・カセットが含まれる標的遺伝子ＲＮＡの切断が減少するので、結果として標的遺伝子発現が増加するからである。一実施形態では、アプタマーは小分子リガンドに結合する。
【００１７】
一実施形態では、ツイスター型リボザイムはＮａｓｏｎｉａ　ｖｉｔｒｉｐｅｎｎｉｓに由来する。一実施形態では、ツイスター型リボザイムは、配列番号３８を含む。一実施形態では、ツイスター型リボザイムは、環境試料に由来する。一実施形態では、ツイスタ

ー型リボザイムは、配列番号３９を含む。
【００１８】
一実施形態では、あるいはアプタマーＰ１ステムのアームであるツイスター型リボザイムＰ１ステムのアームの一部分は、４～８ヌクレオチド、５～７ヌクレオチド、６ヌクレオチド、または７ヌクレオチドである。一実施形態では、ツイスター型リボザイムのＰ１ステムは、４～９塩基対、５～８塩基対、６塩基対、または７塩基対である。一実施形態では、アプタマーのＰ１ステムは６～１１塩基対、７～１０塩基対、８塩基対、または９塩基対である。
【００１９】
別の態様では、本発明は、標的遺伝子の発現を調節する方法を提供し、該方法は、
【００２０】
（ａ）本明細書で説明するオン・リボスイッチを含むポリヌクレオチド・カセットを標的遺伝子に挿入すること、
【００２１】
（ｂ）該ポリヌクレオチド・カセットを含む該標的遺伝子を細胞に導入すること、及び
【００２２】
（ｃ）該細胞を、該アプタマーに特異的に結合する、該標的遺伝子の発現を増加させるのに有効な量の小分子リガンドに曝露すること、
を含む。
【００２３】
一実施形態では、ポリヌクレオチド・カセットは、標的遺伝子の５’非翻訳領域、標的遺伝子の３’非翻訳領域、及び／または翻訳開始コドンの下流に挿入される。
【００２４】
一実施形態では、ポリヌクレオチド・カセットが標的遺伝子の翻訳開始コドンの下流（すなわち３’）に挿入される場合、オン・リボスイッチは開始コドンに隣接している。他の実施形態では、リボスイッチは、標的遺伝子の開始コドンから約１～約１００、約１～約５０、または約１～約２０ヌクレオチドである。一実施形態では、ポリヌクレオチド・カセットは、リボスイッチの３’末端と標的遺伝子コード配列の間に２Ａペプチド配列を含む。一実施形態では、ポリヌクレオチド・カセットは、２Ａペプチド配列に隣接するリンカー配列を含む。
【００２５】
一実施形態では、２つ以上のポリヌクレオチド・カセットが標的遺伝子に挿入される。一実施形態では、この２つ以上のポリヌクレオチド・カセットは、異なる小分子リガンドに特異的に結合する異なるアプタマーを含む。一実施形態では、この２つ以上のポリヌクレオチド・カセットは、同じアプタマーを含む。
【００２６】
一実施形態では、ポリヌクレオチド・カセットを含む標的遺伝子は、該標的遺伝子発現のためにベクターに組み込まれる。一実施形態では、ベクターはウイルスベクターである。一実施形態では、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、及びレンチウイルスベクターからなる群より選択される。
【００２７】
別の態様では、本発明は、本発明のポリヌクレオチド・カセットを含む標的遺伝子を含むベクターを提供する。一実施形態では、ベクターはウイルスベクターである。一実施形態では、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、及びレンチウイルスベクターからなる群より選択される。
【図面の簡単な説明】
【００２８】
【図１ａ】哺乳類細胞で自己切断し遺伝子発現を抑制するツイスター型リボザイムを示す図である。Ｎ．ｖｉｔｒｉｐｅｎｎｉｓ由来のツイスター型リボザイム配列（スズメバチ－ツイスター）または環境試料由来のツイスター型リボザイム配列（ｅｓ－ツイスター）

をｐＥＧＦＰ－Ｃ１ベクターの３’非翻訳領域（「ＵＴＲ」）にクローニングした。ＨＥＫ２９３細胞に上述のコンストラクトで遺伝子導入し、ＧＦＰの蛍光強度を測定した。スズメバチ－ツイスターは、ｐＥＧＦＰ－Ｃ１コントロールと比べておよそ９７％または３６倍のＧＦＰ発現の低下をもたらした。ＧＦＰの３’ＵＴＲにｅｓ－ツイスターをクローニングすると、ＨＥＫ２９３細胞での標的遺伝子の発現は大幅に低下したが、スズメバチツイスターと同程度とはならなかった。

【図１ｂ】哺乳類細胞で自己切断し遺伝子発現を抑制するツイスター型リボザイムを示す図である。グラフに埋め込んだスズメバチ－ツイスターの二次構成が示すように、Ａ６をＧに変異させてミュータント・ツイスター配列を作製した。ＨＥＫ２９３細胞に上述のコンストラクトで遺伝子導入し、ＧＦＰの蛍光強度を測定した。３’ＵＴＲにクローニングすると、スズメバチ－ツイスターはやはりＧＦＰ発現の低下をもたらした。しかし、スズメバチ－ツイスター・ミュータントは、ＧＦＰ発現の低下をもたらさなかった。

【図２ａ】Ｐ１ステム配列の修飾によるツイスター型リボザイム切断活性の改善を示す図であり、スズメバチツイスターＰ１ステムの３塩基対伸長（３ＨＰ）の配列を示す。

【図２ｂ】Ｐ１ステム配列の修飾によるツイスター型リボザイム切断活性の改善を示す図である。当初のコンストラクトＧＦＰ＿スズメバチ－ツイスターからのＳａｃＩＩ部位の欠失、及びツイスターＰ１ステムへの３ｂｐステムの付加により、ツイスター型リボザイムによる切断が改善され、ＧＦＰ発現のさらなる低下がもたらされた。

【図２ｃ】ルシフェラーゼ・アッセイの結果を示す図である。ＨＥＫ２９３細胞に、ホタルルシフェラーゼ遺伝子、及び３’ＵＴＲに３ＨＰを有するかまたは有さないツイスターを含む、上述のコンストラクトで遺伝子導入した。

【図３ａ】グアニン応答性ツイスター型リボザイムの作製を示す図であり、ツイスター型リボザイムへの連結アプタマー配列の模式図、及びアプタマーリガンド応答性ツイスター型リボザイムの説明を示す。アプタマー配列を太線で示す。アプタマーリガンドの非存在下では、リガンドなしのアプタマーがツイスター型リボザイムの切断を妨害するので、ｍＲＮＡは無傷となり、次に遺伝子が発現する。アプタマーリガンドの存在下では、リガンドと結合したアプタマーがＰ３ステム形成を促進するので、ツイスター型リボザイムの切断活性が復活し、遺伝子発現は阻害される。

【図３ｂ】グアニン応答性ツイスター型リボザイムの作製を示す図であり、ホタルルシフェラーゼ・アッセイの結果を示す。図３ａの下側のパネルで示すように、グアニン・アプタマーのＰ１ステムをツイスター型リボザイムのＰ３ステムに連結して、２０個のコンストラクトを作製した。追加の３ＨＰもツイスターＰ１ステムの一部として数えた。ループ２とアプタマーを接続するステムを順次縮めていき、丸括弧内に示す異なるステム長とした。ＨＥＫ２９３細胞に上述のコンストラクトで遺伝子導入し、グアニンで処理したかまたは処理しなかった。コンストラクトＬｕｃｉ－スズメバチＧｕａ１６の低下倍率をグラフに示す。

【図３ｃ】グアニン応答性ツイスター型リボザイムの作製を示す図であり、スズメバチＧｕａ１６またはミュータント・スズメバチＧｕａ１６を含むルシフェラーゼ・コンストラクトの検証を示す。野生型スズメバチＧｕａ１６は、５００μＭのグアニン処理後にルシフェラーゼ活性を低下させたが、ミュータント・スズメバチＧｕａ１６はそうではなかった。

【図３ｄ】グアニン応答性ツイスター型リボザイムの作製を示す図であり、ルシフェラーゼ・アッセイの結果を示す。ＨＥＫ２９３細胞に上述のコンストラクトで遺伝子導入し、５００μＭのグアニンまたは１ｍＭのグアノシンで処理したかまたは処理しなかった。

【図３ｅ】グアニン応答性ツイスター型リボザイムの作製を示す図である。ＨＥＫ２９３細胞に上述のコンストラクトで遺伝子導入し、５００μＭのグアノシンで処理した。ＤＭＳＯを溶媒コントロールとして用いた。グアノシン処理の１８時間後に上清を回収し、ＥＬＩＳＡキットを用いてＥｐｏを測定した。結果を平均±ＳＤで表した（ｎ＝２）。２つの独立した実験の代表を示す。

【図４ａ】テオフィリン応答性ツイスター型リボスイッチの作製を示す図であり、ツイス

ター型リボザイムのループ２配列への連結テオフィリン・アプタマーの模式図を示す。テオフィリン・アプタマーとツイスターループ２を接続するステムの配列及び長さを示した。アプタマー及びリガンドは、△として示した。
【図４ｂ】テオフィリン応答性ツイスター型リボスイッチの作製を示す図であり、ルシフェラーゼ・アッセイの結果を示す。ＨＥＫ２９３細胞に上述のコンストラクトで遺伝子導入し、遺伝子導入の４時間後に２ｍＭのテオフィリンで処理したかまたは処理しなかった。
【図５ａ】哺乳類細胞におけるツイスター型リボスイッチの移植性（ｐｏｒｔａｂｉｌｉｔｙ）を示す図である。ツイスターＧｕａ１６リボスイッチならびにリンカー及び２Ａペプチド配列（リンカー２Ａ）を有するコンストラクトがＡＴＧの下流に、そして残りのルシフェラーゼコード配列の上流に挿入されている模式図（上側パネル）、またはツイスターＧｕａ１６及びリンカー２Ａ配列がＧＦＰの最初の１０アミノ酸のコード配列の下流に挿入されている模式図（下側パネル）を示す。
【図５ｂ】哺乳類細胞におけるツイスター型リボスイッチの移植性を示す図であり、ルシフェラーゼ・アッセイの結果を示す。ＨＥＫ２９３細胞に上述のコンストラクトで遺伝子導入した。遺伝子導入した細胞を、遺伝子導入の４時間後にグアニンで処理したかまたは処理しなかった。結果を平均±ＳＤで表す（ｎ＝３）。
【図６ａ】アプタマーリガンド応答性ＯＮツイスター型リボスイッチの作製を示す図であり、ＯＮツイスター・グアニン・リボスイッチ（アプタマーはツイスターＰ１の３’末端に連結されている）の模式図を示す。スズメバチツイスターの立体配置及びアプタマーの配列を一例として示しており、ここでＰ１ステムの３’末端（３ｂｐステムを含む）はアプタマー配列に連結されていた。この立体配置では、ステム配列は、ツイスターＰ１ステムとアプタマーＰ１ステムによって共有されていた。共有ステム配列を太線で示す。おそらく、アプタマーリガンドの非存在下では（上側パネル）、ツイスターＰ１ステムに連結されたアプタマー配列はツイスター構成もそのリボザイム切断活性も妨害しないので、ｍＲＮＡの切断、続いて遺伝子発現の阻害がもたらされる。アプタマーリガンドの存在下では（下側パネル）、アプタマーはＰ１ステムを形成し、ツイスターＰ１ステム形成に用いることができない共有ステム配列（太線）を形成するので、ツイスター構成もそのリボザイム活性も妨害され、ｍＲＮＡは無傷となり、遺伝子発現がもたらされる。
【図６ｂ】アプタマーリガンド応答性ＯＮツイスター型リボスイッチの作製を示す図である。ＨＥＫ２９３細胞に上述のルシフェラーゼ・コンストラクトで遺伝子導入した。遺伝子導入した細胞を、５００μＭのグアノシンで処理したかまたは処理しなかった。ＤＭＳＯを溶媒コントロールとして用いた。結果を平均±ＳＤで表す（ｎ＝３）。各コンストラクトの誘発倍率をグラフに示した。
【図７ａ】翻訳開始コドンの下流に配置されたハンマーヘッド型リボザイム配列の図である。上のパネルはヌクレオチド配列を示し、下のパネルは異なる読み枠（フレーム）を用いて翻訳されたペプチド配列を示す。各事例の一番上のラインは親リボザイムで、全部は翻訳されず、ヌクレオチド配列のドットは「一番上のラインと同じ」を示す。Ｔｈｏｓｅａａｓｉｇｎａウイルス由来の２Ａペプチド配列（Ｔ２Ａ）を２Ａとして示した。リボザイム配列中の潜在的な終止コドンを除去するために、変異を導入した。
【図７ｂ】翻訳開始コドンの下流に配置されたヘアピン型リボザイム配列の図である。上のパネルはヌクレオチド配列を示し、下のパネルは異なる読み枠（フレーム）を用いて翻訳されたペプチド配列を示す。各事例の一番上のラインは親リボザイムで、全部は翻訳されず、ヌクレオチド配列のドットは「一番上のラインと同じ」を示す。Ｔｈｏｓｅａａｓｉｇｎａウイルス由来の２Ａペプチド配列（Ｔ２Ａ）を２Ａとして示した。リボザイム配列中の潜在的な終止コドンを除去するために、変異を導入した。
【図７ｃ】上述のコンストラクトで遺伝子導入したＨＥＫ２９３細胞から生じたβガラクトシダーゼ活性の結果を示す図である。グラフ左半分は、ハンマーヘッド型リボザイム配列のコンストラクトの結果を示し、右半分はヘアピン型リボザイム配列のコンストラクトの結果を示す。ＬａｃＺ活性の低下倍率を、リボザイム不活性ミュータント・コンストラクトから生じた値と、リボザイム活性コンストラクトから生じた値の比として表した。各

