

(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2005-501557

(P2005-501557A)

(43) 公表日 平成17年1月20日(2005.1.20)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 N 15/09

A 6 1 K 48/00

C 1 2 N 5/10

C 1 2 Q 1/02

F I

C 1 2 N 15/00

A 6 1 K 48/00

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 N 5/00

Z N A A

B

テーマコード (参考)

4 B O 2 4

4 B O 6 3

4 B O 6 5

4 C O 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 254 頁)

(21) 出願番号 特願2003-525634 (P2003-525634)
 (86) (22) 出願日 平成14年8月29日 (2002.8.29)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年2月27日 (2004.2.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2002/009670
 (87) 国際公開番号 W02003/020931
 (87) 国際公開日 平成15年3月13日 (2003.3.13)
 (31) 優先権主張番号 60/317, 229
 (32) 優先日 平成13年9月1日 (2001.9.1)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/385, 733
 (32) 優先日 平成14年6月4日 (2002.6.4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

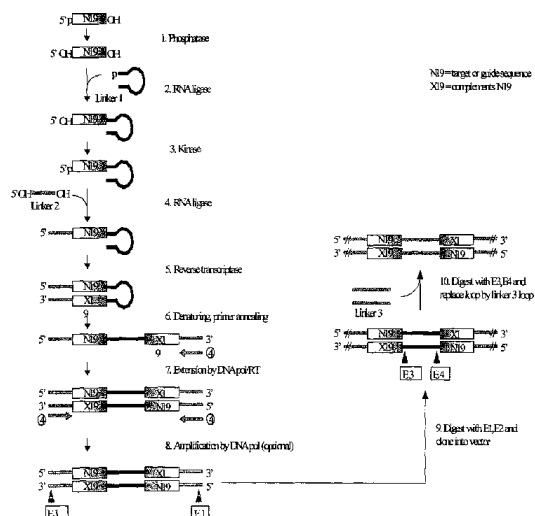
(71) 出願人 504064364
 ガラパゴス・ジェノミックス・ナムローゼ
 ・フェンノートシャップ
 GALAPAGOS GENOMICS
 N. V.
 ベルギー、ペー-2800メヘレン、ヘネ
 ラール・デ・ウィッテラン11番、アー
 3
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100106518
 弁理士 松谷 道子
 (74) 代理人 100116311
 弁理士 元山 忠行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 s i R N A ノックアウトアッセイ法およびコンストラクト

(57) 【要約】

本発明は、ポリヌクレオチドコンストラクト、その調製
 方法、および低分子干渉ポリリボ核酸分子の細胞内発現
 に基づく細胞内でのRNAおよび/またはタンパク質産
 生量を低下させる方法におけるその使用のための調製物
 に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

約 17 から約 23 ヌクレオチドからなり、宿主細胞における約 17 から約 23 ヌクレオチドの RNA 配列に相補的な第一のポリヌクレオチド配列を含み、該第一の配列は第二の配列が RNA 配列の場合、共有結合により、ステムループ構造を形成することができる第二の配列と連結しており、ここで該第一の配列は実質的に RNA 配列、またはそれに均等な一本鎖 DNA からなる、宿主細胞における特定の RNA 分子の下方制御または分解に有用な単離ポリヌクレオチド。

【請求項 2】

該第一の配列に相補的であり、該第二の配列の遠位末端に共有結合により連結した第三の配列をさらに含む、請求項 1 記載のポリヌクレオチド。 10

【請求項 3】

該第二の配列が第二の配列内でステムループ構造を形成することができる、請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4】

該第一および第三の配列におけるすべてのヌクレオチドが塩基対形成する、請求項 2 または 3 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5】

該第二の配列が酵素によって切断され得る少なくとも 1 つのヌクレオチド配列を含む、請求項 1 から 4 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。 20

【請求項 6】

少なくとも 2 つの酵素切断部位を有する、請求項 5 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7】

該酵素切断部位の少なくとも 1 つが該ステムループ構造のステム部分に位置する、請求項 5 または 6 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 8】

少なくとも 1 つの酵素切断部位が該第一の配列と該第二の配列の間に挿入されている、請求項 5 から 7 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項 9】

該第一の配列に関連する発現産物の機能が未知である、請求項 1 から 8 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。 30

【請求項 10】

該第一の配列が約 19 から約 21 ヌクレオチド長である、請求項 1 から 9 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項 11】

宿主細胞における RNA の下方制御または分解に有用な自己相補的一本鎖ポリヌクレオチドであって、約 17 から約 23 ヌクレオチドからなり該宿主細胞の該 RNA 配列の約 17 から約 23 ヌクレオチドに相補的な第一のポリヌクレオチド配列、および、第二の配列が RNA 配列である場合、ステムループ構造を形成することができる第二のヌクレオチド配列によって共有結合により連結した第三のヌクレオチド配列を含み、それによって該第一の配列および該第三の配列におけるすべてのヌクレオチドが互いに塩基対を形成することができる、ここで該第二のヌクレオチド配列が、天然の RNA 配列由来であって、宿主細胞において特定の RNA 分子を機能的に標的としない配列を含むステムループ形成領域を含む、自己相補的一本鎖ポリヌクレオチド。 40

【請求項 12】

該第二の配列が mRNA 以外の天然の RNA 配列由来であって約 4 から約 30 ヌクレオチド長である、請求項 1 から 11 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項 13】

該第二の配列が約 4 から約 13 ヌクレオチドである、請求項 1 から 12 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。 50

【請求項 14】

さらにRNA配列またはそれに均等な一本鎖DNAを含む第四のヌクレオチド配列を含み、該第四の配列は該第一または第三の配列の遊離末端に共有結合により連結しており、該RNA配列が宿主細胞において酵素によって切断され得、切断されると該第一または第三の配列の遊離末端となる、請求項2から13のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項 15】

さらにRNA配列またはそれと均等な一本鎖DNAを含む第五のヌクレオチド配列を含み、該第五の配列が該第一または第三の配列の遊離末端に共有結合により連結しており、該RNA配列が宿主細胞において酵素によって切断され得、切断されると該第一または第三の配列の遊離末端となる、請求項14記載のポリヌクレオチド。

10

【請求項 16】

該第四の配列がベクターへの方向性のクローニングを可能にするように機能する、請求項14または15に記載のDNA配列。

【請求項 17】

請求項1から16記載のポリヌクレオチドおよび該第一の配列の上流に位置するプロモーター配列を含む、宿主細胞をトランスフェクトするのに有用なベクター。

【請求項 18】

該プロモーターがマイクロRNAプロモーターであり、好ましくは該プロモーターがlet-7プロモーターである、請求項17に記載のベクター。

【請求項 19】

該プロモーターがRNAポリメラーゼIIIによって認識されるプロモーターであり、好ましくは該プロモーターが5S rRNA、tRNA、VA RNA、Alu RNA、H1、またはU6核内低分子RNAからなる群から選択される、請求項17または18に記載のベクター。

20

【請求項 20】

該ポリヌクレオチドがアデノウイルスゲノム配列に共有結合により連結したDNAからなる、請求項17から19のいずれかに記載のベクター。

【請求項 21】

宿主細胞に存在する少なくとも1つのRNA配列の量を低下させる方法であって、請求項1から16のいずれかに記載のポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドをコードするベクターで該細胞をトランスフェクトすることを含み、ここで該第一の配列が該RNA配列に相補的である方法。

30

【請求項 22】

ステムループ構造を形成するポリヌクレオチド配列によって共有結合により連結した相補的配列を含む自己相補的一本鎖ポリヌクレオチドの調製方法であって、実質的に少なくとも2つの相補的塩基対を形成できるヌクレオチド配列を含むことによりステムループ構造を形成し、3'OH末端を有する第二のポリヌクレオチド配列に共有結合によって連結した第一のポリヌクレオチド配列からなる一本鎖ポリヌクレオチドを、該第一の配列がそれに対する相補的配列の合成のために3'OH末端から開始する鋳型として働く条件下で処理することを含む自己相補的一本鎖ポリヌクレオチドの調製方法。

40

【請求項 23】

請求項1から13のいずれかに記載のポリヌクレオチドの配列を含むベクターの調製方法であって、該ポリヌクレオチドがDNA配列であり、さらに該第一の配列の遊離末端に連結した第四の配列を含んでおり、該ポリヌクレオチドを変性し、二本鎖ポリヌクレオチドに変換し、そして宿主細胞をトランスフェクトすることができ該ポリヌクレオチドを転写することができるベクターへライゲーションする方法。

【請求項 24】

天然のポリヌクレオチド配列の機能を決定する方法であって、請求項17から20のいずれかに記載のベクターで宿主細胞をトランスフェクトすること、ここで該ベクターは該天然のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド配列を含むものである、および、細胞

50

表現型の変化を検出することを含む方法。

【請求項 25】

請求項 1 から 16 のいずれかに記載の発現可能なポリヌクレオチド配列および該配列に作動可能に連結したプロモーター配列を含むベクターのライブラリー。

【請求項 26】

該ベクターがウイルスベクターである、請求項 25 に記載のライブラリー。

【請求項 27】

該ベクターが、AAV、レンチウイルスまたはレトロウイルスからなる群から選択される請求項 26 に記載のライブラリー。

【請求項 28】

該ベクターがアデノウイルスベクターであり、好ましくは該アデノウイルスベクターが複製欠損のものである、請求項 26 に記載のライブラリー。

【請求項 29】

請求項 1 から 16 のいずれかに記載のポリヌクレオチドまたは請求項 17 から 20 のいずれかに記載のベクターによって安定にトランスフェクトされた細胞であり、好ましくは該細胞が PER.C6 細胞である細胞。

【請求項 30】

以下の工程を含む毒性タンパク質をコードするウイルスベクターの産生方法：

(a) 該毒性タンパク質をコードする mRNA 配列に含まれる特有の配列に相補的な第一の配列を有する請求項 1 から 16 のいずれかに記載のポリヌクレオチド配列を細胞に導入する工程、

(b) 該ウイルスベクターを該細胞に導入する工程、

(c) 該細胞をポリヌクレオチド配列の発現および該ウイルスベクターの複製を可能とする条件下で培養する工程、および、

(d) 該ウイルスベクターを回収する工程。

【請求項 31】

該細胞が該ポリヌクレオチドで安定にトランスフェクトされたウイルスパッケージング細胞である、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

対象における特定の RNA または RNA から翻訳されるタンパク質の量を低下させる方法であって、請求項 17 から 22 のいずれかに記載のベクターを、トランスフェクトされた細胞における特定の RNA の量を低下させるのに有効な量で投与する工程、該対象における細胞をトランスフェクトする工程を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ポリヌクレオチドコンストラクト、その調製方法、および低分子干渉ポリリボ核酸分子の細胞内発現に基づく細胞における RNA および/またはタンパク質産生量を低下させる方法におけるその使用のための調製物に関する。

【背景技術】

【0002】

最近の数十年間にわたるゲノム科学研究の結果、すべてのヒトゲノムのほぼ完全なマップが完成し、医学研究において新たな方向が開かれた。このポストゲノム科学時代において新たな科学の研究分野、例えば、プロテオミクスや機能ゲノム科学が出現した。かなりの R & D 予算を有する伝統的な製薬会社は新たな機能ゲノム科学およびプロテオミクスの基盤技術に進出することに興味を抱いている。必要とされるのは、新規な治療標的を同定するためのよりよいスクリーニング技術およびよりよい標的確認 (validation) アプローチである。現代医学のすべての研究分野を適用することにより、機能ゲノム科学は全てのヒトの疾患の治療に大きな違いを生み出す潜在能力がある。

【0003】

10

20

30

40

50

製薬会社は信頼できるロックダウンに基づく技術に興味を抱いている。というのは、小分子の薬剤スクリーニングは、発現タンパク質の活性および効果を阻害することに基づくからである。それゆえ、細胞アッセイにおけるスクリーニングによって、または単一遺伝子確認によって潜在的標的の発現または機能を阻害することにより、創薬プロセスの早期に標的の薬剤としての能力に関する重要なデータセットが提供される。かかるデータセットは、有効な治療の開発を目的として、化合物、抗体または生物分子 (biological) に基づく創薬プログラムの開始の強力な基礎を形成する。

【0004】

脊椎動物における遺伝子機能の研究は、ゲノムの複雑性、多細胞であるという特性および網羅的な遺伝的ツールがないことにより阻まれている。安定なトランスジェニック細胞系またはトランスジェニックマウスを作成する技術は強力であるが、非常に時間と労力がかかるアプローチであり、ハイスループットで行うのは困難である。

10

【0005】

様々なロックダウンまたはロックアウトアプローチが哺乳類細胞における遺伝子機能を研究するのに用いられている (例えば、アンチセンス、抗体、リボザイム、アプタマー、ジンクフィンガータンパク質、キメラRNA-DNAオリゴなど)。しかしながら、かかる技術は強力でも効率的でもなく、それらは一般にすべての遺伝子およびすべての細胞型に適用することはできない。

【0006】

RNA干渉 (RNAi) は遺伝子サイレンシングの転写後プロセスであり、サイレンスされるべきRNAの配列に相対的な二本鎖RNA (dsRNA) によって媒介され、動物および植物において観察されている。dsRNAはプロセシングされて21-23ヌクレオチド (nt) 分子になり、これは低分子干渉RNA (siRNA) と呼ばれ、標的RNAの配列特異的分解をガイドする (Sharp, 2001)。

20

【0007】

線虫 (*C. elegans*) において初めてRNA干渉が発見され (Fire et al., 1998)、その後、dsRNAの導入により配列特異的サイレンシング効果が誘導される生物の例が多数報告された。

【0008】

ショウジョウバエ (*drosophila*) の胚または培養細胞の抽出物を用いたインビトロ系の開発により、配列特異的サイレンシング効果の背後のメカニズムに対する知識が増大した (Elbashir et al., 2001b; Hammond et al., 2000; Zamore et al., 2000)。これら抽出物に導入されるdsRNAはプロセシングされて21-23 nt断片となる。これら抽出物はいまや、dsRNA断片とオーバーラップする配列を有する標的RNAを分解するために「プログラムされている」といえる。標的RNAは両方の鎖、即ちセンスおよびアンチセンス鎖において、21-23 ntの間隔で切断される。これら小分子種は、低分子干渉RNA (siRNA) と呼ばれる。より長いdsRNA種がより短いRNAよりも強力であると思われるにもかかわらず、特異的サイレンシング効果は21-23 ntのsiRNAを直接細胞にトランスフェクトすることによって得られる (Elbashir et al., 2001b)。