リボザイムの最高倍率を矢印で示した。
【発明を実施するための形態】
【００２９】
本発明は、アプタマーによる小分子ヌクレオチド鎖切断性リボザイムの調節によって遺伝子発現を制御するためのポリヌクレオチド・コンストラクト、及び、アプタマーに結合するリガンドの存在または不存在に応答して該コンストラクトを用いて遺伝子発現を制御する方法を提供する。ポリヌクレオチド・コンストラクトは、リボザイム及びアプタマーを含むリボスイッチを少なくとも１つは含む。リボザイムがアプタマーにどのように結合しているかによって、アプタマーリガンドの存在下でリボザイムの自己切断を活性化するリボスイッチ（「オフ」リボスイッチ）、またはアプタマーの存在下でリボザイムの自己切断を阻害するリボスイッチ（「オン」リボスイッチ）が提供される。
【００３０】
遺伝子制御ポリヌクレオチド・カセットとは、標的遺伝子のＤＮＡに組み込まれると、該標的遺伝子の発現をアプタマー／リガンド媒介性のリボザイム自己切断の制御によって制御する能力を提供する、組換えＤＮＡコンストラクトを指す。本明細書では、ポリヌクレオチド・カセットまたはコンストラクトは、異なるソース（たとえば異なる生物、同じ生物からの異なる遺伝子など）に由来するエレメントを含む核酸（たとえばＤＮＡまたはＲＮＡ）である。ポリヌクレオチド・カセットは、リボスイッチを含む。本発明の文脈のリボスイッチは、センサー領域（たとえばアプタマー）とリボザイムとを含み、これらが一緒に、該センサー領域に結合するリガンドの存在を検知し、リボザイム結合部位の立体構造を改変する役割を担う。一実施形態では、標的遺伝子の発現は、アプタマーリガンドが存在する場合は増加し、リガンドが不存在の場合は減少する。別の実施形態では、標的遺伝子の発現は、アプタマーリガンドが存在する場合は減少し、リガンドが不存在の場合は増加する。
【００３１】
リボザイム
本発明で用いられるリボザイムは、標的細胞型において自己切断するどの小分子ヌクレオチド鎖切断性リボザイムであってもよく、たとえば、ハンマーヘッド型、ヘアピン型、Ｄ型肝炎ウイルス、Ｖａｒｋｕｄサテライト型、ツイスター型、ツイスターシスター型、ピストル型、及びハチェット型が挙げられる。たとえば、Ｒｏｔｈ ｅｔ ａｌ．, Ｎａｔ Ｃｈｅｍ Ｂｉｏｌ． １０（１）：５６－６０；及びＷｅｉｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．, Ｎａｔ Ｃｈｅｍ Ｂｉｏｌ． ２０１５ Ａｕｇ；１１（８）：６０６－１０を参照されたい（どちらも参照により本明細書に援用する）。米国特許公開第２０１５／００５６１７４号は、ヌクレオチド鎖切断活性を高めた修飾ハンマーヘッド型リボザイムを提供している（たとえば、図５Ａ～図５Ｆを参照されたい。参照により本明細書に援用する）。好ましいリボザイムは、ハンマーヘッド型、ヘアピン型、及びツイスター型である。一実施形態では、リボザイムは、Ｎａｓｏｎｉａ ｖｉｔｒｉｐｅｎｎｉ由来のツイスター型リボザイムである（配列番号３８）。一実施形態では、リボザイムは、環境試料から特定されたツイスター型リボザイムである（配列番号３９）。
【００３２】
リボスイッチ
本明細書では、「リボスイッチ」という用語は、ＲＮＡポリヌクレオチドの制御性セグメントを指す。本発明の文脈のリボスイッチは、センサー領域（たとえばアプタマー）と自己切断リボヌクレアーゼとを含み、これらが一緒に、リガンド（たとえば小分子）の存在を検知し、自己切断リボヌクレアーゼの立体構造を調節し、したがってその活性を調節する役割を担っている。一実施形態では、リボスイッチは、２つ以上のソースからのポリヌクレオチドを用いた組換え体である。本明細書では、リボスイッチに関しての「合成」という用語は、自然発生しないリボスイッチを指す。一実施形態では、センサー（たとえばアプタマー）とリボヌクレアーゼ領域は、ポリヌクレオチド・リンカーにより接合されている。一実施形態では、ポリヌクレオチド・リンカーは、ＲＮＡステムを形成する（す

なわち二本鎖であるＲＮＡポリヌクレオチドの領域）。

【００３３】

オフ・リボスイッチ

一態様では、本発明は、ステムによりアプタマーに連結されたツイスター型リボザイムを含むリボスイッチを含む、標的遺伝子の発現を制御するポリヌクレオチド・カセットを提供し、ここでツイスター型リボザイムをアプタマーに連結しているステムは、ツイスター型リボザイムのＰ３ステム位置でリボザイムに結合しており、標的遺伝子はツイスター型リボザイムのＰ１ステムに連結している（たとえば図３ａを参照されたい）。この場合は、リボスイッチは「オフ・リボスイッチ」である。それは、アプタマー／リガンド結合によってツイスター型リボザイムのリボヌクレアーゼ機能が高まり、ポリヌクレオチド・カセットが含まれる標的遺伝子ＲＮＡの切断をもたらすので、結果として標的遺伝子発現が低下するからである。

【００３４】

アプタマーステムの両アームがリボザイムＰ３ステムの両アームに連結されているこの立体配置では、このステムは、アプタマーがそのリガンドに結合したときにステムを形成できる追加配列を含む場合がある。この追加のステム配列には、アプタマーＰ１ステムからの配列及び／またはアプタマーにそのリガンドが結合するとステム形成を促進するように加えられた追加配列が含まれ得る。Ｐ３ステムは、リボザイムの野生型Ｐ３配列に対する変化を１つ、２つ、または３つ以上含む場合がある。いくつかの実施形態では、アプタマーをリボザイムに連結しているステムは、ツイスターのＰ３ステムからの配列もアプタマーステムからの配列も含まない。さらに、リボザイムをアプタマーに連結しているステム（Ｐ３ステムを含む）は、１つ以上のミスマッチを含む場合があり、ヌクレオチドは他方のステムアームのカウンターパートに相補的ではない。

【００３５】

アプタマーをリボザイムに連結しているステムは、リガンドとアプタマーの結合でステムが形成されてリボザイムのエンドヌクレアーゼ活性が促進されるような、また、リガンドが十分な量だけ存在していない場合にはリボザイムのエンドヌクレアーゼ活性を阻害する立体構造をとるような、十分な長さ（及びＧＣ含有率）であるものとする。ステムの長さと配列は、リガンドが存在する場合の標的遺伝子の許容可能なバックグラウンド発現、及びリガンドが存在しない場合の標的遺伝子の許容可能なバックグラウンド発現を許容するステムを特定するために、既知の技法を用いて修飾することができる。ステムがたとえば長すぎると、リガンドの存在下でも非存在下でも、活性のあるリボザイム立体構造が提供され得る。ステムが短すぎると、リガンドの存在下でも活性リボザイムを提供することができない。特定の実施形態では、リボザイムをアプタマーに連結しているステムは、約３～約７塩基対である。一実施形態では、リボザイムをアプタマーに連結しているステムは、３～７塩基対である。一実施形態では、リボザイムをアプタマーに連結しているステムは、４塩基対長である。一実施形態では、リボザイムをアプタマーに連結しているステムは、３塩基対長である。

【００３６】

アプタマーとリボザイムを連結しているステムは、必ずしも二本鎖のステム立体配置とは限らないことを理解されたい。図３ａに示すように、アプタマーがリガンドに結合していないときは、ステム構成が妨害され、リボザイムのヌクレオチド鎖切断活性は阻害される。アプタマーがそのリガンドと結合すると、ステムは安定し、リボザイムのヌクレオチド鎖切断活性が促進される。

【００３７】

このオフ・リボスイッチの立体配置では、リボザイムのＰ１ステムは標的遺伝子のヌクレオチド配列に連結している（たとえば図３ａを参照されたい）。このリボザイムＰ１ステムは、自然発生するリボザイムのＰ１配列の全部または一部を含む場合がある。このＰ１ステムは、別のソースからの追加のステム配列を含む場合がある。Ｐ１ステムは、リボザイムの野生型Ｐ１配列に対する変化を１つ、２つ、または３つ以上含む場合がある。い

くつかの実施形態では、リボザイムのＰ１ステムは、リボザイムの野生型Ｐ１配列からの配列を一切含まない。それでもそのステムは、その位置から、リボザイムのＰ１ステムとされる。Ｐ１ステムの長さと配列は、たとえば、標的遺伝子の許容可能なバックグラウンド発現を許容するステムを特定するために、既知の技法を用いて修飾することができる。一実施形態では、ツイスター型リボザイムのＰ１ステムは３～９塩基対である。一実施形態では、ツイスター型リボザイムのＰ１ステムは４～７塩基対である。一実施形態では、ツイスター型リボザイムのＰ１ステムは７塩基対である。一実施形態では、ツイスター型リボザイムのＰ１ステムは８塩基対である。

【００３８】

オフ・リボスイッチを含むポリヌクレオチド・カセットは、限定ではないが、５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ、及び開始コドン下流など、標的遺伝子の１つ以上の位置に配置することができる。

【００３９】

オン・リボスイッチ

別の態様では、本発明は、アプタマーに連結されたツイスター型リボザイムを含むリボスイッチを含む、標的遺伝子の発現を制御するポリヌクレオチド・カセットを提供し、ここで該アプタマーは、ツイスター型リボザイムＰ１ステムの３’または５’末端に連結されており、アプタマーがツイスター型リボザイムＰ１ステムの３’末端に連結されている場合は、ツイスター型リボザイムＰ１ステムの３’アームの一部分があるいはアプタマーＰ１ステムの５’アームの一部であり、また、アプタマーがツイスター型リボザイムＰ１ステムの５’末端に連結されている場合は、ツイスター型リボザイムＰ１ステムの５’アームの一部分があるいはアプタマーＰ１ステムの３’アームの一部である（たとえば、図６ａ～図６ｂを参照されたい）。この場合は、リボスイッチは「オン・リボスイッチ」である。それは、アプタマー／リガンド結合によりツイスター型リボザイムのリボヌクレアーゼ機能が阻害され、ポリヌクレオチド・カセットが含まれる標的遺伝子ＲＮＡの切断が減少するので、結果として標的遺伝子発現がリガンドの存在下で増加するからである。

【００４０】

オフ・リボスイッチに関して述べたアプタマー及びリボザイムステムと同様に、リボザイムＰ１ステム及びアプタマーＰ１ステムは、野生型ステム配列を含んでいてもいなくてもよい。したがって、ステムの名称は、リボザイムまたはアプタマー上の位置に基づくものであって、該ステムが何らかの特定の配列を含むことを意味するものではない。Ｐ１リボザイムステムとＰ１アプタマーステムは、共有するステム配列に加えて、それぞれ独立してステム配列を含む場合がある。この追加のステム配列は、リボザイムＰ１ステムもしくはアプタマーＰ１ステムからの配列、及び／またはステム形成を促進するように加えられた追加配列を含む場合がある。さらに、リボザイムＰ１及び／またはアプタマーＰ１ステムは、１つ以上のミスマッチを含む場合があり、ヌクレオチドは他方のステムアームのカウンターパートに相補的ではない。

【００４１】

リボザイムＰ１ステム及びアプタマーＰ１ステムは、アプタマーがアプタマーリガンドの存在下でＰ１ステムを形成し、リガンドが存在しない場合はリボザイムがＰ１ステムを形成するような、十分な長さ（及びＧＣ含有率）であるものとする。ステムの長さと配列は、リガンドが存在しない場合の標的遺伝子の許容可能なバックグラウンド発現、及びリガンドが存在する場合の標的遺伝子の許容可能なバックグラウンド発現を許容するステムを特定するために、既知の技法を用いて修飾することができる。一実施形態では、ツイスター型リボザイムのＰ１ステムは４～９塩基対、５～８塩基対、６塩基対、または７塩基対である。一実施形態では、アプタマーのＰ１ステムは６～１１塩基対、７～１０塩基対、８塩基対、または９塩基対である。

【００４２】

このオン・リボスイッチ立体配置では、アプタマーはリボザイムに隣接しており（５’または３’）、アプタマーとリボザイムの両方が、選択的に共有されるステムアームを含む。

アプタマーがそのリガンドに結合すると、アプタマーＰ１ステムが安定し、リボザイム構成の一部としての使用が阻止され、リボザイムのエンドヌクレアーゼ活性が阻害される。リガンドが存在しない場合、共有ステムは自由にリボザイムＰ１ステムの一部を形成できるので、リボザイムのエンドヌクレアーゼ活性及び標的ＲＮＡの切断が許容され、結果として標的遺伝子発現が低下する。諸実施形態では、リボザイムステムとアプタマーステムの選択的共有部分は、４～８ヌクレオチド、５～７ヌクレオチド、６ヌクレオチド、または７ヌクレオチドである。

【００４３】

オン・リボスイッチを含むポリヌクレオチド・カセットは、限定ではないが、５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ、及び開始コドン下流など、標的遺伝子の１つ以上の位置に配置することができる。

【００４４】

アプタマー／リガンド

一実施形態では、センサー領域はアプタマーを含む。本明細書では、「アプタマー」という用語は、リガンドに特異的に結合するＲＮＡポリヌクレオチドを指す。「リガンド」という用語は、アプタマーが特異的に結合する分子を指す。一実施形態では、リガンドは低分子量（約１，０００ダルトン未満）分子であり、たとえば、脂質、モノサッカライド、二次メッセンジャー、補助因子、金属イオン、他の天然産物及び代謝物、核酸、ならびにほとんどの治療薬が挙げられる。一実施形態では、リガンドは、２つ以上のヌクレオチド塩基を有するポリヌクレオチドである。

【００４５】

一実施形態では、リガンドは、８－アザグアニン、アデノシン５’－モノホスファートモノヒドラート、アンホテリシンＢ、エバーメクチンＢ１、アザチオプリン、酢酸クロルマジノン、メルカプトプリン、塩酸モリシジン、Ｎ６－メチルアデノシン、ナダイド、プロゲステロン、塩酸プロマジン、パモ酸ピルビニウム、スルファグアニジン、プロピオン酸テストステロン、チオグアノシン、チロキサポール、及びボリノスタットからなる群より選択される。

【００４６】

アプタマーリガンドは、がん化などの特定の生理学的／病理学的条件下で大幅に増加する細胞内在性成分であってもよく、たとえば、ＧＴＰやＧＤＰなどの二次メッセンジャー分子、カルシウム；脂肪酸、または乳癌の１３－ＨＯＤＥなど不適切に代謝された脂肪酸（Ｆｌａｈｅｒｔｙ，ＪＴ ｅｔ ａｌ．，Ｐｌｏｓ Ｏｎｅ，Ｖｏｌ．８，ｅ６３０７６，２０１３、参照により本明細書に援用する）；アミノ酸またはアミノ酸代謝物；がん細胞または代謝疾患の正常細胞でふつうは高レベルとなる、解糖経路の代謝物；ならびにがん関連分子のＲａｓまたはミュータントＲａｓタンパク質、肺癌のミュータントＥＧＦＲ、多種のがんのインドールアミン－２，３－ジオキシゲナーゼ（ＩＤＯ）が挙げられる。内在性リガンドとしては、ＪＰ Ｗｉｅｂｅ（Ｅｎｄｏｃｒｉｎｅ－Ｒｅｌａｔｅｄ Ｃａｎｃｅｒ（２００６）１３：７１７－７３８、参照により本明細書に援用する）により開示されている乳癌のプロゲステロン代謝物が挙げられる。内在性リガンドとしては、Ｍｉｎｔｏｎ，ＤＲ ａｎｄ Ｎａｎｕｓ，ＤＭ（Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ，Ｕｒｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１２，２００５、参照により本明細書に援用する）により開示されている、乳酸（ｌａｃｔａｔｅ）、グルタチオン、キヌレニンなど腎癌の主要代謝酵素の変異による増加レベルを示す代謝物も挙げられる。

【００４７】

アプタマーは、所期の標的分子（すなわちリガンド）と複合体を形成できる結合領域を有する。結合の特異性は、アプタマーのリガンドに対する解離定数（Ｋｄ）をアプタマーの無関係分子に対する解離定数と比較して定めることができる。したがって、リガンドは、無関係の物質よりも高い親和性でアプタマーに結合する分子である。一般に、アプタマーのリガンドに対するＫｄは、アプタマーと無関係分子のＫｄよりも少なくとも約１０倍小さくなる。他の実施形態では、Ｋｄは少なくとも約２０倍小さく、少なくとも約５０倍