40

【0009】

成熟したsiRNA二本鎖は正確にプロセシングされて2-または3-ntの3'オーバーハングを有する21-23 nt長の二本鎖RNAを形成する；これらは修飾ヌクレオチドを含まず5'リン酸基 (その機能に必須ではない) と3'水酸基を有する。2-または3-ntのオーバーハングを有するsiRNA二本鎖は平滑末端を有する二本鎖や4-ntのオーバーハングを有する二本鎖よりも活性が高い。センス鎖またはアンチセンス鎖のいずれかにおける17以上 (or-up) の3'末端の延長の結果、相補的標的鎖の切断の活性が失われる。これはアンチセンス鎖の正確な3'末端がsiRNA二本鎖がセンス標的RNAを分解する活性を維持するために必須であることを示す (Elbashir et al., 2001b)。

50

【 0 0 1 0 】

遺伝的研究により R N A i と線虫におけるトランスポゾンサイレンシングが関連付けられた。植物における翻訳後遺伝子サイレンシング (P G T S) による共抑制 (co-suppression) は、およそ 2 2 n t の低分子ガイド R N A によって媒介される関連する機構によって機能しているようである。

【 0 0 1 1 】

いくつかのタンパク質因子が遺伝的および生化学的研究に基づき R N A i と関連するとされた (Sharp, 2001)。 R D E - 1 遺伝子ファミリーはよく保存された多数のメンバーからなる (線虫において 2 4)。 R D E - 1 ファミリーのメンバーは機能未知の保存された P I W I - および P A Z - ドメインを含む。 R D E - 1 ホモログは様々な種においてみられ、 R D E - 1 ファミリーメンバーは様々なプロセスでの作用に参与している ; R N A i 、植物における P T G S 、ショウジョウバエにおける胚発生、小分子一過性 (small temporal) R N A の発現および制御。

10

【 0 0 1 2 】

ダイサー (Dicer) タンパク質は R N a s e I I I ファミリーのメンバーであり、いくつかの種において保存されている。ダイサーはヘリカーゼドメイン、 1 - 2 の d s R N A 結合ドメイン、 2 の R N a s e I I I 型ドメインおよび P A Z ドメインを含む。ダイサーは機能的な 2 1 ヌクレオチド長の s i R N A をより長い d s R N A 複合体から作成するのに必要とされる (Bernstein et al., 2001)。

【 0 0 1 3 】

線虫において 2 1 - 2 2 n t の小分子一過性 R N A (s t R N A) である l e t - 7 および l i n - 4 は、発生の過程で調節的役割を果たしている。これらはその標的転写産物の 3 ' 非翻訳領域における配列を認識することによって作用し、その結果発現が強く抑制される (Reinhart et al., 2000)。 s t R N A はより長い前駆体転写産物からプロセシングされて生じる。成熟した l e t - 7 R N A はヒトにおいても検出されており、保存された二次構造を有する前駆体が予測されている (Pasquinelli et al., 2000)。

20

【 0 0 1 4 】

s t R N A l e t - 7 の正確なプロセシングのためには、ダイサーが必要である (Grishok et al., 2001; Hutvagner et al., 2001)。それゆえ、ダイサーは二つの機能を有する : d s R N A の s i R N A へのプロセシングおよび l e t - 7 前駆体の成熟した l e t - 7 s t R N A へのプロセシングである。産物である s t R N A と s i R N A は、いくつかの特徴において異なっているがいくつかの特徴を共有している。

30

【 0 0 1 5 】

s t R N A と s i R N A の間の相違には以下のものが含まれる。

- (1) 成熟した s i R N A のセンスおよびアンチセンスの両鎖が細胞内に存在する ; 成熟した s t R N A のアンチセンス鎖のみが検出されうる、
- (2) s t R N A の二本鎖領域はいくつかの G - U 塩基対およびミスマッチを含むが、 s i R N A は 1 0 0 % 相補的な二本鎖を有する、および、
- (3) s i R N A の作用の態様は R N A 分解であるが、 l e t - 7 s t R N A は翻訳阻害を引き起こすと考えられている。

40

【 0 0 1 6 】

s t R N A と s i R N A は以下の特徴を共有する。

- (1) 両 R N A 種は遺伝子発現の抑制に参与している、
- (2) 成熟した s i R N A と成熟した s t R N A はともに 2 1 - 2 2 n t 長である、
- (3) 両者は二本鎖の、より長い前駆体 R N A から生じる、そして、
- (4) s t R N A と s i R N A の両方の活性形態へのプロセシングは同じ酵素である、ダイサーによって媒介されている。

【 0 0 1 7 】

(報告されている進展)

R N A i により研究者に遺伝子機能を研究するためのさらなる遺伝的ツールが提供される

50

。線虫において、染色体 I および I I I は今や系統的に表現型効果について分析された。RNA i アプローチにより発生研究におけるさらなる可能性が生じた。伝統的な発生過程で致死効果を有するノックアウトによっては発生の後期段階を分析することはできなかった。RNA i によれば、効果の開始を変動させることができ、発生の後期段階における役割が研究できる。

【0018】

哺乳類細胞における RNA i の使用には問題があった。というのは長い (> 30 塩基対) dsRNA の導入により 2 つの主要な細胞内応答が起こるからである：二本鎖 RNA 依存性タンパク質キナーゼ PKR の活性化により、タンパク質合成が全体的に阻害される；そして 2' - 5' - 少アデニル合成酵素を介した RNase L の活性化により、すべての mRNA が攻撃される。

10

【0019】

哺乳類において、ウイルス感染過程で生じることが多い、細胞内での dsRNA の出現の結果、強い細胞応答が起こる。主要な活性は dsRNA に結合するインターフェロン - 誘導性 dsRNA - 依存的タンパク質キナーゼ (PKR) によって媒介される。この結果、PKR の自己リン酸化と活性化が起こる。活性化した PKR は真核生物翻訳開始因子 2 のアルファサブユニット (eIF2 - アルファ) を、セリン - 51 の位置においてリン酸化する。GTP に結合した eIF2 は、イニシエーター tRNA メチオニンをリボゾームの小サブユニットに運び、eIF2 は GTP - 結合形態で遊離する。連続的に進行する翻訳を行うためには、eIF2 は GTP - 結合形態から GTP - 結合形態へとリサイクルされなければならない。PKR による eIF2 - アルファのリン酸化はこのリサイクルを阻害し、それによって翻訳開始が阻害される。その結果、dsRNA は哺乳類細胞において全体的な翻訳を阻害することになる。

20

【0020】

dsRNA は、インターフェロン - 誘導性 (2' - 5') 少アデニル合成酵素を活性化することも知られている。活性化されると、この酵素は ATP を 2' - 5' - 結合ヌクレオチドオリゴマー (2 - 5 A と明示される) に重合する。2 - 5 A オリゴマーはリボヌクレアーゼ RNase L を活性化し、その結果 RNA 分解が起こる。

【0021】

さらに哺乳類においてはいくらかの mRNA は核 dsRNA - 特異的アデノシンデアミナーゼ (ADAR) によって編集される。ADAR は、脳グルタミン酸受容体 (gluR) に対する mRNA など、特定の基質に選択的に作用するが、その活性は非常にわずかな配列特異性しか示さず、特定の最小長より長いあらゆる dsRNA 分子に対して作用しうる。この一般的修飾活性により、アデノシン - からイノシン - 残基への脱アミノが起こり、その結果 dsRNA ヘリックスの巻き戻しが起こる。

30

【0022】

実際、ショウジョウバエ - 培養細胞に対して働く dsRNA のトランスフェクションアプローチは様々な哺乳類起源の培養細胞において失敗している。しかし、マウス胚と卵母細胞におけるマイクロインジェクション実験により、これらの条件下で RNA i 効果が観察されることが示された。これは哺乳類系において RNA i が可能であることを示唆する。