小さく、少なくとも約１００倍小さく、少なくとも約２００倍小さい。アプタマーは一般に、約１５～約２００ヌクレオチド長である。より一般的には、アプタマーは約３０～約１００ヌクレオチド長である。

【００４８】

リボスイッチの一部として組み込まれ得るアプタマーは、自然発生するアプタマーもしくはその修飾体か、またはデノボ設計の及び／または指数関数的増幅によるリガンドの試験管内進化（ＳＥＬＥＸ）法もしくは他のスクリーニング方法でスクリーニングされたアプタマーであってもよい。小分子リガンドに結合するアプタマーの例としては、限定ではないがテオフィリン、ドーパミン、スルホローダミンＢ、セロビオース、ケナマイシンＡ、リビドマイシン、トブラマイシン、ネオマイシンＢ、バイオマイシン、クロラムフェニコール、ストレプトマイシン、サイトカイン、細胞表面分子、及び代謝物が挙げられる。小分子を認識するアプタマーの説明は、たとえばＦａｍｕｌｏｋ，　Ｓｃｉｅｎｃｅ　９：３２４－９　（１９９９）及びＭｃＫｅａｇｕｅ，　Ｍ．　＆　ＤｅＲｏｓａ，　Ｍ．Ｃ．Ｊ．　Ｎｕｃ．　Ａｃｉ．　２０１２（どちらも参照により本明細書に援用する）を参照されたい。別の実施形態では、アプタマーは相補的ポリヌクレオチドである。

【００４９】

アプタマー／リガンドを特定する方法

一実施形態では、アプタマーは、特定の小分子リガンドに結合するように設計される。特定のリガンドに結合するアプタマーを設計し選択する方法は、６２／３７０，５９９（参照により本明細書に援用する）に開示されている。アプタマーをスクリーニングする他の方法としては、たとえばＳＥＬＥＸが挙げられる。ＳＥＬＥＸを用いて、選択的に小分子に結合するアプタマーを設計する方法は、たとえば、米国特許第５，４７５，０９６号、同第５，２７０，１６３号、及びＡｂｄｕｌｌａｈ　Ｏｚｅｒ，　ｅｔ　ａｌ．　Ｎｕｃ．　Ａｃｉ．　２０１４で開示されており、これらを参照により本明細書に援用する。ＳＥＬＥＸ法の改造が米国特許第５，５８０，７３７号及び同第５，５６７，５８８号で開示されており、これらを参照により本明細書に援用する。

【００５０】

アプタマーを特定するための選択法には、通常、ランダム化されたまたは変異誘発された領域を含む所望の長さのＤＮＡまたはＲＮＡ分子の巨大プールを調製することが含まれる。たとえば、アプタマー選択用のオリゴヌクレオチドのプールには、ＰＣＲプライマーの結合に有用な約１５～２５ヌクレオチド長の所定の配列の領域が隣接する、ランダム化された２０～１００ヌクレオチドの領域が含まれる場合がある。オリゴヌクレオチド・プールは標準的なＰＣＲ法、または選択された核酸配列の増幅を可能にする他の手段によって増幅される。ＤＮＡプールは、ＲＮＡアプタマーが望ましい場合、インビトロで転写されてＲＮＡ転写物プールを生じることができる。ＲＮＡまたはＤＮＡオリゴヌクレオチドのプールは次に、所望のリガンドに特異的に結合する能力に基づいて、選択にかけられる。選択法としては、たとえば親和性クロマトグラフィーが挙げられるが、別の分子に特異的に結合する能力に基づく核酸の選択を可能にするあらゆるプロトコルを使用することができる。小分子に結合し、細胞内で機能するアプタマーを特定するための選択法には、細胞ベースのスクリーニング法が含まれる場合がある。親和性クロマトグラフィーの場合、オリゴヌクレオチドを、カラム内の基質上または磁気ビーズ上に固定されている標的リガンドと接触させる。オリゴヌクレオチドは、塩濃度、温度、及び正常な生理条件を模倣する他の条件の存在下で、リガンド結合に関して好ましく選択される。プール内のオリゴヌクレオチドでリガンドに結合するものはカラムまたはビーズ上に保持され、結合しない配列は流出する。次に、リガンドに結合するオリゴヌクレオチドは、（通常は溶出後に）ＰＣＲにより（ＲＮＡ転写物を用いる場合は逆転写後に）増幅される。この選択法は、選択された配列について、全部で約３～１０反復ラウンドの選択手順で繰り返される。こうして得られたオリゴヌクレオチドを増幅し、クローニングし、標準的な手順を用いて配列決定して、標的リガンドに結合できるオリゴヌクレオチドの配列を特定する。アプタマー配列が特定されると、変異誘発されたアプタマー配列を含むオリゴヌクレオチドのプールか

ら開始して追加の選択ラウンドを行うことで、アプタマーをさらに最適化することができる。

【００５１】

１ラウンド以上のインビトロ選択の後に、インビボのアプタマースクリーニングを用いることができる（たとえばＳＥＬＥＸ）。たとえばＫｏｎｉｇ，　Ｊ．　ｅｔ　ａｌ．（ＲＮＡ．　２００７，　１３（４）：６１４－６２２、参照により本明細書に援用する）は、ＳＥＬＥＸと酵母３ハイブリッドシステムを組み合わせたアプタマーのインビボ選択を説明している。

【００５２】

標的遺伝子

本発明の遺伝子制御カセットは、標的細胞、組織、または生物で発現し得るあらゆる標的遺伝子の発現を制御するのに用いることができるプラットフォームである。「標的遺伝子」という用語は、細胞に導入され、ＲＮＡに転写され翻訳され、かつ／または適切な条件下で発現できるポリヌクレオチドを指す。あるいは、標的遺伝子は標的細胞に内在し、本発明の遺伝子制御カセットは標的遺伝子内（たとえば内在性標的遺伝子の５’または３’ＵＴＲ）に配置される。標的遺伝子の一例は、治療用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである。別の実施形態では、標的遺伝子は、ｍｉＲＮＡ、ｒＲＮＡ、小型または長鎖ノンコーディングＲＮＡ、低分子ヘアピン型ＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、及びあらゆる他の制御性ＲＮＡなどのＲＮＡをコードする。一実施形態では、標的遺伝子は、組換えＤＮＡコンストラクトが内部で転写されることになる細胞にとって外来性である。別の実施形態では、標的遺伝子は、組換えＤＮＡコンストラクトが内部で転写されることになる細胞に内在する。

【００５３】

本発明による標的遺伝子は、タンパク質をコードする遺伝子、または非タンパク質コーディングＲＮＡをコードする配列の場合がある。標的遺伝子は、たとえば、構造タンパク質、酵素、細胞シグナルタンパク質、ミトコンドリアタンパク質、ジンクフィンガータンパク質、ホルモン、輸送タンパク質、増殖因子、サイトカイン、細胞内タンパク質、細胞外タンパク質、膜貫通タンパク質、細胞質タンパク質、核タンパク質、受容体分子、ＲＮＡ結合タンパク質、ＤＮＡ結合タンパク質、転写因子、翻訳機構、チャネルタンパク質、モータータンパク質、細胞接着分子、ミトコンドリアタンパク質、代謝酵素、キナーゼ、ホスファターゼ、交換因子、シャペロンタンパク質、及びこれらのいずれかの調節因子をコードする遺伝子であってもよい。諸実施形態では、標的遺伝子は、エリスロポエチン（Ｅｐｏ）、ヒト成長ホルモン（ｈＧＨ）、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、ヒトインスリン、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質９（ｃａｓ９）、またはたとえば治療用抗体を含む免疫グロブリン（またはその一部分）をコードする。

【００５４】

発現コンストラクト

本発明では、標的遺伝子をコードするポリヌクレオチドを標的細胞に導入するための、本明細書で説明する遺伝子制御カセットを含む、組換えベクターの使用が意図される。多くの実施形態では、本発明の組換えＤＮＡコンストラクトは、宿主細胞内でＤＮＡを複製させ、該細胞内で適切なレベルで標的遺伝子を発現させるＤＮＡセグメントを含む追加のＤＮＡエレメントを含む。当業者であれば、発現制御配列（プロモーター、エンハンサーなど）は、標的細胞における標的遺伝子の発現を促進する能力に基づき選択されることを理解しよう。「ベクター」は、インビトロまたはインビボで宿主細胞内に送達されるポリヌクレオチドを含む、組換えプラスミド、酵母人工染色体（ＹＡＣ）、ミニ染色体、ＤＮＡミニサークル、またはウイルス（ウイルス由来の配列も含む）を意味する。一実施形態では、組換えベクターは、ウイルスベクター、または複数のウイルスベクターの組合せである。

【００５５】

標的細胞、組織、または生物においてアプタマー媒介性の標的遺伝子発現をもたらすウ

イルスベクターは、当業界で知られており、アデノウイルス（ＡＶ）ベクター、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクター、レトロウイルス及びレンチウイルスベクター、ならびに単純ヘルペスウイルス１型（ＨＳＶ１）ベクターが挙げられる。

【００５６】

アデノウイルスベクターとしては、たとえば、ヒトアデノウイルス２型及びヒトアデノウイルス５型に基づく、Ｅ１領域及びＥ３領域の欠失という欠損を有し複製されているものが挙げられる。転写カセットをＥ１領域に挿入して、組換えＥ１／Ｅ３欠失ＡＶベクターを得ることができる。アデノウイルスベクターとしては、ウイルスコード配列を含まない、ヘルパー依存型の高能力アデノウイルスベクター（高能力の「ｇｕｔｌｅｓｓ」または「ｇｕｔｔｅｄ）ベクターとしても知られている）も挙げられる。これらのベクターは、ウイルスＤＮＡ複製及びパッケージングに必要なシス作用性エレメント、主として末端逆位配列（ＩＴＲ）及びパッケージングシグナル（Ψ）を含む。これらのヘルパー依存型ＡＶベクターゲノムは、数百の塩基対からおよそ３６ｋｂの外来ＤＮＡまで担持する能力がある。

【００５７】

組換えアデノ随伴ウイルス「ｒＡＡＶ」ベクターには、あらゆるアデノ随伴ウイルスセロタイプに由来するあらゆるベクターが含まれ、限定ではないが、ＡＡＶ－１、ＡＡＶ－２、ＡＡＶ－３、ＡＡＶ－４、ＡＡＶ－５、ＡＡＶ－７、及びＡＡＶ－８、ＡＡＶ－９、ＡＡＶ－１０などが挙げられる。ｒＡＡＶベクターは、全部または一部が欠失した１つ以上のＡＡＶ野生型遺伝子、好ましくはＲｅｐ及び／またはＣａｐ遺伝子を有する場合があるが、機能的な隣接するＩＴＲ配列は保持している。機能的ＩＴＲ配列は、ＡＡＶゲノムの救済、複製、パッケージング、及び可能な染色体組込みのために保持されている。ＩＴＲは野生型ヌクレオチド配列でなくてもよく、配列が機能的救済、複製、及びパッケージングを提供する限りは、（たとえば、ヌクレオチドの挿入、欠失、または置換により）改変されていてもよい。

【００５８】

あるいは、レンチウイルスベクターなどの他の系を本発明で使用することができる。レンチウイルス系は、分裂細胞だけでなく非分裂細胞にも形質導入することができ、これらをたとえばＣＮＳの非分裂細胞を標的とする用途で有用にし得る。レンチウイルスベクターは、ヒト免疫不全ウイルス由来であり、同ウイルスと同じく、宿主ゲノムに組み込まれて長期の遺伝子発現の可能性を提供する。

【００５９】

遺伝子制御カセットを含む標的遺伝子を担持する、プラスミド、ＹＡＣ、ミニ染色体、及びミニサークルなどのポリヌクレオチドは、たとえばカチオン脂質、ポリマー、または両方を担体として用いる非ウイルスベクター系により、細胞または生物に導入される場合もある。ポリ－Ｌ－リジン（ＰＬＬ）ポリマーとポリエチレンイミン（ＰＥＩ）ポリマーの複合系により、ベクターを細胞に送達することもできる。ベクターを細胞に送達する他の方法としては、細胞培養物の場合も生物の場合も、水力学的注入、及び電気穿孔、及び超音波の利用が挙げられる。遺伝子送達のウイルス及び非ウイルス送達系の説明は、Ｎａｙｅｒｏｓｓａｄａｔ，Ｎ．ｅｔ ａｌ．（Ａｄｖ Ｂｉｏｍｅｄ Ｒｅｓ．２０１２；１：２７）を参照されたい（参照により本明細書に援用する）。

【００６０】

標的遺伝子の発現を調節する方法

一態様では、本発明は、（ａ）本発明の遺伝子制御ポリヌクレオチド・カセットを標的遺伝子に挿入すること、（ｂ）該遺伝子制御カセットを含む該標的遺伝子を細胞に導入すること、及び（ｃ）該細胞を、該アプタマーに結合する、該標的遺伝子発現の調節に有効な量のリガンドに曝露することによって、標的遺伝子（たとえば治療用遺伝子）の発現を調節する方法を提供する。一実施形態では、ポリヌクレオチド・カセットは、オフ・リボスイッチを含むので、アプタマーリガンドへの曝露により標的遺伝子発現は低下する。一実施形態では、ポリヌクレオチド・カセットはオン・リボスイッチを含むので、アプタマ

ーリガンドへの曝露により標的遺伝子発現は増加する。一実施形態では、リガンドは小分子である。諸態様では、標的細胞における標的遺伝子の発現は、それが導入された細胞に所望の特性を与えるか、そうではなく所望の治療結果をもたらす。

【００６１】

一実施形態では、１つ以上の遺伝子制御カセットが、標的遺伝子の３’ＵＴＲ及び／または５’ＵＴＲに挿入される。一実施形態では、１つの遺伝子制御カセットが、１つの標的遺伝子の３’ＵＴＲに挿入される。他の実施形態では２つ、３つ、または４つ以上の遺伝子制御カセットが、この標的遺伝子に挿入される。一実施形態では、２つの遺伝子制御カセットが、この標的遺伝子に挿入される。複数の遺伝子制御カセットが１つの標的遺伝子に挿入される場合、それぞれが同一のアプタマーを含んで、複数のカセットのリボヌクレアーゼ切断の調節に１つのリガンドが用いられるようにし、それによって標的遺伝子発現が調節されるようにしてもよい。他の実施形態では、複数の遺伝子制御カセットが１つの標的遺伝子に挿入され、それぞれが異なるアプタマーを含んで、複数の異なる小分子リガンドへの曝露によって標的遺伝子発現が調節されるようにしてもよい。他の実施形態では、複数の遺伝子制御カセットが１つの標的遺伝子に挿入され、それぞれが異なるリボヌクレアーゼ基質配列を含んでいる。これは組換えを減らし、ウイルスベクターへの組込みをさらに容易にするという点で、有用であり得る。