40

【0023】

最近、RNA i が一連の哺乳類細胞系において利用可能なことが示された (Elbashir et al., 2001a)。このアプローチは細胞への 21 - 23 nt の siRNA 二本鎖の直接的トランスフェクションに基づく。これにより上記の細胞内応答が回避され、その結果内在性および異種性遺伝子の配列特異的サイレンシングが起こる。

【0024】

siRNA トランスフェクションアプローチの重要な障害は標的の異なる細胞型、特に一次細胞 (primary cell) への適用が制限されていることである。一次細胞はインビボ状況に非常に近く、生理的関連性が最も高いことが多い。非 - ウイルス DNA または siRNA トランスフェクション技術はこれら細胞に関して深刻な制限を有し、有効かつ信頼でき

50

るものではない。これらアプローチの実践的使用には、かなりの条件の最適化が必要であり、ラージスケールでの適用に必要な信頼性が一般に欠けている。使用される遺伝子移入試薬は毒性であることが多く、生きた形質導入細胞のレベルが低くなる。要するに、これらによっては広範な細胞型へのジェネリックな s i R N A の適用はできない。広範な細胞型には一次細胞型、例えば T 細胞、B 細胞、肥満細胞、内皮細胞、滑膜細胞および肺上皮細胞が含まれる。さらに、s i R N A のトランスフェクションによっては短いロックダウン効果がもたらされる。細胞における持続したロックダウン効果を得るためにはさらにいくつかのトランスフェクションが必要である。

【0025】

それゆえ、s i R N A 技術の広範な適用にはこれらの限界を克服するさらなる研究開発が必要であろう。哺乳類細胞における遺伝子のロックダウンのゲノム科学スケールの実行は、広範な細胞系および一次細胞型に適用できる信頼できる確実かつ効率的な遺伝子移入技術がないことにより阻まれている（上記を参照）。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0026】

本発明は従来技術によって認識されている限界を克服し、多くの分野、例えばゲノム科学研究、ウイルス産生およびタンパク質産生への適用を見出すものである。

【0027】

組換えウイルスの産生は、ウイルス産生に干渉する致死または毒性タンパク質をコードする外来配列の発現によって複雑となる場合がある。従来技術によると、T e t - 抑制系および E c d y s o n 系を含むタンパク質産生の一時的なシャットダウン系が開示されている。これらの系はしかし時間がかかり、コンストラクトをベクターに導入するために困難なクローニング工程を伴う。従来技術のさらなる欠点は、抑制系は外来遺伝子を発現させるものであり、抑制系自体が遺伝子発現に向かうことを抑制する化合物を添加する必要があることが多い。本発明はすべてのウイルスパッケージングおよびタンパク質産生系に適用でき、それぞれウイルスまたは産生細胞の産生段階において致死または組換えタンパク質を選択的ロックダウンすることにより産生を向上させるものである。

【課題を解決するための手段】

【0028】

（発明の概要）

本発明は、宿主細胞における特定の R N A 分子の下方制御または分解に有用な、単離ポリヌクレオチド、およびそれを含むベクターに関し、これは実質的に以下からなる。約 17 から約 23 ヌクレオチドからなり、該宿主細胞における該 R N A 配列の約 17 から約 23 ヌクレオチドに相補的な第一のポリヌクレオチド配列であって、該第一の配列は共有結合により第二の配列に連結しており、第二の配列は、該第二の配列が R N A の場合ループ構造を形成することができ、ここで該第一の配列は実質的に R N A 配列、またはそれに均等な一本鎖 D N A からなる。

【0029】

本発明の別の態様は、自己相補的一本鎖ポリヌクレオチド、およびそれを含むベクターに関し、これは、第一のヌクレオチド配列および第二のヌクレオチド配列によって共有結合により連結した第三のヌクレオチド配列を含み、第二の配列は、該第二の配列が R N A の場合、ステムループ構造を形成することができ、それによって該第一の配列および該第三の配列におけるすべてのヌクレオチドは互いに塩基対を形成することができ、ここで該第二のヌクレオチド配列は、R N A 分子にみられる天然の R N A 配列由来の配列を有するステムループ形成領域を含み、機能的に宿主細胞における特定の R N A 分子を標的にしないものである。もっとも好ましくは第二の配列は m R N A 以外の R N A 分子由来のものである。

【0030】

本発明の別の態様は、宿主細胞に存在する特有の配列を有する少なくとも 1 つの R N A 分

10

20

30

40

50

子の量を減少させる方法に関し、該方法は、該細胞を上記の自己相補的一本鎖ポリヌクレオチドをコードするベクターでトランスフェクトすることを含み、ここで該ポリヌクレオチドは該RNA配列に相補的な第一の配列を含む。

【0031】

本発明の別の態様は、ステムループ構造を形成するポリヌクレオチド配列によって共有結合により連結した相補的配列を含む自己相補的一本鎖ポリヌクレオチドの調製方法に関し、該方法は、実質的に、相補的塩基対を形成することができ、それによって3'OH末端を有するステムループ構造を形成することができる2つのヌクレオチド配列を含む第二のポリヌクレオチド配列に共有結合により連結した第一のポリヌクレオチド配列からなる一本鎖ポリヌクレオチドを、該第一の配列がそれに対する相補的配列の合成のための3'OH末端を開始させる鋳型として働くような条件下で処理することを含む。

【0032】

本発明の別の態様は、本発明によるポリヌクレオチドの配列を含むベクターの調製方法に関し、ここで該自己相補的ポリヌクレオチドはDNA配列であり、さらに該第一の配列の遊離末端に連結した第四の配列を含み、ここで該ポリヌクレオチドは変性して、二本鎖ポリヌクレオチドに変換され、宿主細胞をトランスフェクトすることができ該ポリヌクレオチドを転写することができるベクター中にライゲーションされる。

【0033】

本発明のさらなる態様は、天然のポリヌクレオチド配列の機能を決定する方法に関し、該方法は、宿主細胞を本発明によるベクターでトランスフェクトする工程、ここで該ベクターは該天然のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド配列を含む、そして細胞表現型の変化を検出する工程を含む。

【0034】

本発明の別の態様はベクターのライブラリーおよびベクターに関し、これは実質的に本発明によるポリヌクレオチドからなる。本発明のさらなる態様は、対象におけるRNAまたはRNAから翻訳されるタンパク質の量を減少させる方法に関し、該方法は、本発明によるベクターを投与する工程、およびトランスフェクトされた細胞における該RNAの量を減少させるのに有効な量において、該対象の細胞をトランスフェクトする工程を含む。

【0035】

本発明はウイルスまたは組換えタンパク質産生の間にタンパク質、例えば、致死タンパク質の一時的なロックダウンを提供し、それによって以下が可能となる：

- (1) 致死タンパク質をコードする配列を含むウイルスの複製およびパッケージング、
- (2) 組換えタンパク質の最適な産生。

下記のロックダウンコンストラクトはあらゆる選択されたパッケージング細胞にトランスフェクトすることができ、かかるトランスフェクトされた細胞は直接用いられる。ロックダウン系は、細胞を感染するのに直接用いられるウイルスコンストラクトを使用し、ウイルスまたはタンパク質産生を誘導する方法にはさらなる化合物は要求されない。

【0036】

(発明の詳細な記載)

以下の定義を実施例を含む本明細書に用いるが、これは本発明の範囲の理解を助けるためのものである。

【0037】

本明細書において用いる「キメラRNA」とは、共有結合により互いに結合し、少なくとも2の異なるRNA分子(これは同じ種のもので異なる種のもので良い)に由来する少なくとも2つのポリヌクレオチド配列から構築されたRNA分子を意味する。

【0038】

本明細書において用いる「ガイド配列」とは、標的配列に相補的なポリヌクレオチド配列を意味する。

【0039】

「致死タンパク質」とは、そのタンパク質が致死量産生された場合、産生した細胞を殺し

うるタンパク質を意味する。致死タンパク質には、アポトーシスを誘導するタンパク質、例えば、Bax、Bcl-Xs、BadおよびBak、Fas、およびCasp1、そしてウイルス複製を阻害するタンパク質、増殖を阻害するタンパク質またはタンパク質合成を転写または翻訳レベルで阻害するタンパク質が含まれる。さらなる毒性タンパク質の具体例は、全長Tiam、Rac、Rho、およびRasである。

【0040】

本明細書において用いる「siRNA」とは、約23ヌクレオチド長以下の二本鎖低分子干渉RNA分子を意味する。科学文献によると、siRNAは標的mRNAの配列特異的分解を媒介するものとして記載されている。

【0041】

本明細書において用いる「sRNA」とは、約25ヌクレオチドより短い一本鎖または二本鎖RNA分子を意味する。sRNAにはstRNAとsiRNA分子の両方が含まれる。

10

【0042】

本明細書において用いる「stRNA」とは、宿主細胞におけるRNA中の3'非翻訳領域に相補的な一本鎖小分子一過性RNA分子を意味する。

【0043】

本明細書において用いる「ステムループ」とは、互いに相補的であり、一本鎖ポリリボヌクレオチドにおいて、相補的二本鎖構造の形成を可能にする塩基対を形成する2つの配列を含む一本鎖ポリヌクレオチドであって、該2つの塩基対を形成する配列に隣接する非相補的ループ配列を含むものを意味する。ループのステム部分を構成する相補的塩基対は少なくとも2、より好ましくは少なくとも3塩基対長である。特定の態様において、(1または複数の)ステム塩基対は、第一の配列と第三の配列の相補的配列に対応し、ステム塩基対が相補的である1または複数の第二の配列は、第一の配列と第三の配列の相補的塩基対として重複しても良い。かかる特定の状況下では第二の配列のステム部分は、相補的塩基対が1つのみであるか、相補的塩基対がないと考えられる。

20

【0044】

本明細書において用いる「標的配列」とは、宿主細胞におけるRNAに存在するポリリボヌクレオチド配列を意味する。

【0045】

本明細書において用いる「トランスフェクト」とするとは、当業者に知られたようにして核酸を細胞に導入するあらゆる手段を意味する。それには以下のものが含まれるがこれらに限定されない。例えばリン酸カルシウムまたはリポソームに基づく試薬による形質導入、例えば、ウイルスベクター、ファージによる感染、浸漬プロセスを介するエレクトロポレーション、または物理的方法を用いた核酸の導入、例えばマイクロインジェクションまたはDNAによりコーティングされた粒子による微粒子流。

30

【0046】

本発明による自己相補的一本鎖ポリヌクレオチドは、第一のガイド配列および第二の配列を含み、第二の配列は、該第二の配列がRNAの場合、該第二の配列のなかでステムループ構造を形成することができるものである。好適な態様では、ポリヌクレオチドは第三の配列を含み、これは第一のガイド配列に相補的であり、共有結合により第二の配列の末端(遠位末端)に連結している。もっとも好適な本発明の自己相補的ポリヌクレオチドにおいては、第一および第三の配列におけるすべてのヌクレオチドが塩基対を形成する。好適な自己相補的ポリヌクレオチドは第二のヌクレオチド配列を含み、これはmRNA以外のRNA分子由来のステムループ形成領域を含む。

40

【0047】

本発明は、第一または第三の配列のいずれかをガイド配列とし、これは、宿主細胞系において、一本鎖ポリヌクレオチドによってコードされる、stRNA、siRNA、sRNAまたはキメラRNAを、相補的配列を有するRNAに導く機能を有する。第一および第三のポリヌクレオチド配列は約17から約23ヌクレオチドの長さを有し、好ましくは約

50

19 から約 22 ヌクレオチド、もっとも好ましくは約 19 または約 21 ヌクレオチドの長さであり、これらはすべて特定の RNA においてみられる配列に対応する。宿主細胞における RNA は、mRNA、tRNA、snRNA、rRNA、mtRNA、または構造的 RNA、あるいはウイルス、細菌または寄生虫の感染の結果存在する宿主細胞においてみられる RNA などの RNA 分子であってもよい。好適な RNA 分子は mRNA 分子である。宿主細胞における RNA は、既知の RNA 分子または既知の機能のタンパク質をコードする既知の RNA であってよく、特定のタンパク質または細胞機能と関連付けられていない未知のものでもよい。

【0048】

好適なステムループ配列は、RNA 分子において存在することが当業者に知られているステムループ領域に基づくものであり、RNA 分子には例えば、tRNA、snRNA、rRNA、mtRNA、または構造的 RNA 配列が挙げられる。当業者であれば予測コンピュータモデリングプログラムを用いて簡単にステムループ RNA 構造を同定できるであろう。かかるプログラムとしては例えば、「Mfold」(M. Zuker、D.H. Mathews & D.H. Turner Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide In RNA Biochemistry and Biotechnology、11-43、J. Barciszewski & B.F.C. Clark、eds、NATO ASI Series、Kluwer Academic Publishers、(1999))、「RNA structure」(Mathews、D.H.; Sabina、J.; Zuker、M.; and Turner、D.H.、"gexpanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structures"、Journal of Molecular Biology、1999、288、911-940)、"Vienna RNA Package"における「RNAfold」(Ivo Hofacker、Institut fur theoretische Chemie、Wahringerstr. 17、A-1090 Wien、Austria)、"Tinoco plot" (Tinoco、I.Jr.、Uhlenbeck、O.C. & Levine、M.D. (1971) Nature 230、363-367)、保存された二次構造を探索する「ConStruct」(Luck、R.、Steger、G. & Riesner、D. (1996)、Thermodynamic prediction of conserved secondary structure: Application to RRE-element of HIV、tRNA-like element of CMV、and mRNA of prion protein. J. Mol. Biol. 258、813-826; and Luck、R.、Graf、S. & Steger、G. (1999)、ConStruct: A tool for thermodynamic controlled prediction of conserved secondary structure. Nucleic Acids Res. 21、4208-4217.)、「FOLDALIGN」(J. Gorodkin、L. J. Heyer and G. D. Stormo. Nucleic Acids Research、Vol. 25、no. 18 pp 3724-3732、1997a; and J. Gorodkin、L. J. Heyer、and G. D. Stormo. ISMB 5; 120-123、1997b)、および「RNA draw」(Ole Matzura and Anders Wennborg Computer Applications in the Biosciences (CABIOS)、Vol. 12 no. 3 1996、247-249)が挙げられる。