【００６２】

一実施形態では、本発明のポリヌクレオチド・カセットは、標的遺伝子開始コドンの下流（すなわち３’）に配置されると、標的遺伝子発現の調節に有効である。一実施形態では、ポリヌクレオチド・カセットが標的遺伝子の翻訳開始コドンの下流に挿入される場合、リボスイッチは開始コドンに隣接している。他の実施形態では、リボスイッチは、標的遺伝子の開始コドンから約１～約１００、約１～約５０、または約１～約２０ヌクレオチドである。一実施形態では、ポリヌクレオチド・カセットは、２Ａペプチド配列をリボスイッチの３’末端と標的遺伝子コード配列の間に含む。一実施形態では、ポリヌクレオチド・カセットは、２Ａペプチド配列及びリンカー（「２Ａリンカー」）を、リボスイッチの３’末端と標的遺伝子コード配列の間に含む。実施例で用いられる２Ａ配列は、Ｔｈｏｓｅａｓｉｇｎａウイルスから特定されたものなので、「Ｔ２Ａ」と呼ばれる場合もある。Ｔ２Ａの代わりに、リーダー・ポリペプチドを残りの遺伝子産物から分離する他の配列を用いてもよい。他の２Ａペプチドとしては、ピコナウイルスで特定されたもの、口蹄疫ウイルス（Ｆ２Ａ、最初に発見されたもの）、ウマ鼻炎Ａウイルス（Ｅ２Ａ）、及びブタテッショウウイルス（Ｐ２Ａ）が挙げられる。他の２Ａペプチドとしては、Ｃ型ロタウイルスからの２Ａペプチドが挙げられる。

【００６３】

本発明のポリヌクレオチド・カセットは、標的遺伝子の発現を制御する他の機構と併用することができる。一実施形態では、本発明のポリヌクレオチド・カセットは、ＷＯ２０１６／１２６７４７（参照により本明細書に援用する）で説明されている選択的スプライシングのアプタマー媒介性制御により標的遺伝子発現を調節する遺伝子制御カセットと併用される。

【００６４】

治療方法及び医薬組成物

本発明の一態様は、遺伝子治療により送達される治療用タンパク質のレベルを制御する方法を提供する。この実施形態では、「標的遺伝子」が治療用タンパク質をコードする場合がある。「標的遺伝子」は細胞に内在する、または外来性のタンパク質をコードする場合がある。

【００６５】

アプタマー駆動型リボスイッチを有する制御性カセットを含む治療用遺伝子配列は、インビトロまたはエクスビボで、たとえばベクターにより、標的細胞に送達される。「標的遺伝子」の細胞特異性は、ベクター内のプロモーターまたは他のエレメントによって制御することができる。標的遺伝子及びポリヌクレオチド・カセットを含むベクター・コンス

トラクトの送達及び標的組織の遺伝子導入の結果、制御された標的遺伝子の安定した遺伝子導入がもたらされることは、治療用タンパク質を生産する第１のステップである。

【００６６】

しかし、標的遺伝子配列内に制御性カセットが存在するせいで、標的遺伝子は有意なレベルで発現しない。いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、制御性カセットのリボスイッチに含まれるアダプタマーに結合する特異的リガンドの非存在下で「オフ状態」である。アプタマーに特異的なリガンドが投与されてはじめて（あるいはそうではなく十分な量が存在する場合に）、標的遺伝子発現が活性化される。他の実施形態では、標的遺伝子は、制御性カセットのリボスイッチに含まれるアダプタマーに結合する特異的リガンドの存在下で「オフ状態」である。投与が停止されると（あるいはそうではなくリガンドが十分に低レベルで存在する場合に）、標的遺伝子発現が生じる。

【００６７】

標的遺伝子を含むベクター・コンストラクトの送達と、活性化リガンドの送達は、時間的に離すのが一般的である。活性化リガンドの送達により、タンパク質発現のレベルと同じく、標的遺伝子をいつ発現させるかが制御される。リガンドは、限定ではないが、経口、筋内（ＩＭ）、静脈内（ＩＶ）、眼内、または外用など、いくつもの経路で送達することができる。

【００６８】

リガンド送達のタイミングは、標的遺伝子の活性化の要件による。たとえば、標的遺伝子がコードする治療用タンパク質が常時必要とされる場合、「オン」リボスイッチの場合であれば、経口小分子リガンドを毎日、または１日複数回送達して、標的遺伝子が確実に連続的に活性化されるようにし、したがって治療用タンパク質が連続的に発現するようにしてもよい。標的遺伝子が長時間作用性の場合、誘発リガンドはあまり頻繁に投与しなくてもよい。

【００６９】

本発明は、制御性ポリヌクレオチド・カセットのリボスイッチ内のアプタマーに特異的なリガンドの一時的投与により決定されるような、一時的に制御される治療用導入遺伝子の発現を可能にする。（「オン」リボスイッチの場合）リガンド投与時だけ治療用導入遺伝子の発現が増加することは、リガンドの非存在下では標的遺伝子をオフにできることによって、遺伝子治療の安全性を高める。

【００７０】

異なるアプタマーを用いて、異なるリガンドに標的遺伝子を活性化させるかまたは抑制させることができる。本発明の特定の実施形態では、制御性カセットを含む各治療用遺伝子が、特定の小分子により活性化される特定のアプタマーをカセット内に有することになる。このことは、各治療用遺伝子が、その内部に収容しているアプタマーに特異的なリガンドによってのみ活性化されることができることを意味する。これらの実施形態では、各リガンドは、１つの治療用遺伝子だけを活性化することになる。このため、いくつかの異なる「標的遺伝子」を一個体に送達することが可能になり、それぞれが、各標的遺伝子に収容されている制御性カセット内に含まれるアプタマーに特異的なリガンドが送達されると活性化する。

【００７１】

本発明は、その遺伝子を体に送達することができるあらゆる治療用タンパク質（エリスロポエチン（ＥＰＯ）または治療用抗体など）が、活性化リガンドが送達されると、該体によって生産されることを可能にする。この治療用タンパク質送達法は、そうした治療用タンパク質、たとえばがん治療、または炎症性疾患もしくは自己免疫疾患の阻止に用いる抗体を、体外で製造してから注射または注入することにとって代わることができる。制御された標的遺伝子を含有する体は生体製造工場となり、遺伝子に特異的なリガンドが投与されるとスイッチがオンになる。

【００７２】

治療用タンパク質の投与レベル及び投与のタイミングは、治療効果にとって重要であり

得る。たとえば、がんの場合に送達されるＡＶＡＳＴＩＮ（抗ＶＥＧＦ抗体）である。本発明は、治療用タンパク質レベル及び効果のモニタリングに応答して、投与をますます容易にする。

【００７３】

一実施形態では、標的遺伝子は、特定のＤＮＡ配列を標的とし編集することができるヌクレアーゼをコードする場合がある。そのようなヌクレアーゼとしては、Ｃａｓ９、ヌクレアーゼを含むジンクフィンガー、またはＴＡＬＥＮが挙げられる。これらのヌクレアーゼの場合、ヌクレアーゼタンパク質は、標的の内在性遺伝子の編集に十分な短期間だけ必要とされる場合がある。しかし、無制御のヌクレアーゼ遺伝子が体に送達されると、このタンパク質は残りの細胞寿命にわたって存在する可能性がある。ヌクレアーゼの場合、ヌクレアーゼが長く存在するほど、オフターゲット編集のリスクが高まる。そのようなタンパク質の発現の制御は、安全面で大きな利点となる。この場合、制御性カセットを含むヌクレアーゼ標的遺伝子を含むベクターを、体内の適切な細胞に送達することができる。標的遺伝子はカセットに特異的なリガンドの非存在下では「オフ」状態なので、ヌクレアーゼは生産されない。活性化リガンドが投与されたときだけ、ヌクレアーゼが生産される。十分な編集が行われるだけの時間が経過すると、リガンドは停止され、再投与されない。したがって、その後はヌクレアーゼ遺伝子は「オフ」状態になり、さらなるヌクレアーゼは生産されず、編集も停止している。このアプローチは、ＣＥＰ２９０の変異を原因とするＬＣＡ１０やＡＢＣＡ４の変異を原因とするＳｔａｒｇａｒｄｔ病など数々の遺伝性網膜症を含む、遺伝疾患の治療に用いることができる。

【００７４】

特異的リガンドの投与によってのみ活性化される、治療用タンパク質をコードする制御された標的遺伝子の投与は、多種の疾患の治療用遺伝子の制御に用いることができ、たとえばがん治療用抗体、免疫疾患用の免疫調節タンパク質もしくは抗体、代謝疾患、ＰＮＨなどの希少疾患用の制御された遺伝子としての抗Ｃ５抗体もしくは抗体断片、あるいは眼の血管新生の治療用抗体、ならびにドライ型ＡＭＤ用の免疫調節タンパク質がある。

【００７５】

多様な特定の疾患及び状態の治療を可能にする多様な特定の標的遺伝子が、本発明での使用に適している。たとえば、インスリンまたはインスリンアナログ（好ましくはヒトインスリンまたはヒトインスリンアナログ）を、標的遺伝子として、Ｉ型糖尿病、ＩＩ型糖尿病、または代謝症候群の治療に用いることができ；ヒト成長ホルモンを、標的遺伝子として、成長障害の子どもまたは成長ホルモン欠損の成人の治療に用いることができ；エリスロポエチン（好ましくはヒトエリスロポエチン）を、標的遺伝子として、慢性腎疾患による貧血、脊髄形成異常症による貧血、またはがん化学療法による貧血の治療に用いることができる。

【００７６】

本発明は、単一遺伝子欠損による疾患、たとえば嚢胞性線維症、血友病、筋ジストロフィー、サラセミア、または鎌状赤血球貧血の治療に特に好適であり得る。したがって、ヒトβ－、γ－、δ－、またはζ－グロビン（ｇｌｏｂｉｎ）を、標的遺伝子として、β－サラセミアまたは鎌状赤血球貧血の治療に用いることができ；ヒト第ＶＩＩＩ因子または第ＩＸ因子を、標的遺伝子として、血友病Ａまたは血友病Ｂの治療に用いることができる。

【００７７】

本発明で用いるリガンドは、一般には１つ以上の製薬上許容される担体と組み合せて、患者への投与に適した医薬組成物とされる。製薬上許容される担体としては、溶媒、結合剤、希釈剤、崩壊剤、滑剤、分散媒、コーティング、抗細菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤など、製薬業界で一般的に使われるものが挙げられる。医薬組成物は、錠剤、丸薬、カプセル、トローチなどの剤形の場合があり、所期の投与経路に合うように製剤される。投与経路の例としては、非経口、たとえば、静脈内、皮内、鼻内、皮下、経口、吸引、経皮（外用）、経粘膜、及び直腸内が挙げられる。

【００７８】

リガンドを含む医薬組成物は、標的遺伝子を所望通りに制御するのに十分な量のリガンドが患者に送達されるような投与スケジュールで、患者に投与される。リガンドが小分子であって、剤形が錠剤やカプセルなどである場合、好ましくは医薬組成物は、０．１ｍｇ～１０ｇのリガンド、０．５ｍｇ～５ｇのリガンド、１ｍｇ～１ｇのリガンド、２ｍｇ～７５０ｍｇのリガンド、５ｍｇ～５００ｍｇのリガンド、または１０ｍｇ～２５０ｍｇのリガンドを含む。

【００７９】

医薬組成物は、１日１回、または１日複数回（たとえば１日２回、３回、４回、５回、またはそれ以上）投与される場合がある。あるいは、医薬組成物は、１日１回よりも少なく、たとえば２日おき、３日おき、４日おき、５日おき、６日おき、７日おき、８日おき、９日おき、１０日おき、１１日おき、１２日おき、１３日おき、もしくは１４日おきに、または月１回かもしくは数か月おきに、投与される場合もある。本発明のいくつかの実施形態では、医薬組成物は患者にわずかな回数しか投与されない場合があり、たとえば、１回、２回、３回などである。

【００８０】

本発明は、標的遺伝子がコードする治療用タンパク質の発現の増加を必要とする患者を治療する方法を提供し、該方法は、アプタマー用のリガンドを含む医薬組成物を患者に投与することを含み、該患者は該標的遺伝子を含む組換えＤＮＡを既に投与されており、該標的遺伝子は本発明の遺伝子制御カセットを含んでおり、該カセットは該アプタマーの該リガンドにより該標的遺伝子のプレｍＲＮＡの選択的スプライシングによって該標的遺伝子の発現を制御する能力を提供し、したがって該治療用タンパク質の発現を増加させる。

【００８１】

製品及びキット

本明細書で説明する方法で使用されるキットまたは製品も提供される。諸態様では、キットは、好適な包装材に包まれた本明細書で説明する組成物（たとえば、遺伝子制御カセットを含む標的遺伝子を含むベクターの送達用組成物）を含む。本明細書で説明する組成物（眼内注入用の組成物など）用の好適な包装材は当業界で知られており、たとえば、バイアル（密封バイアルなど）、容器、アンプル、ボトル、瓶、柔らかい包装材（たとえば、密封Ｍｙｌａｒまたはプラスチック袋）などが挙げられる。これらの製品はさらに滅菌され、かつ／または密封される場合がある。

【００８２】

本発明はまた、本明細書で説明する組成物を含み、さらに、たとえば本明細書で説明する用途などの組成物の使用法についての使用説明（複数可）を含み得る、キットを提供する。本明細書で説明するキットはさらに、商業的にユーザー視点から望ましいその他の物、たとえばその他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び、たとえば本明細書で説明するあらゆる方法を含む投与の実施のための説明を記載した添付文書を含む場合もある。たとえば、いくつかの実施形態では、キットは、本発明の遺伝子制御カセットを含む標的遺伝子発現用のｒＡＡＶ、注入に適した製薬上許容される担体、ならびにバッファー、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び注入を実施するための説明を記載した添付文書のうちの１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、キットは、眼内注入、筋内注入、静脈内注入などに適している。

【００８３】

本明細書では、「相同性」及び「相同の」は、２つのポリヌクレオチド配列間または２つのポリペプチド配列間の同一性パーセントを指す。ある配列と別の配列間の対応は、当業界で知られている技法で決定することができる。たとえば、相同性は、容易に入手できるコンピュータープログラムを用いて配列情報を整合させることで、２つのポリペプチド分子を直接比較して決定することができる。２つのポリヌクレオチド配列または２つのポリペプチド配列は、適切な挿入または欠失により最適に整合させた後、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、及び少なくとも約９５％のヌクレオチドまたはアミノ酸が所定の分子長にわたって一致すると上述の方法で決定された場合に、互

いに対して「実質的に相同」といえる。

【００８４】

基準ポリペプチド配列または核酸配列に対する「配列同一性パーセント」は、配列のアラインメント及び必要に応じてギャップの導入により最大配列同一性パーセントが得られた後、基準ポリペプチド配列または核酸配列のアミノ酸残基またはヌクレオチドと同一である候補配列のアミノ酸残基またはヌクレオチドのパーセンテージと定義される。アミノ酸配列または核酸配列の同一性パーセントを決定するためのアラインメントは、当業者には既知の方法で実行することができ、たとえば、ＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、ＡＬＩＧＮ、またはＭｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェアなどの公開されているコンピューター用ソフトウェアプログラムが使用される。

【００８５】

本明細書では、「ポリヌクレオチド」または「核酸」という用語は、リボヌクレオチドでもデオキシリボヌクレオチドでも、あらゆる長さの重合ヌクレオチドを指す。したがって、この用語には、限定ではないが、一本鎖の、二本鎖の、もしくは複数鎖のＤＮＡもしくはＲＮＡ、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッド、またはプリン塩基及びピリミジン塩基を含む高分子、あるいはその他の天然の、化学的もしくは生化学的に修飾された、非天然の、または誘導体化されたヌクレオチド塩基が含まれる。