【0049】

RNA ステムループ構造は以下のようなデータベースにおいても見られる。例えば、小分子 RNA データベース (Karthika Perumal、Jian Gu、Yahua Chen and Ram Reddy Department of Pharmacology、Baylor College of Medicine、USA)、非コード RNA のデータベース (Erdman VA、Barciszewska MZ、Szymanski M、Hochberg A. the non-coding RNAs as riboregulators (2001) Nucleic Acids Res. 29: 189-193)、rRNA 大サブユニットデータベース (Wuyts J.、De Rijk P.、Van de Peer Y.、Winkelmans T.、De Wachter R. (2001) The European Large Subunit Ribosomal RNA database. Nucleic Acids Res. 29(1): 175-177)、小サブユニット rRNA データベース (Wuyts、J.、Van de Peer、Y.、Winkelmans、T.、De Wachter R. (2002) The European database on small subunit ribosomal RNA. Nucleic Acids Res. 30、183-185)、snRNA データベース出芽酵母用 (Lowe and Eddy、Science 283: 1168-1171、1999)、アーキア用 (Omer、Lowe、Russell、Ebhardt、Eddy and Dennis Science 288: 517-522、2000)、シロイヌナズナ用: (Brown、Clark、Leader、Simpson and Lowe RNA 7:1817-1832、2001)、tRNA 配列および tRNA 遺伝子配列 (Mathias Sprinzl、Konstantin S. Vassilenko、<http://www.uni-bayreuth.de/departments/biochemie/trna/>)、5S リボゾーム RNA データベース (Szyma

nski M、Barcizewska MZ、Erdman VA、Barciszewski J、" 5S ribosomal RNA database " (2002) Nucleic Acids Res. 30: 176-178)、R u t g e r s 大学における核酸データベースプロジェクト (N D B) (<http://ndbserver.rutgers.edu/NDB/>)、R N A 構造データベース (www.RNABase.org) が挙げられる。

【 0 0 5 0 】

これらのプログラムを用いることにより、R N A ステムループ配列を同定することができ、これを修飾して複数のループ領域を除き、その結果より短い、より簡単に合成しうるステムループ配列が得られる。より好適なステムループ配列は l e t - 7 ヌクレオチド配列由来のもの、またはその部分、あるいはそれに基づく人工的に合成したポリヌクレオチド配列である。

10

【 0 0 5 1 】

もっとも好適なステムループ領域は実質的に以下からなる：宿主細胞においてみられる l e t - 7 配列またはその部分、なんらかのその他の天然の R N A 配列またはその部分、あるいはポリヌクレオチドが R N A の場合ループ構造を形成することができる人工のポリヌクレオチド配列。上記のコンピュータプログラムによって予測されるこれら配列の複数のループ領域を除くことにより、より簡単に合成でき、扱うことができるステムループ配列が調製される。もっとも好ましいステムループ配列は l e t - 7 ヌクレオチド配列由来のものである。

【 0 0 5 2 】

ループ構造は好ましくは約 4 から約 30 ヌクレオチド長であり、より好ましい長さは約 4 から約 13 ヌクレオチドであり、もっとも好ましい長さは約 6 から約 12 ヌクレオチド長である。特別の態様のループ配列は、約 11 から約 16 ヌクレオチドからなる既知の R N A ループ配列に基づく人工配列を含むものである。好ましいループ配列の例を図 10 および 11 に挙げる。

20

【 0 0 5 3 】

特に好適な本発明のポリヌクレオチドはさらに第四のヌクレオチド配列を含み、これは実質的に R N A 配列、それに均等な一本鎖 D N A からなり、ここで該第四の配列は、第一または第三の配列の遊離末端に共有結合により連結しており、ここで該 R N A 配列は宿主細胞において酵素によって切断されることができ、その結果遊離の 3' および 5' - 末端を備える第一または第三の配列を有する R N A ポリヌクレオチドがインサイチュで調製される。

30

【 0 0 5 4 】

さらなる態様の本発明のポリヌクレオチドは、さらに第五のヌクレオチド配列を含み、これは実質的に R N A 配列、またはそれに均等な一本鎖 D N A からなり、該第一または第三の配列の遊離末端に共有結合により連結している。第五の R N A 配列は宿主細胞において酵素によって切断されることができ、その結果遊離の 3' および 5' 末端を備えた第一および第三の配列を有する R N A ポリヌクレオチドがインサイチュで調製される。

【 0 0 5 5 】

該第四および第五のヌクレオチド配列は好ましくは前駆体 R N A、例えばリボザイム、前駆体 t R N A、前駆体 r R N A、前駆体ミクロ R N A、リボザイムによって認識される R N A または R N a s e P によって認識される R N A 由来のものである。リボザイムはそれ自身を切断し、該第一または第三のヌクレオチド配列において遊離の 3' または 5' 末端が生じる。あるいは、リボザイムは自身によって認識される R N A 配列を切断し、それによって該第一または第三のヌクレオチド配列において遊離の 3' または 5' 末端が生じる。宿主細胞において存在する酵素が前駆体 R N A をプロセッシングする。かかる第四および第五のヌクレオチド配列は好ましくはそれらが宿主細胞に存在する酵素によって切断されるように設計される。

40

【 0 0 5 6 】

上記第四および第五の配列は天然に見られる「オーバーハング」配列由来のものであっても良く、例えば、「マイクロ R N A」ファミリーにおける R N A の相補部分を越えて伸張

50

している配列でもよい。マイクロRNA (miRNA) は、let-7 RNA および lin-4 RNA を構成メンバーとして含む 21 - 24 ヌクレオチドの非コード RNA の大きなクラスに属する。マイクロRNA 分子は様々な種のゲノムにみられ、かかる種には虫、昆虫、ヒトおよび植物が含まれ、典型的にはおよそ 70 nt 長のヘアピン構造の RNA 前駆体から発現される。これらヘアピン構造の前駆体はいくつかの前駆体のクラスターとしても存在する。通常、プロセッシング後に、前駆体の二本鎖領域の一方の鎖のみが細胞中に 21 - 24 ヌクレオチド RNA として蓄積する。同定された miRNA の例は、Lagos-Quintana、M et al. Science (2001) 294: 853、Lau、et al. Science (2001) 294: 858、Lee and Ambros Science (2001) 294: 862 に記載されている。

【0057】

本発明による最も好適な dsDNA ポリヌクレオチドは、以下に詳細に記載するように、その DNA ベクターへの方向性の (directional) クローニングを可能とするように機能する、第四の配列を含む。dsDNA ポリヌクレオチド配列はいずれかの末端に制限部位を含んでいてもよく、それによって 1 つの制限酵素または 2 種の制限酵素によって切断されることになり、効率的なクローニングが可能となる。その結果生じる dsDNA オリゴヌクレオチドの末端は好ましくはオーバーハングヌクレオチド配列 (5' または 3' オーバーハング) を有し、ベクター挿入部位にマッチする。末端に切断可能な制限部位を含む dsDNA ポリヌクレオチドは、標準的分子生物学的技術によって作成でき、例えば、2 つの相補的 ssDNA オリゴヌクレオチドをアニーリングさせることによって作成できる。あるいは、5' 末端にのみ制限部位を有する 2 つのアニーリングした DNA オリゴヌクレオチドは、酵素によってその相補的 3' 末端を伸張させて完全に相補的二本鎖 DNA を作ることができる。さらに、当業者であれば平滑末端クローニング技術および PCR を用いて別の合成系路を開発して本明細書に記載する方向性のクローニングを達成することができる。

【0058】

前述の第四および第五の配列は、本発明の DNA ベクターに存在する DNA 配列から転写されたものでもそうでなくてもよいが、上流のプロモーターまたは下流の終結シグナルの一部として機能してもよい。その結果、第四の配列は、RNA ポリメラーゼの転写のための開始シグナルを組み込むことになり、第五の配列は終止シグナル、例えば、複数の「T」配列を含み、これは転写されて多数の「U」ヌクレオチドの RNA の第五の配列となる。転写に際して、第四の配列は 1 から約 5、より好ましくは 1 から約 3 の「G」ヌクレオチドを除いて、RNA に転写されなくてもよい。

【0059】

本発明の特別の態様において、自己相補的ポリヌクレオチドの調製プロセスは中間体ポリヌクレオチドを用いる。中間体ポリヌクレオチドは実質的に、約 17 から約 23 ヌクレオチドからなる第一の配列からなり、該第一の配列は、ループ構造を形成することができる第二の配列に共有結合により連結しており、ここで該第一の配列は実質的に RNA 配列、それに均等な一本鎖 DNA、または該 RNA 配列に相補的な RNA または DNA 配列からなる。mRNA 配列、即ちタンパク質をコードする配列は、本発明による方法と組成物の特別の態様である。

【0060】

自己相補的一本鎖ポリヌクレオチドは化学合成によって調製してもよい。合成プロセスには RNA の標的配列が、調製されるものに対応する既知の 17 から 23 nt 配列であることが必要とされ、合成により続いて約 4 から約 30 ヌクレオチド、より好ましくは 6 から約 13 ヌクレオチドのステムループ配列が付加される。単離合成ポリヌクレオチドは、本発明の実施における中間体として使用するためのベクターを調製するために用いられ、あるいはさらに相補的第三の配列を含むように伸張される。

【0061】

実施するうえでは、約 2 から約 5 の配列が単一の RNA 配列から選択されて、対応する数の自己相補的ポリヌクレオチドおよびそれを含むベクターが調製される。以下に詳細に記

10

20

30

40

50

載する、本発明の方法は、この「冗長」の自己相補的一本鎖ポリヌクレオチドおよびそれを含むベクターのセットを使用して、相同的配列領域を有するRNAのファミリーの中に存在する1つのみの特有のRNAを標的とする最適の選択のRNA配列を決定する。あるいは、複数のRNA標的のロックダウン、例えばファミリーに属するRNAのロックダウンが望ましい場合は、複数のRNA標的を標的化する1つの配列を設計することもできる。

【0062】

該第三の配列を含む自己相補的ポリヌクレオチドを調製する別の方法は、実質的に相補的塩基対を形成することができる2つのヌクレオチド配列を含み、それによってステムループ構造が形成され、3'OH末端を有する第二のポリヌクレオチド配列に共有結合により連結した第一のポリヌクレオチド配列からなる一本鎖ポリヌクレオチドを、該第一の配列がそれに対する相補的配列の合成のために3'OH末端において開始する鋳型として働く条件下で処理することを含む。鋳型を用いる延長反応または化学合成の結果生じたポリヌクレオチドは、第一のヌクレオチド配列および共有結合により第二のヌクレオチド配列に連結した第三のヌクレオチド配列を含み、第二のヌクレオチド配列はステムループ構造を形成することができ、それによって該第一の配列および該第三の配列におけるすべてのヌクレオチドは互いに塩基対を形成することができる。該第一の配列に相補的な第三の配列は共有結合により第二の配列の末端に連結している。

10

【0063】

本発明の中間体ポリヌクレオチドの特別の態様において、該第二のヌクレオチド配列は少なくとも1つの酵素によって切断されうるヌクレオチド配列を含む。より好適な態様では、第二の配列は少なくとも2つの酵素切断部位を有する。特に好ましい中間体ポリヌクレオチドは、少なくとも1つの該酵素切断部位を含む該ステムループ構造のステム部分をコードする第二のポリヌクレオチド配列を含む。

20

【0064】

別の特別の態様は、ポリヌクレオチド中間体を含み、ここで少なくとも1つの酵素切断部位が該第二の配列の5'および/または3'末端にある。酵素切断部位は、少なくとも4から約8塩基対を含むヌクレオチド配列からなり、当業者に周知である。かかる配列は約2から約12のさらなるヌクレオチドを第二の配列に付加してよく、ループ配列の5'および3'末端を規定する相補的ヌクレオチドと置換してもよい。かかる伸張配列は約12から約50ヌクレオチドからなるものでよい。このましい伸張した人工ループ配列は約10から約36ヌクレオチドからなる。

30

【0065】

本発明はまた、自己相補的ポリヌクレオチドおよび該ポリヌクレオチドの第一の配列の上流に位置するプロモーター配列を含むベクターコンストラクトにも関する。本発明の自己相補的DNAポリヌクレオチド配列は、好ましくはプラスミドDNAベクター、アデノウイルスDNAウイルスベクター、アデノ-随伴ウイルスベクター、またはヘルペスベクターに挿入してもよく、RNA自己相補的ポリヌクレオチドは、好ましくはレトロウイルスベクターに挿入すればよい。DNAプラスミドベクターは、単独で送達してもよく、または様々な媒体と複合体化させても良い。DNA、DNA/媒体複合体、または組換えウイルス粒子は、以下に説明するように処置部位に局所的に投与される。好ましくは、本発明のポリヌクレオチドを発現することができる組換えベクターは、以下に記載のように局所的に送達され、標的細胞に残る。一度発現すると、自己相補的RNA分子はプロセシングされて内在性標的RNAへとガイドされ、ここでそれが機能して標的RNAを分解する。

40

【0066】

好ましいプロモーター配列には、マイクロRNAプロモーター、例えばlet-7プロモーター配列が含まれ、該プロモーターにはpolIIIプロモーターおよびpolIIプロモーターが含まれる。polIIIプロモーターは以下からなる群から選択されるプロモーターを含む：5SrRNA、tRNA、VA RNA、Alu RNA、H1、およびU6核内低分子RNAプロモーター。polIIプロモーターには、CMV、RSV、

50

M M L V、t e t - 誘導性、および I P T G - 誘導性プロモーターなどがある。

【 0 0 6 7 】

本発明の発現ベクターに使用できるプロモーターには、構成的プロモーターと調節（誘導性）プロモーターの両者が含まれる。プロモーターは宿主に応じて原核生物のものでも真核生物のものでも良い。本発明の実施に有用な原核生物の（バクテリオファージを含む）プロモーターは、l a c I、l a c Z、T 3、T 7、ラムダ P_r、P_L、および t r p プロモーターである。本発明の実施に有用な真核生物の（ウイルスを含む）プロモーターとしては遍在性プロモーター（例えば、H P R T、ビメンチン、アクチン、チューブリン）、中間体フィラメントプロモーター（例えば、デスミン、神経フィラメント、ケラチン、G F A P）、治療遺伝子プロモーター（例えば、M D R タイプ、C F T R、因子 V I I I）、組織特異的プロモーター（例えば、平滑筋細胞におけるアクチンプロモーター、または内皮細胞において活性な F l t および F l k プロモーター）が挙げられ、組織特異性を示し、トランスジェニック動物に利用される動物転写制御領域が含まれる：膵臓腺房細胞において活性なエラスターゼ I 遺伝子制御領域（Swift、et al. (1984) Cell 38:639-46; Ornitz、et al. (1986) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonal d、(1987) Hepatology 7:425-515）；膵臓ベータ細胞において活性なインシュリン遺伝子制御領域（Hanahan、(1985) Nature 315:115-22）、リンパ系細胞において活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域（Grosschedl、et al. (1984) Cell 38:647-58; Adames、et a l. (1985) Nature 318:533-8; Alexander、et al. (1987) Mol. Cell. Biol. 7:1436-44）、精巣、乳房、リンパ系および肥満細胞において活性なマウス乳腺腫瘍ウイルス制御領域（Leder、et al. (1986) Cell 45:485-95）、肝臓において活性なアルブミン遺伝子制御領域（Pinkert、et al. (1987) Genes and Devel. 1:268-76）、肝臓において活性なアルファ - 胎児タンパク質遺伝子制御領域（Krumlauf、et al. (1985) Mol. Cell. Biol.、5:1639-48; Hammer、et al. (1987) Science 235:53-8）、肝臓において活性なアルファ 1 - 抗トリプシン遺伝子制御領域（Kelsey、et al. (1987) Genes and Devel.、1:161-71）、骨髄細胞において活性なベータ・グロビン遺伝子制御領域（Mogram、et al. (1985) Nature 315:338-40; Kollias、et al. (1986) Cell 46:89-94）、脳のオリゴデンドロサイト細胞において活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域（Readhead、et al. (1987) Cell 48:703-12）、骨格筋において活性なミオシン軽鎖 - 2 遺伝子制御領域（Sani、(1985) Nature 314:283-6）、および視床下部において活性な性腺刺激放出ホルモン遺伝子制御領域（Mason、et al. (1986) Science 234:1372-8）。