【００８６】

「異種の」または「外来性」は、それが比較されるかまたは導入されるかもしくは組み込まれる部分の要素とは遺伝子型が異なる要素に由来することを意味する。たとえば，遺伝子操作法により異なる細胞型に導入されるポリヌクレオチドは、異種のポリヌクレオチドである（したがって、発現すると、異種のポリペプチドをコードすることができる）。同様に、ウイルスベクターに組み込まれている細胞配列（たとえば遺伝子またはその一部分）は、そのベクターに対しては異種のヌクレオチド配列である。

【００８７】

以下の表には、本明細書で説明するコンストラクトのＤＮＡ配列、ならびに説明する他の配列のリストを記載する。リボザイム配列は下線のイタリック小文字、追加の３塩基対ステム（３ＨＰ）は二重下線の小文字、アプタマー配列は波下線の小文字、ツイステムとアプタマーステムが共有するステム配列は網掛け小文字、リンカー２Ａ配列は太下線の小文字、コード配列は大文字である。

【表１】

配列番号	表示	配列
1	pEGFP-C1 内スズメバチ-ツイスター	*GTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGC TGTACAAGTAAaccgcggcttgtaatgcggccgtgtaaataatttacacgtcg gtctcaagcccgataaacgcagagagcaag*gcggccgccataccacatttgtaga ggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctcccccctgaacctgaaacataaaatgaat gc
2	pEGFPC1 内 es-ツイスター	GTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAG CTGTACAAGTAAaccgc*ggcaataaagcggttacaagcccgcaaaaat agcagagtaatgtcgcgatagcgcggcattaatgcagctttattg*cggccgccata ccacatttgtagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctcccccctgaacctgaa acataaaatgaatgc
3	pEGFP-C1 内スズメバチ-ツイスター-mut	GTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAG CTGTACAAGTAAaccgc*ggcttgtgatgcggccgtgtaaataatttacac gtcggtctcaagcccgataaacgcagagagcaag*GCGGCCGCCATAC CACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTC CCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAAT GC
4	pEGFP-C1 内スズメバチ_no Sac 0HP	GTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAG CTGTACAAGTAA*cttgtaatgcggccgtgtaaataatttacacgtcggtct caagcccgataaacgcagagagcaag*gcggccgccataccacatttgtagaggttt tacttgctttaaaaaacctcccacacctcccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc
5	pEGFP-C1 内スズメバチ_no Sac 3HP	GTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAG CTGTACAAGTAAa*cgccttgtaatgcggccgtgtaaataatttacacgtcg gtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcgg*ccgccataccacatttgtaga ggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctcccccctgaacctgaaacataaaatgaat gc
6	pLuc 内スズメバチ_No Sac 0HP	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGA AAGATCGCCGTGTAAa*cttgtaatgcggccgtgtaaataatttacacgt cggtctcaagcccgataaacgcagagagcaag*gcggccgccataccacatttgta gaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctcccccctgaacctgaaacataaaatg aatg
7	pLuc 内スズメバチ_No Sac 3HP	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGA AAGATCGCCGTGTAAa*cgccttgtaatgcggccgtgtaaataatttaca cgtcggtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcgg*ccgccataccacattt gtagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctcccccctgaacctgaaacataaa atgaatgc
8	pLuc 内スズメバチ Gua1	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGA AAGATCGCCGTGTAAa*cgccttgtaatgcggccgtgtaaat*cactcatat aatcgcgtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactatgggt *gatttacacgtcggtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcgg*ccgccata ccacatttgtagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctcccccctgaacctgaa acataaaatgaatgc

9	pLuc 内スズメバチ Gua2	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAacgcc*ttgtaatgcggccgtgtaaa*actcatataatcgcgtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactatgggt*ttacacgtcggtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcgg*ccgccataccacatttgtagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc
10	pLuc 内スズメバチ Gua3	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAacgcc*ttgtaatgcggccgtgtaa*ctcatataatcgcgtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactatggg*ttacacgtcggtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcgg*ccgccataccacatttgtagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc
11	pLuc 内スズメバチ Gua4	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAacgcc*ttgtaatgcggccgtgta*tcatataatcgcgtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactatgg*tacacgtcggtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcgg*ccgccataccacatttgtagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc
12	pLuc 内スズメバチ Gua5	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAacgcc*ttgtaatgcggccgtgt*tcatataatcgcgtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactatg*gacacgtcggtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcgg*ccgccataccacatttgtagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc
13	pLuc 内スズメバチ Gua6	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAacgcc*ttgtaatgcggccgtgt*catataatcgcgtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactatg*acacgtcggtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcgg*ccgccataccacatttgtagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc
14	pLuc 内スズメバチ Gua7	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAacgcc*ttgtaatgcggccgtg*catataatcgcgtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactatg*cacgtcggtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcgg*ccgccataccacatttgtagaggtttacttgctttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc
15	pLuc 内スズメバチ Gua8	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAacgcc*ttgtaatgcggccgtg*atataatcgcgtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactat*cacgtcggtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcgg*ccgccataccacatttgtagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc
16	pLuc 内スズメバチ Gua9	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAacgcc*ttgtaatgcggccgt*atataatcgcgtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactat*acgtcggtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcgg*ccgccataccacatttgtagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc

17	pLuc 内スズメバチ Gua12	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGA AAGATCGCCGTGTAAacgcc*ttgtaatgcggccg*ataatcgcgtggata tggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgact*cgtcggtctcaagcccga taaacgcagagagcaaggcgg*ccgccataccacatttgtagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctcccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc
18	pLuc 内スズメバチ Gua13	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGA AAGATCGCCGTGTAAacgcc*ttgtaatgcggcc*ataatcgcgtggatat ggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgact*gtcggtctcaagcccgata aacgcagagagcaaggcgg*ccgccataccacatttgtagaggttttacttgctttaaa aaacctcccacacctcccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc
19	pLuc 内スズメバチ Gua14	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGA AAGATCGCCGTGTAAacgcc*ttgtaatgcggcc*taatcgcgtggatatg gcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgac*gtcggtctcaagcccgataa acgcagagagcaaggcgg*ccgccataccacatttgtagaggttttacttgctttaaaa aacctcccacacctcccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc
20	pLuc 内スズメバチ Gua15	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGA AAGATCGCCGTGTAAacgcc*ttgtaatgcggcc*atataatcgcgtggat atggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactat*gtcggtctcaagccc gataaacgcagagagcaaggcgg*ccgccataccacatttgtagaggttttacttgctt taaaaaacctcccacacctcccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc
21	pLuc 内スズメバチ Gua16	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGA AAGATCGCCGTGTAAacgcc*ttgtaatgcggc*atataatcgcgtggatat ggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactat*cggtctcaagcccgat aaacgcagagagcaaggcgg*ccgccataccacatttgtagaggttttacttgctttaa aaaacctcccacacctcccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc
22	pLuc 内スズメバチ Gua17	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGA AAGATCGCCGTGTAAacgcc*ttgtaatgcggc*tataatcgcgtggatatg gcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactat*cggtctcaagcccgataa acgcagagagcaaggcgg*ccgccataccacatttgtagaggttttacttgctttaaaa aacctcccacacctcccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc
23	pLuc 内スズメバチ Gua18	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGA AAGATCGCCGTGTAAacgcc*ttgtaatgcggccgt*gtataatcgcgtgg atatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgacta*cacgtcggtctcaa gcccgataaacgcagagagcaag*gcgg*ccgccataccacatttgtagaggttttact tgctttaaaaaacctcccacacctcccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc
24	pLuc 内スズメバチ Gua19	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGA AAGATCGCCGTGTAAacgcc*ttgtaatgcggccgt*tataatcgcgtggat atggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgacta*acgtcggtctcaagcc cgataaacgcagagagcaaggcgg*ccgccataccacatttgtagaggttttacttgc tttaaaaaacctcccacacctcccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc
25	pLuc 内スズメバチ Gua20	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGA AAGATCGCCGTGTAAacgcc*ttgtaatgcggccg*tataatcgcgtggat atggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgacta*cgtcggtctcaagccc gataaacgcagagagcaaggcgg*ccgccataccacatttgtagaggttttacttgctt taaaaaacctcccacacctcccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc

26	Epo-スズメバチ Gua16	GCTGTACACGGGAGAGGTCTGCAGGAGAGGGGACA GGTGAggatccacgc*cttgtaatgcggc*atataatcgcgtggatatggcacgcaa gtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactat*cggtctcaagcccgataaacgcaga gagcaaggcg*ctcgagggcccagatctaattcaccccaccagtgcaggctgcctatc agaaagtggtggctggtgtggctaatgccctggcccacaagtatcactaagctcgcttt cttgctgtccaatttctattaaaggttccttt
27	Epo-mut スズメバチ Gua16	GCTGTACACGGGAGAGGTCTGCAGGAGAGGGGACA GGTGAggatccacgc*cttgtgatgcggc*atataatcgcgtggatatggcacgcaa gtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactat*cggtctcaagcccgataaacgcaga gagcaaggcg*ctcgagggcccagatctaattcaccccaccagtgcaggctgcctatc agaaagtggtggctggtgtggctaatgccctggcccacaagtatcactaagctcgcttt cttgctgtccaatttctattaaaggttccttt
28	pLuc 内ツイスター_theo_1	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGA AAGATCGCCGTGTAAacgc*cttgtaatgcggc*atgataccagccgaaa ggcccttggcagca*tcggtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcgg*ccg ccataccacatttgtagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctcccccgaac ctgaaacataaaatgaatgc
29	pLuc 内ツイスター_theo_2	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGA AAGATCGCCGTGTAAacgc*cttgtaatgcggcggc*gataccagccgaaa ggcccttggcagcgtc*tcggtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcggc* cgccataccacatttgtagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctcccccgga acctgaaacataaaatgaatgc
30	pLuc 内ツイスター_theo_3	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGA AAGATCGCCGTGTAAacgc*cttgtaatgcggcgc*gataccagccgaaa ggcccttggcagcgt*tcggtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcggc*c gccataccacatttgtagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctcccccgaa cctgaaacataaaatgaatgc
31	pLuc 内ツイスター_theo_4	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGA AAGATCGCCGTGTAAacgc*cttgtaatgcggcc*tgataccagccgaaa ggcccttggcagcag*tcggtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcggc*c gccataccacatttgtagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctcccccgaa cctgaaacataaaatgaatgc
32	pLuc 内 ATG_wt スズメバチ Gua16	ATGacgc*cttgtaatgcggc*atataatcgcgtggatatggcacgcaagtttctaccg ggcaccgtaaatgtccgactat*cggtctcaagcccgataaacgcagagagcaagg* cgaa*ggcggatcttcaggtagtggcgagggcagaggaagtcttctaacatgcggtga cgtggaggagaatcccggccccc*GAAGACGCCAAAAACATAAAG AAAGGCCCGGCGCCA
33	pLuc 内 ATG_mut スズメバチ Gua16	ATGacgc*cttgtgatgcggc*atataatcgcgtggatatggcacgcaagtttctaccg ggcaccgtaaatgtccgactat*cggtctcaagcccgataaacgcagagagcaagg* cgaa*ggcggatcttcaggtagtggcgagggcagaggaagtcttctaacatgcggtga cgtggaggagaatcccggccccc*GAAGACGCCAAAAACATAAAG AAAGGCCCGGCGCCA
34	pLuc 内 10aa_wt スズメバチ Gua16	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCacgc*cttgta atgcggc*atataatcgcgtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtc cgactat*cggtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcg*aa*ggcggatcttc aggtagtggcgagggcagaggaagtcttctaacatgcggtgacgtggaggagaatc ccggccccc*GAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCG GCGCCA

35	pLuc 内 10aa_mut スズメバチ Gua16	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCacgcc*ttgtg atgcggc*atataatcgcgtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtc cgactat*tcggtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcg*aaggcggatcttc aggtagtggcgagggcagaggaagtcttctaacatgcggtgacgtggaggagaatc ccggcccc**GAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCG** GCGCCA
36	pLuc 内 GT_8bp	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGA AAGATCGCCGTGTAAtaaaggcgtataatcgcgtggatatggcacgcaa gtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactacgcc*ttgtaatgcggccgtgtaaataat ttacacgtcggtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcg*gccgccatacca catttgtagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctcccccctgaacctgaaaca taaaatgaatgc
37	pLuc 内 TG_9b	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGA AAGATCGCCGTGTAAacgcc*ttgtaatgcggccgtgtaaataatttaca cgtcggtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcg*tataatcgcgtggatatg gcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactacgcc*ttg*ataccacatttgta gaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctcccccctgaacctgaaacataaaatg aatgc
38	Nasonia vitripennis 由来のツイスター型リボザイム(スズメバチツイスター)	cttgtaatgcggccgtgtaaataatttacacgtcggtctcaagcccgataaacgcagag agcaag
39	環境試料由来のツイスター型リボザイム(es ツイスター)	ggcaataaagcggttacaagcccgcaaaaatagcagagtaatgtcgcgatagcgcg gcattaatgcagctttattg

【００８８】

当業者であれば本明細書で開示する本発明の原理に変更を加えられることは理解され期待されるところであり、そうした変更形態も本発明の範囲内とする。以下の実施例は本発明をさらに例示するものであって、本発明の範囲を限定するものと解釈すべきではない。引用する参照文献等は、すべて参照により本明細書に援用する。

【実施例】

【００８９】

実施例１

哺乳類細胞内で自己切断し遺伝子発現を抑制するツイスター型リボザイム

【００９０】

実験手順

プラスミド・コンストラクト：ＢｓｒＧＩ部位及びＭｆｅＩ部位を隣接させた、Ｎａｓｏｎｉａ Ｖｉｔｒｉｐｅｎｎｉｓ（ｗａｓｐ（スズメバチ））または環境試料からの野生型またはミュータント・ツイスター型リボザイム配列を含む、オリゴヌクレオチドを合成した（ＩＤＴ）。合成したオリゴヌクレオチド（「オリゴ」）はＢｓｒＧＩ及びＭｆｅＩにより切断され、適合する制限酵素で切断されたｐＥＧＦＰ－Ｃ１（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）にクローニングされた。構築したベクターの配列はＤＮＡシーケンシング（Ｇｅｎｅｗ

ｉｚ）で確認した。
【００９１】
遺伝子導入及びＧＦＰ蛍光測定：３．５ｘ１０^{4}個のＨＥＫ２９３細胞を、遺伝子導入の前日に、９６ウェル平底プレートに蒔いた。プラスミドＤＮＡ（５００ｎｇ）をチューブまたは９６ウェルＵ字型底プレートに加えた。別途、ＴｒａｎｓＩＴ－２９３試薬（Ｍｉｒｕｓ；１．４μｌ）を５０μｌのＯｐｔｉ－ｍｅｍ Ｉ培地（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）に加え、室温（「ＲＴ」）で５分放置した。次に、この希釈した遺伝子導入試薬５０μｌをＤＮＡに加え、混合し、ＲＴで２０分インキュベートした。最後に、この溶液７μｌを９６ウェルプレートの細胞の入ったウェルに加えた。ＧＦＰを発現しないＬａｃＺコンストラクトをバックグラウンドのネガティブ・コントロールとして用いた。ＧＦＰ蛍光強度は、Ｔｅｃａｎプレートリーダーで、励起波長４８４ｎｍ、発光波長５１０ｎｍ、励起バンド幅５ｎｍで測定した。ＧＦＰ蛍光強度は、ＧＦＰコンストラクトが生じた値からＬａｃＺコンストラクトが生じた値を引いて表した。
【００９２】
結果
ツイスター型リボザイムは、細菌及び真核生物の多くの種に存在する。しかし、哺乳類細胞におけるそれらの自己切断活性についてはまだ決定されていない。ツイスター型リボザイムが哺乳類細胞でｍＲＮＡを切断し遺伝子発現を抑制できるかどうかを調査するため、Ｎ．Ｖｉｔｒｉｐｅｎｎｉｓ（スズメバチ）からのツイスター型リボザイム配列と、環境試料からのツイスター型リボザイム配列を、それぞれ、ｐＥＧＦＰ－Ｃ１ベクター内のＥＧＦＰ遺伝子の３’ＵＴＲに挿入した。図１ａに示すように、スズメバチ－ツイスター型リボザイムを３’ＵＴＲに挿入すると、ｐＥＧＦＰ－Ｃ１コントロール・コンストラクトと比べて９７％、３６倍のＧＦＰ発現の阻害が得られた。環境試料からのツイスター配列（ｅｓ－ツイスター）は、スズメバチ－ツイスターほど頑強なＧＦＰ発現抑制には至らず、コントロールＧＦＰベクターと比べて約５０％のＧＦＰ発現抑制を生じた。ＧＦＰ発現の抑制がツイスター型リボザイム切断によることをさらに決定するため、Ａ６をＧに置き換えてミュータント・コンストラクトを作製し、ツイスター型リボザイムを切断不能とした。このＡ６Ｇ変異はＧＦＰ発現抑制が全くできなかったが、野生型ツイスター型リボザイムは図１ｂに示すように４４倍の低下をもたらした。これらの結果は、哺乳類細胞において、ツイスター型リボザイムが標的遺伝子ＲＮＡ中に存在するときは自己切断すること、したがって標的遺伝子発現を抑制することを示している。
【００９３】
実施例２
ツイスター型リボザイムＰ１ステム配列の修飾により改善されるツイスター型リボザイムの切断活性
【００９４】
実験手順
プラスミド・コンストラクト：次のプライマーを用いて、コンストラクトＧＦＰ＿スズメバチ＿Ｎｏ Ｓａｃ ０ＨＰまたはＧＦＰ＿スズメバチ＿Ｎｏ Ｓａｃ ３ＨＰを作製した：フォワードプライマーＮｏＳａｃ＿Ｆｗｄ（５’ＧＣＴＧＴＡＣＡＡＧＴＡＡＡＣＴＴＧＴＡＡＴＧＣＧＧＣＣＧＴＧＴＡＡＡＴＡＡＴＴＴＡＣ）及びＮｏＳａｃ３ＨＰ＿Ｆｗｄ（５’ＡＧＣＴＧＴＡＣＡＡＧＴＡＡＡＣＧＣＣＴＴＧＴＡＡＴＧＣＧＧＣＣＧＴＧＴＡＡＡＴＡＡＴＴＴＡＣ）ならびにリバースプライマーＭｆｅＩ Ｒｅｖ（５’ＡＣＡＡＣＡＡＣＡＡＴＴＧＣＡＴＴＣＡＴＴＴＴＡＴＧ）。ＧＦＰ＿スズメバチ－ツイスターベクターを鋳型として用い、ＰＣＲ増幅したＤＮＡ断片をＢｓｒＧＩ及びＭｆｅＩで切断させ、酵素ＢｓｒＧＩ及びＭｆｅＩで切断させたｐＥＧＦＰ－Ｃ１にクローニングした。Ｇｉｂｓｏｎクローニング・ストラテジー及びクローニング・キット（ＮＥＢ）を用いて、ｐＥＧＦＰ－Ｃ１のＥＧＦＰ遺伝子をホタルルシフェラーゼ遺伝子に置き換えてｐＦＬｕｃベクターを作製した。同じストラテジーを用いて、コンストラクトＧＦＰ＿スズメバチ＿ｎｏ Ｓａｃ ０ＨＰ及びＧＦＰ＿スズメバチ＿ｎｏ Ｓａｃ ３ＨＰのＥＧＦＰ遺伝子をホ

タルルシフェラーゼ遺伝子に置き換えることによって、コンストラクトＬｕｃ＿スズメバチ＿Ｎｏ　Ｓａｃ　０ＨＰ及びＬｕｃ＿スズメバチ＿Ｎｏ　Ｓａｃ　３ＨＰを作製した。

【００９５】

ＧＦＰ蛍光強度の測定は、実施例１で説明したようにして行った。

【００９６】

培養細胞のホタルルシフェラーゼ・アッセイ：培地交換の２４時間後、プレートをインキュベーターから取り出し、実験台上で数分間かけてＲＴにしてから吸引した。ｇｌｏ－ｌｙｓｉｓバッファー（Ｐｒｏｍｅｇａ、１００μＬ、ＲＴ）を加え、プレートをＲＴで少なくとも５分放置した。ウェル内容物を５０μＬ研和により混合し、各試料２０μＬを２０μＬのｂｒｉｇｈｔ－ｇｌｏ試薬（Ｐｒｏｍｅｇａ）（ｇｌｏ－ｌｙｓｉｓバッファーで１０％まで希釈済）と混合した。９６ウェルを乳白色の３８４ウェルプレート上で離間させた。ＲＴで５分インキュベーションした後、発光をＴｅｃａｎ機で、リード時間５００ミリ秒で測定した。ルシフェラーゼ活性を平均相対光量（ＲＬＵ）±Ｓ．Ｄ．で表した。

【００９７】

結果

哺乳類細胞におけるツイスター型リボザイムの切断活性をさらに高めるため、そしてそうすることでリボザイムによる標的遺伝子発現の抑制の動的範囲を拡大するため、ＧＦＰ－ツイスター・コンストラクトのツイスターＰ１ステムに隣接する配列を修飾した。まず、ツイスター配列の５’末端のＳａｃＩＩ配列を削除し、ＧＦＰ＿スズメバチ＿ｎｏ　Ｓａｃ　０ＨＰを作製した。長めのＰ１ステムのほうがツイスター型リボザイムを安定させてその切断活性を高めるかどうかを決定するため、ＳａｃＩＩ部位の配列をＣＧＣで置き換えて、ツイスター型リボザイムのＰ１ステム基部に３塩基対ステム（３ＨＰ）を作り（図２ａ）、コンストラクトＧＦＰ＿スズメバチ＿ｎｏ　Ｓａｃ　３ＨＰを作製した。興味深いことには、図２ｂに示すように、ＳａｃＩＩ配列の欠失により、ＳａｃＩＩ配列のあるコンストラクトの３７倍から、ＳａｃＩＩ部位のないコンストラクトＧＦＰ＿スズメバチ＿ｎｏ　Ｓａｃ　０ＨＰの６８倍にまでＧＦＰ抑制が増加し、Ｐ１配列の５’に隣接するＳａｃＩＩ配列がリボザイム活性を損なっていたことが示された。Ｐ１ステムの基部に３ｂｐステムを加えたことでリボザイム活性はさらに高まり、ＧＦＰ発現の抑制が１０４倍となった。この修飾ツイスター・コンストラクトの活性はまた、リポーターとしてホタルルシフェラーゼ遺伝子を用いてさらに試験した。図２ｃに示すように、ＳａｃＩＩ配列の欠失は、ｐＦＬｕｃコントロール・コンストラクトと比べて、ルシフェラーゼ活性の１０１倍の低下をもたらした。Ｐ１ステムに３ｂｐステムを加えたことで、ルシフェラーゼ活性の低下は、コントロール・コンストラクトと比べて２５４倍にまでさらに増した。

【００９８】

実施例３

ｘｐｔ－グアニン・アプタマーを用いての、ツイスター型リボザイムの調節による標的遺伝子発現制御

【００９９】

実験手順

ｘｐｔ－グアニン・アプタマーと連結させたツイスター型リボザイム配列を含むオリゴを合成し（ＩＤＴ）、Ｇｉｂｓｏｎクローニング・ストラテジー及びキット（ＮＥＢ）を用いてｐＬｕｃベクターにクローニングした。コンストラクト配列をＤＮＡシーケンシング（Ｇｅｎｅｗｉｚ）で確認した。

【０１００】

遺伝子導入及びアプタマーリガンド処理：ＨＥＫ２９３細胞に、実施例１で説明したようにして遺伝子導入した。遺伝子導入の４時間後、培地を吸引し、５００μＭグアニンまたは１ｍＭグアノシン（Ｓｉｇｍａ）を含むかまたは含まない新しい培地を加えた。グアニンまたはグアノシン処理の２０～２４時間後に、実施例２で説明したようにしてルシフェラーゼ・アッセイを実施した。低下倍率は、アプタマーリガンドの非存在下で得られた

ルシフェラーゼ活性をアプタマーリガンドの存在下で得られた値で割った商として表した。

【０１０１】

培養培地におけるマウスＥｐｏ測定のＥＬＩＳＡアッセイ：薬物処理の１８時間後、上清を回収し、ＥＬＩＳＡキット（Ｒ＆Ｄ）をメーカーの説明にしたがって用いてＥＬＩＳＡを実施した。データを４パラメーターのカーブフィッティングで分析した。

【０１０２】

結果

ツイスター型リボザイムの切断活性を制御し、そうすることで標的遺伝子発現を制御するために、アプタマー配列をツイスター型リボザイムのＰ３ステムに連結した。アプタマーリガンドが存在しないときはリボザイム構成が妨害され、切断は阻止され、標的遺伝子発現が可能になる（図３ａ、上側パネル）。アプタマーリガンドが加わると、立体構造が変化して、ツイスター型リボザイムの切断が可能になり、標的遺伝子発現が低下する（図３ａ、下パネル）。ｘｐｔ－グアニン・アプタマーのＰ１ステムをツイスター型リボザイムのＰ３ステムにグラフトして、グアニン応答性ツイスター型リボザイムを作製した。この立体配置（図３ａ）では、アプタマーリガンドの非存在下で、アプタマー配列をツイスターＰ３ステムの２アームの間に挿入すると、Ｐ３ステム及びツイスター型リボザイム構成が妨害され、切断活性が妨害され、標的遺伝子の発現が可能になる。アプタマーリガンドの存在下では、アプタマー／リガンド結合によりステムのアームが揃い、Ｐ３ステム形成及びツイスター切断活性が促進され、結果として標的遺伝子発現が抑制される。

【０１０３】

さらに、発明者らは、アプタマーとツイスターを接続するステムの長さが長すぎると、ステム形成はアプタマー配列の存在に依存しなくなり、アプタマーリガンドの非存在下でも生じるのでは、と考えた。しかし、ステムが短すぎると、アプタマーリガンドの存在下でも安定したステム構成は得られない可能性がある。したがって、（アプタマーリガンドに対する最適な応答性を得るための）ステムの最適長さを決定するため、アプタマーとツイスターを接続するステムの長さを最適化した。発明者らはステムを順次縮めていき、ステム長１７ｂｐから１ｂｐの全部で２０個のコンストラクトを作製した。図３ｂに示すように、構築した全２０コンストラクトのうち、グアニン・アプタマーとツイスターループ２を直接接続している３ｂｐのステムを有するＬｕｃｉ－スズメバチＧｕａ１６が、ルシフェラーゼ遺伝子発現の最も大きな低下を示した（１５倍）。ステム長が３ｂｐよりも短いか、または７ｂｐよりも長いコンストラクトは、グアニン処理後の有意な低下を示さなかった。

【０１０４】

次にＬｕｃｉ－スズメバチＧｕａ１６コンストラクトを、切断不能ミュータントを含むコントロール・コンストラクトを含む別の実験で検証した。図３ｃに示すように、グアニン処理後、Ｌｕｃｉ－スズメバチＧｕａ１６は、グアニンを加えなかったルシフェラーゼ活性と比べて、ルシフェラーゼ活性の９２％（１２倍）の低下を生じた。一方、コンストラクトｐＬｕｃもＬｕｃｉ－ｍｕｔスズメバチＧｕａ１６も、グアニン処理後にルシフェラーゼ活性の低下を示さなかった。これらの結果は、アプタマーリガンド処理後もツイスター型リボザイム活性が保持されて、標的遺伝子発現の低下をもたらしたことを示している。１ｍＭのグアノシンをアプタマーリガンドとして使用すると、コンストラクトＬｕｃｉ－スズメバチＧ１６はルシフェラーゼ発現の２５倍の低下をもたらした（図３ｄ）。

【０１０５】

マウスエリスロポエチン（Ｅｐｏ）遺伝子の３’ＵＴＲにスズメバチＧｕａ１６を挿入すると、グアニン処理後のＥｐｏの生産は、溶媒処理したコントロール細胞が生産するＥｐｏと比べておよそ３０％低下した。これらの結果から、発明者らはアプタマーリガンド処理に応答して標的遺伝子発現を抑制する合成ツイスター型リボスイッチ、グアニン／グアノシン応答性ツイスター型リボザイムを作製したことが示される。

【０１０６】

実施例４

テオフィリン・アプタマーを用いての、ツイスター型リボザイムの調節による標的遺伝子発現制御

【０１０７】

実験手順

テオフィリン・アプタマーと連結させたツイスター型リボザイム配列を含むオリゴを合成し（ＩＤＴ）、Ｇｉｂｓｏｎクローニング・ストラテジー及びキット（ＮＥＢ）を用いてｐＬｕｃベクターにクローニングした。コンストラクト配列をＤＮＡシーケンシング（Ｇｅｎｅｗｉｚ）で確認した。

【０１０８】

遺伝子導入及びホタルルシフェラーゼ・アッセイ：ＨＥＫ２９３細胞に、実施例１で説明したようにして遺伝子導入した。遺伝子導入の４時間後、培地を吸引し、２ｍＭのテオフィリン（Ｓｉｇｍａ）を含むかまたは含まない新しい培地を加えた。テオフィリン処理の２０～２４時間後に、実施例２で説明したようにしてルシフェラーゼ・アッセイを実施した。低下倍率は、アプタマーリガンドの非存在下で得られたルシフェラーゼ活性をアプタマーリガンドの存在下で得られた値で割った商として表した。

【０１０９】

結果

ツイスター型リボザイムによる切断の調節、ひいては標的遺伝子発現の制御における追加のアプタマーの使用について試験した。実施例３で説明した２０個のＬｕｃｉ－スズメバチＧｕａコンストラクト（１～２０）を基に、３ｂｐまたは４ｂｐの追加ステム配列でテオフィリン・アプタマーをツイスター型リボザイムのループ２に接続した。さらに、ステムの配列を図４ａに示すように変えた。図４ｂに示すように、テオフィリン処理の結果、テオフィリン処理なしの試料と比べて、全てのコンストラクトでルシフェラーゼ活性が低下した。コンストラクトのツイスター＿ｔｈｅｏ＿３は、テオフィリン処理後、遺伝子発現を６２％低下させた。これらのデータは、発明者らが、合成ツイスター型リボスイッチであるテオフィリン応答性ツイスター型リボザイムを作製したことを示す。

【０１１０】

テオフィリン・アプタマー及びステム配列をツイスターのループ２配列にグラフトすると、図４ｂに示すように、テオフィリン処理の非存在下で、ツイスター型リボザイム活性の妨害に異なる効果が得られた。コンストラクトのツイスター＿ｔｈｅｏ＿３は、アプタマーリガンドの非存在下で、リボザイム活性の最も強力な妨害を示し、したがって最も頑強なルシフェラーゼ活性を示す。ツイスター＿ｔｈｅｏ＿２とツイスター＿ｔｈｅｏ＿３の違いは、アプタマーとツイスターを接続するステムの長さであり、それがリボザイム活性の妨害の差につながっている。ツイスター＿ｔｈｅｏ＿１、３、及び４（ステム長はすべて同じ３ｂｐ）のコンストラクトを比較すると、違いはステム組成にある。これらの結果は、ステムの配列組成もまた、リボザイム活性に影響を及ぼすことを示している。したがって、アプタマーリガンド応答性リボザイムは、アプタマーとツイスター型リボザイムを接続するエフェクターステム領域の長さ及び配列組成を最適化することで得ることができる。

【０１１１】

実施例５

自己切断リボザイムが翻訳開始コドンの下流に配置された場合の、標的遺伝子発現の抑制

【０１１２】

実験手順

プラスミド・コンストラクト：合成ｄｓＤＮＡ（ＩＤＴ）及び標準的な制限クローニング法を用いて、試験配列を先に作製したベクターｐＨＤＭ．２ｂ－ＬａｃＺ（レイアウト：ＣＭＶプロモーター－イントロン－ＬａｃＺ－ポリＡ）に導入した。全コンストラクトをＤＮＡシーケンシングにより確認した。

【０１１３】

遺伝子導入：ＨＥＫ２９３細胞（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１５７３；ＤＭＥＭ中、１０％Ｆ

ＢＳ、３７℃、１０％CO_2で増殖）を遺伝子導入の前日、遺伝子導入時のコンフルエンスが約７０％となるように、９６ウェル平底プレート（１００μＬ）に蒔いた。プラスミドＤＮＡ（５００ｎｇ）をチューブまたは９６ウェルのＵ字型底プレートに加えた。別途、ＴｒａｎｓＩＴ－２９３試薬（Ｍｉｒｕｓ；１．４μＬ）を５０μｌのＯｐｔｉ－ｍｅｍ Ｉ培地（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）に加え、ＲＴで５分放置した。次に、この希釈した遺伝子導入試薬５０μｌをＤＮＡに加え、混合し、ＲＴで２０分インキュベートした。最後に、この溶液７μｌを９６ウェルプレートの細胞の入ったウェルに加えた。

【０１１４】

βガラクトシダーゼ（ＬａｃＺ）アッセイ：遺伝子導入の２４時間後、プレートをインキュベーターから取り出し、実験台上で数分間かけてＲＴにしてから吸引した。ｇｌｏ－ｌｙｓｉｓバッファー（Ｐｒｏｍｅｇａ、１００μＬ、ＲＴ）を加え、プレートを室温で少なくとも５分放置した。次に、ウェル内容物を５０μＬ研和により混合した。各ウェルから試料２μＬを取って２００μＬのｇｌｏ－ｌｙｓｉｓバッファーで希釈した（１０１倍希釈）。希釈物を研和して混合してから、白色３８４ウェルプレートで各希釈物２０μＬを２０μＬのベータ－ｇｌｏ試薬（Ｐｒｏｍｅｇａ）と混合した。３０分後、発光の相対光量（ＲＬＵ）を測定した。検定ウェルはいずれも、互いに混ざらないように、空ウェルに囲まれているかまたはプレートの端にあるというパターンで、３８４ウェルのうち最大で９６を用いた。測定値はすべて、アッセイの直線範囲内であった（様々な希釈・非希釈試料の比較により決定；データ記載せず）。

【０１１５】

結果：コンストラクトは、ＬａｃＺリポーターにとって唯一使用可能なインフレームＡＴＧが、ハンマーヘッド型またはヘアピン型リボザイムの上流となるように作製し（米国特許公開第２０１５／００５６１７４号に開示、たとえば図１Ｅを参照されたい。参照により本明細書に援用する）、それぞれにつき、リボザイム配列を各候補フレームに入れることによって３つのバリアントを作製した。すべてのコンストラクトで、リボザイムにリンカー－２Ａ－ペプチド－ＬａｃＺが続いた。ミュータント（不活性）リボザイムのバージョンも、コントロールとして作製した。潜在的な終止コドンを除去するために、各リボザイムに変異を導入した。ヌクレオチド及びタンパク質の配列を図７ａ及び図７ｂに示す（各事例の一番上のラインは親リボザイムで、全部は翻訳されない；ヌクレオチド配列のドットは「一番上のラインと同じ」を示す）。

【０１１６】

これらのコンストラクト及びそれらの不活性リボザイム・バージョンをＨＥＫ２９３細胞に遺伝子導入し、図７ｃに示すように２４時間後にＬａｃＺ発現を測定した。ハンマーヘッド型（ＨＨ）リボザイムの結果を図７ｃの左側に示す。ＨＨリボザイムを５’ＵＴＲに配置すると、不活性ミュータント・リボザイムと比べて発現が１６２倍低下した。ところが、翻訳スルー（フレーム２、矢印）による大幅な向上で、発現が５１３倍も低下した。フレーム１は機能していないが、このことは除去できなかったリボザイム配列中のインフレーム終止コドンのせいと予測されていた。ヘアピン型（ＨＰ）リボザイムを図７ｃの右側に示す。ＨＰリボザイムを５’ＵＴＲに配置すると、１３３倍の発現低下となったが、フレーム１の翻訳の結果、５０２倍（矢印）の発現低下がもたらされた。他のフレームも機能した。発明者らは、発表済みの諸研究よりも優れた遺伝子制御能力を示す新規のリボザイム・コンストラクトを作製したことになる。本明細書で説明する遺伝子発現コンストラクトでは、リボザイムがＵＴＲ内ではなく、開始コドンの後ろに配置されている。標的遺伝子発現の制御は、リボザイムを５’ＵＴＲに配置するよりも翻訳開始の３’側に配置することによって、大幅に増強することができる。リボザイムを翻訳開始点の下流に配置すると、自己切断により開始コドンが標的遺伝子のｍＲＮＡの残りの部分から除去され、その結果として残部のバックグラウンド発現が減少する。

【０１１７】

実施例６

翻訳開始コドン下流で機能するグアニン応答性ツイスター型リボスイッチ

【０１１８】
実験手順
ＧＦＰの開始コドンまたは最初の１０アミノ酸のコード配列、及びスズメバチＧｕａ１６、続いてリンカー２Ａ配列を含むオリゴを合成し（ＩＤＴ）、Ｇｉｂｓｏｎクローニング・ストラテジー及びクローニング・キット（ＮＥＢ）を用いてｐＬｕｃベクターにクローニングした。遺伝子導入及び培養細胞のルシフェラーゼ・アッセイを、実施例３で説明したようにして実施した。
【０１１９】
結果
アプタマーリガンド応答性ツイスター型リボザイムの移植性を試験するため、図５ａに示すように、スズメバチＧｕａ１６配列を（ｉ）ルシフェラーゼ遺伝子の翻訳開始コドン、または（ｉｉ）ＧＦＰの最初の１０アミノ酸のコード配列の下流に配置した。ツイスター型リボスイッチ配列と下流標的遺伝子の融合により、標的遺伝子産物が発現するとＮ末端タグが生じることになり、タンパク質機能に影響する可能性がある。このＮ末端タグを除去するために、リンカー２Ａ配列をツイスター型リボスイッチと下流標的遺伝子配列の間に挿入した。図５ｂに示すように、ツイスター型リボスイッチのポリヌクレオチド・カセットの挿入は、アプタマーリガンド、グアニンの非存在下では、ルシフェラーゼ遺伝子発現を損なわず、妨害されたリボザイム活性が示唆された。しかしグアニンの存在下では、ルシフェラーゼ遺伝子発現は、ＡＴＧ＿スズメバチＧｕａ１６コンストラクトも１０ａａ＿スズメバチＧｕａ１６コンストラクトも、無処理コントロールの６８％低下し、その一方でミュータント・ツイスター配列を含むコントロール・コンストラクトは、グアニン処理に応答してルシフェラーゼ発現の低下を示さなかった。この結果は、機能性ツイスター型リボスイッチを含むポリヌクレオチド・カセットによる標的遺伝子発現の低下が、アプタマー／リガンド結合によるツイスター型リボザイム活性の保持によるものであったことを示している。発明者らの結果は、ツイスター型リボスイッチがコード配列の開始コドンの下流で機能することを示し、合成ツイスター型リボスイッチを含むポリヌクレオチド・カセットの移植性を実証している。
【０１２０】
実施例７
グアニン・アプタマーを用いてのグアニン応答性ＯＮツイスター型リボスイッチの作製
【０１２１】
実験手順
プラスミド・コンストラクト：ツイスター型リボザイムのＰ１ステムへのアプタマー配列リンカーを含むオリゴを合成し（ＩＤＴ）、Ｇｉｂｓｏｎクローニング・ストラテジー及びクローニング・キット（ＮＥＢ）を用いてｐＬｕｃベクターにクローニングした。
【０１２２】
遺伝子導入は実施例１で説明したようにして実施し、ホタルルシフェラーゼ・アッセイは実施例３で説明したようにして実施した。
【０１２３】
結果
実施例３及び実施例４で説明したツイスター型リボスイッチは、アプタマーリガンド処理に応答して標的遺伝子発現を抑制するので、ＯＦＦツイスター型リボスイッチである。ここでは、異なるストラテジーを用いてアプタマー配列をツイスター型リボザイムに連結し、アプタマーリガンド処理後に標的遺伝子発現を誘発するＯＮツイスター型リボスイッチを作製する。図６ａに示すように、ツイスターＰ１ステムの３’末端（追加３ｂｐステムを含む）をアプタマー配列に隣接させる。この立体配置では、ステム配列はツイスターＰ１ステムとアプタマーＰ１ステムに共有され、この共有配列はツイスターＰ１ステムでもアプタマーＰ１ステムでも形成できるようになっている。アプタマーリガンドの非存在下では（上側パネル）、ツイスターＰ１ステムに隣接するアプタマー配列はツイスター構成を妨害しないので、そのリボザイム切断活性は無傷のままであり、ｍＲＮＡの切断及び標

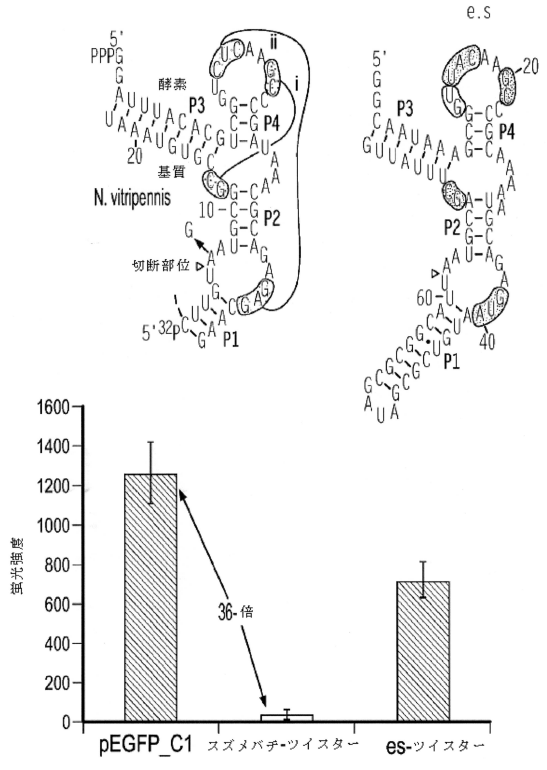
的遺伝子発現の阻害がもたらされる。アプタマーリガンドの存在下では（下側パネル）、リガンドと結合したアプタマーがツイスターＰ１ステムからの共有配列でアプタマーＰ１ステムを形成し、そうすることでツイスターＰ１ステムの形成が妨害され、そのリボザイム活性も妨害され、標的遺伝子発現が増加する。実施例３及び実施例４で説明したように、リボスイッチに関しては、アプタマーＰ１ステムの長さはその制御機能において重要である。ステム長が長すぎると、アプタマーＰ１の形成はアプタマーリガンドに依存しなくなり、制御不能な標的遺伝子発現がもたらされる。さらに、発明者らは、共有配列の長さも重要であろうと考えた。共有ステム配列の長さが短すぎると、ツイスター型リボザイムはアプタマーＰ１ステムの形成に影響されなくなり得る。

【０１２４】

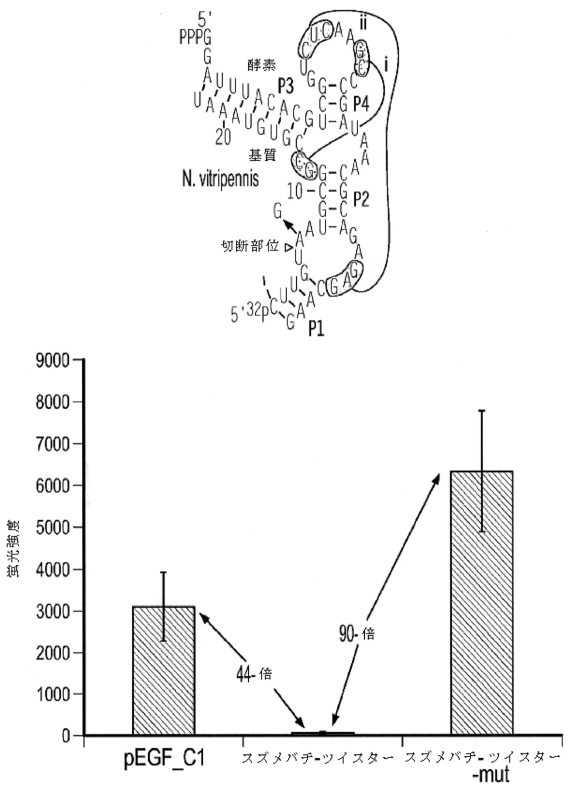
ＯＮツイスター型リボスイッチは、アプタマーＰ１ステムと共有されるツイスターＰ１ステム配列の６または７ｎｔを有して作製された。この６または７ｎｔの共有配列で、アプタマーは８または９ｂｐのＰ１ステムを形成する。ｘｐｔ－グアニン・アプタマーをツイスターＰ１ステム配列の５’または３’アームに連結して、コンストラクトＧＴ８またはＴＧ８及びＴＧ９を作製した。図６ｂの左側のパネルに示すように、グアニン・アプタマーをツイスターＰ１ステムの５’アームに連結する（コンストラクトＧＴ８）と、グアノシン処理後に１．４倍のルシフェラーゼ活性の誘発が得られた。ところが、図６ａで示すように、アプタマーをツイスターＰ１ステムの３’末端に連結すると、ルシフェラーゼ活性の基底レベルは、３’ＵＴＲにツイスター／アプタマー配列を含まないコントロール・ベクターの０．７％まで低下した。グアノシン処理でルシフェラーゼ活性を誘発すると、コンストラクトＴＧ８とＴＧ９は、図６ｂ（中央と右側のパネル）に示すように、それぞれ８．６倍と９．２倍の誘発を生じた。コンストラクトＴＧ８及びＴＧ９からのルシフェラーゼ発現の基底レベルが低いことが示すのは、アプタマーをＰ１ステムの３’末端に連結してもリボザイム活性が妨害されなかったこと、そしてアプタマー／リガンド結合後にツイスター型リボザイム活性が損なわれたので、標的遺伝子発現が増加した、ということである。これらの結果は、発明者らが、アプタマーリガンド処理に応答して標的遺伝子発現を誘発する新規のツイスター型ＯＮリボスイッチを作製したことを示している。

【図面】

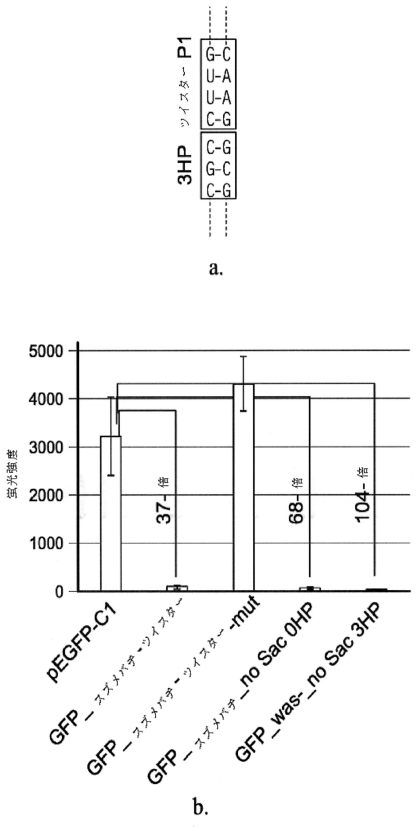
【図１ａ】



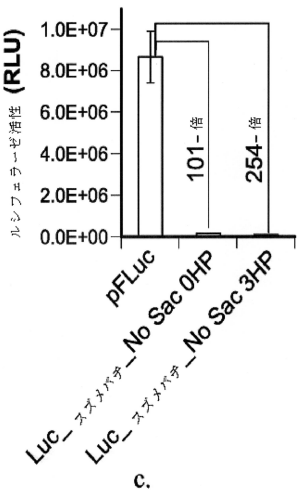
【図１ｂ】



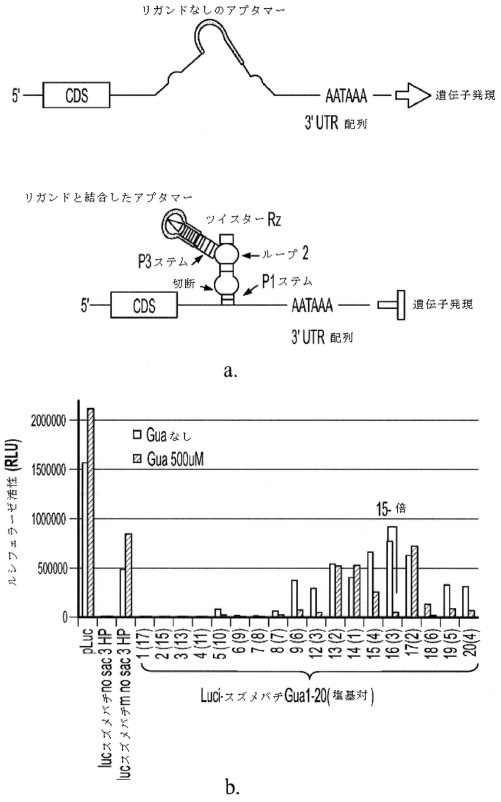
【図２－１】



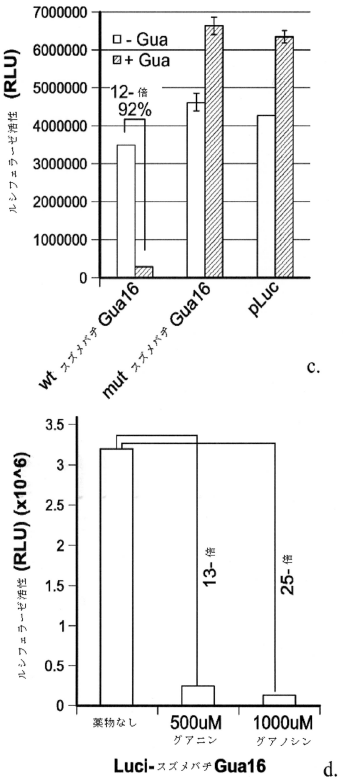
【図２－２】



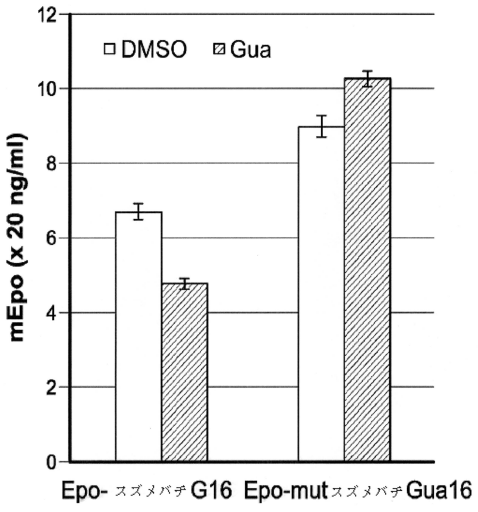
【図３－１】



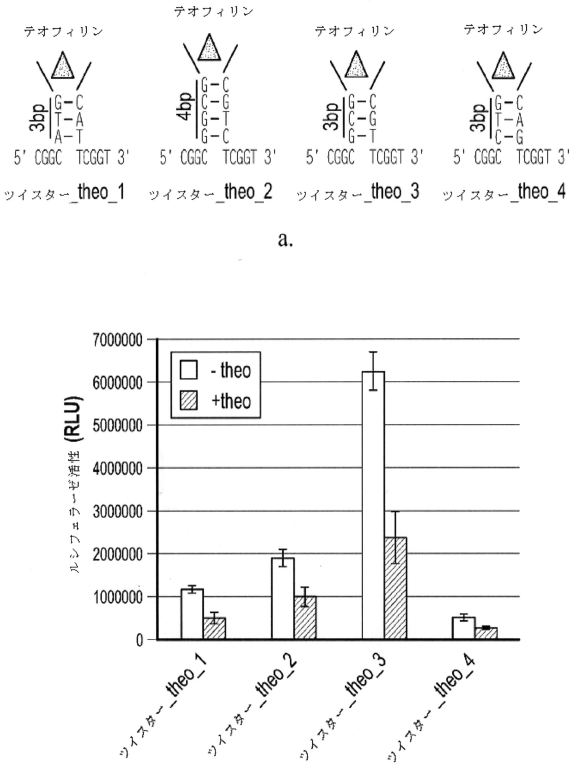
【図３－２】



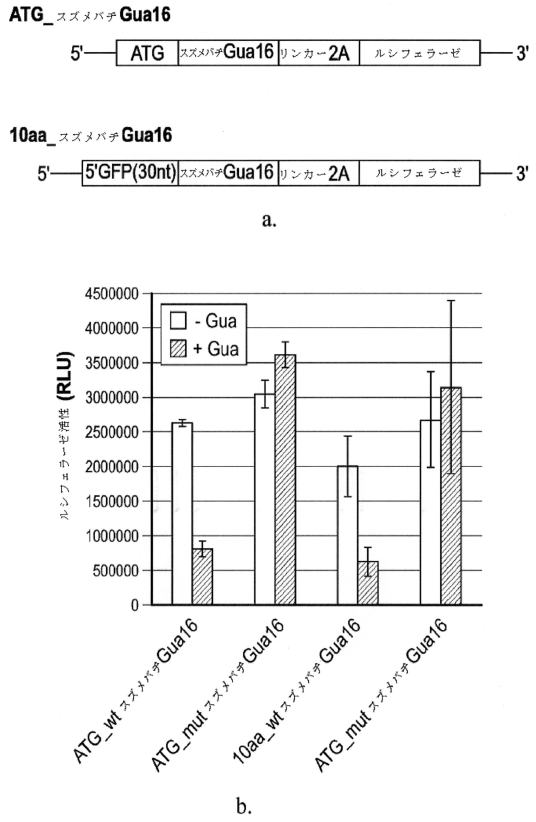
【図３－３】



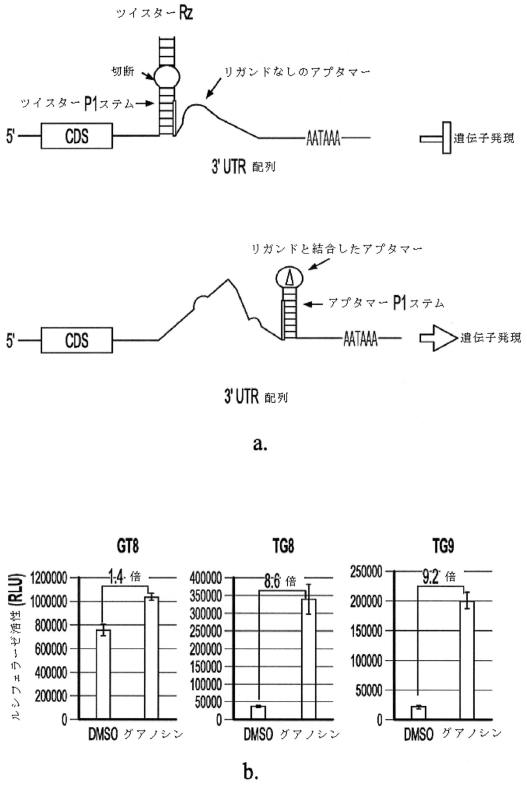
【図４】



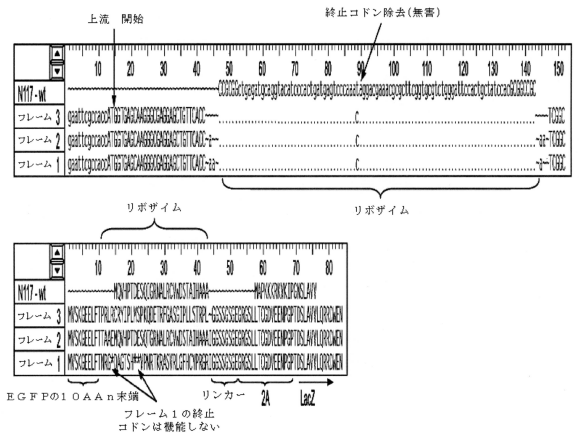
【図５】


ATG_スズメバチGua16
5'
ATG
スズメバチGua16
リンカー2A
ルシフェラーゼ
3'
10aa_スズメバチGua16
5'GFP(30nt)
a.
ルシフェラーゼ活性 (RLU)
- Gua
+ Gua
ATG_wt スズメバチGua16
ATG_mut スズメバチGua16
10aa_wt スズメバチGua16
ATG_mut スズメバチGua16
b.

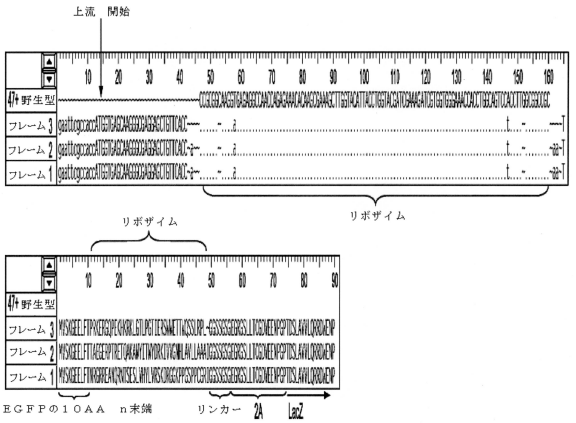
【図６】


ツイスターRz
切断
リガンドなしのアプタマー
ツイスターP1ステム
5'
CDS
AATAAA
遺伝子発現
3'UTR 配列
リガンドと結合したアプタマー
アプタマーP1ステム
a.
GT8
TG8
TG9
1.4 倍
8.6 倍
9.2 倍
ルシフェラーゼ活性 (RLU)
DMSO
グアノシン
b.

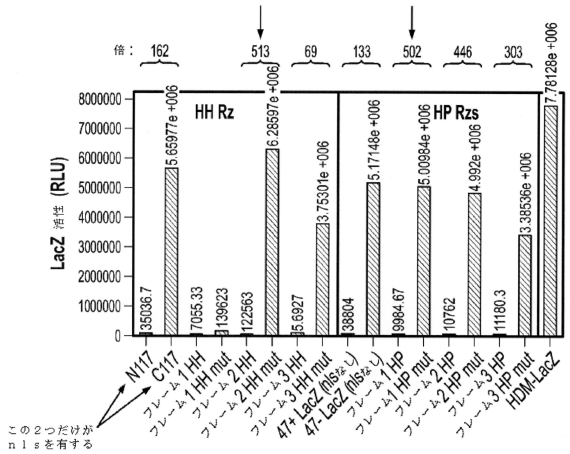
【図７ａ】


上流 開始
終止コドン除去(無害)
N117-wt
フレーム3
フレーム2
フレーム1
リボザイム
EGFPの10AAn末端
リンカー
2A
LacZ
フレーム1の終止
コドンは機能しない

【図７ｂ】


上流 開始
47+野生型
フレーム3
フレーム2
フレーム1
リボザイム
EGFPの10AA n末端
リンカー
2A
LacZ

【図７ｃ】



【配列表】

0007222715000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		
A61P 43/00 (2006.01)		A61P	43/00	121
C12N 15/861 (2006.01)		C12N	15/861	Z
C12N 15/864 (2006.01)		C12N	15/864	100Z
C12N 15/867 (2006.01)		C12N	15/867	Z

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
2

(72)発明者 オリヴィエ・エフ・ダノス
アメリカ合衆国・マサチューセッツ・０２１１４・ボストン・ハンコック・ストリート・４９
(72)発明者 アレックス・アール・ボイン
アメリカ合衆国・ニュージャージー・０７３０２・ジャージー・シティ・バン・フォースト・ストリート・１９８・アパートメント・４１５
(72)発明者 ヴェロニク・ゼンノウ
アメリカ合衆国・ニュージャージー・０７３０２・ジャージー・シティ・マーサー・ストリート・２２・アパートメント・２
(72)発明者 シュエクイ・グオ
アメリカ合衆国・ニューヨーク・１１７２４・コールド・スプリング・ハーバー・バングタウン・ロード・１

審査官 中野 あい

(56)参考文献 米国特許出願公開第２０１５／００５６１７４（ＵＳ，Ａ１）
Methods Mol Biol, 2016 JAN (Epub. 2015 NOV), vol. 1380, pp. 225-239
Felletti M., et al.,Twister ribozymes: From synthetic biology to in vivo function investigations，FEBS Journal, 2014, vol. 281, Supp. 1, pp. 400 (Abstract no. MON-440)
Curr Opin Biotechnol. 2015 (Epub 2014 Aug 17), vol. 31, pp. 10-15

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００－１５／９０
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）