10

20

30

【 0 0 6 8 】

本発明の実施に有用なその他のプロモーターには、分裂細胞において特に活性なプロモーター、刺激に応答するプロモーター（例えば、ステロイドホルモン受容体、レチノイン酸受容体）、テトラサイクリン制御転写モジュレーター、サイトメガロウイルス初期、レトロウイルス L T R、メタロチオネイン、S V - 4 0、E 1 a、および M L P プロモーターが挙げられる。

【 0 0 6 9 】

ベクターの構築において、本発明のポリヌクレオチドをプロモーターに加えて 1 または複数の調節領域に連結しても良い。適当な 1 または複数の調節領域の選択は常套手段に従い、当業者の技術範囲である。プロモーター以外の調節領域にはエンハンサー、サプレッサーなどが含まれる。

40

【 0 0 7 0 】

組換えレトロウイルス（s s R N A ウイルス）およびアデノウイルス（d s D N A）に加えて、系、その他のウイルスパッケージング系、例えば、s s D N A ウイルス、例えば、アデノウイルス - 随伴ウイルス（A A V）、が本発明におけるベクター骨格として使用するのに好適である。さらに、その他の s s R N A ウイルス、例えば、シンドビスウイルス、H I V、およびセムリキ・フォレスト（Semliki Forest）ウイルス、およびその他の d s D N A ウイルス、例えば、エプスタイン・パールウイルス、単純ヘルペスウイルス、バキュロウイルスまたはワクシニアウイルスが本発明におけるベクター骨格コンストラクト

50

として使用するのに好適である。これらの系はそれぞれ異なる宿主範囲を有する。アルファウイルス属のシンドビスウイルスにおいて (Invitrogen, San Diego, CA)、ポリヌクレオチドはシンドビスウイルス DNA ベクターのマルチクローニングサイトにライゲーションされる。即ちシンドビスサブゲノムプロモーターおよびポリアデニル化部位に作動可能に連結した、p S i n R e p S ; ポリヌクレオチドはシンドビスウイルス構造タンパク質遺伝子を置換する。シンドビスウイルス粒子の産生のために、オリゴヌクレオチド DNA をコードする組換えシンドビスベクターが直鎖化され、RNA へと転写され、脊椎動物 (BHK-21、Vero) または非脊椎動物細胞 (ショウジョウバエ) に、ウイルス構造タンパク質をコードするヘルパーベクター、p D H - B B から転写された RNA とともに共 - トランスフェクトされる。トランスフェクション後、組換えシンドビスゲノム RNA は m RNA として作用し、シンドビスウイルスポリメラーゼへと翻訳され、サブゲノムプロモーターからの s RNA およびヘルパー RNA からの構造タンパク質を発現する。シンドビスウイルスの宿主範囲のため、組換えシンドビスウイルスはパッケージングされてコードされた s RNA を、哺乳類、トリ、爬虫類、蚊およびショウジョウバエ細胞で発現するのに用いられる (例えば、Xong, C. et al. (1989) Science 243:1188-1191; Hahn C.S. et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89:2679-2683; Huang, H.V. et al. (1993) 米国特許第 5 2 1 7 8 7 9 号; Huang, M. and Sommers, J. (1991) J. Virol. 65:5435-5439を参照されたい)。また、単純ヘルペスウイルス 1 型 (H S V - 1) も利用できる。野生型 H S V - 1 は、ヒト向神経性ウイルスであり、神経系への遺伝子移入のためのベクターとして特に好適である。しかし、非溶菌性組換え H S V - 1 は宿主範囲が広い。組換え H S V - 1 ウイルスは初期遺伝子の 1 つを欠失させることにより複製欠陥とすることができる。

10

20

30

40

50

【0071】

レトロウイルス、例えばマウス白血病ウイルスは、一本鎖 RNA ウイルスであり、臨床および研究分野で一般に用いられている。レトロウイルス遺伝子送達の主な利点は、それらが安定に標的細胞に組み込まれることである。レンチウイルス、例えば、ヒト免疫不全ウイルス (H I V) はレトロウイルスファミリーに属し、代替として用いられてきた。というのはレンチウイルスベクターは非分裂細胞と分裂細胞の両方に感染することができ、高い効率で組み込まれるからである (Chang LJ, Gay EE, The molecular genetics of lentivirus vectors--current and future perspectives, Curr Gene Ther. 2001 Sep; 1(3): 237-51)。レトロウイルスは、s RNA を伝達するのにも利用できる。

【0072】

AAV における発現のために、ポリヌクレオチドは AAV 発現ベクターにクローニングされる。組換え AAV 粒子の産生のため、293 細胞はアデノウイルス 5 型によって感染される; 4 時間後、感染した細胞を、AAV 発現プラスミド - オリゴヌクレオチド DNA コンストラクトおよび AAV ヘルパープラスミド、p A A V / A d で共 - トランスフェクトする (Samulski et al., (1989) J. Virol. 63:3822-3828)。組換え AAV が産生されると、293 細胞は細胞病態となり、形態が丸くなり、組織培養表面に接着する能力を失う。最大の細胞病態への発達後、上清を回収し、必要であれば、濃縮する (Halbert et al. 1997. J. Virol. 71:5932-5941)。

【0073】

ワクシニアウイルス発現のために、複製能力のあるワクシニアウイルスを利用できる。ポリヌクレオチドはワクシニアウイルスプロモーター、例えば、P 1 1 に作動可能に連結される。好ましくは、ワクシニアウイルス株 M V A を用いる。というのは、それは組換え遺伝子を発現するが、それを多くの哺乳類細胞において複製能力のないものに変える欠失を含むからである。それゆえ、ポリヌクレオチドは標的宿主哺乳類細胞において、ワクシニアウイルス誘導性細胞病理を引き起こすことなく発現される。組換えワクシニアウイルスはニワトリ胚線維芽細胞 (C E F) をワクシニアで感染し、ワクシニアプロモーター、例えば P 1 1 と機能的に連結し、ゲノム配列には含まれた本発明のポリヌクレオチドおよびマーカー遺伝子 (ベータ・ガラクトシダーゼ) がライゲーションされたトランスファーベ

クターを共 - トランスフェクトすることによって産生される。このコンストラクトをワクシニアゲノムに相動的組換えによって挿入する。組換えウイルスは X - g a l によるベータ・ガラクトシダーゼ発現についてのインサイチュ染色によって同定できる (Wyatt et al. (1995) Virology 210:202-205)。

【 0 0 7 4 】

さらなるベクター系には、自己相補的一本鎖 R N A をコードする D N A または R N A 自体の患者への導入を促進する非 - ウイルス系が含まれる。例えば、所望の配列をコードする D N A ベクターをインビボでリポフェクションによって導入しても良い。リポソーム媒介トランスフェクションの難点を解消するために設計された合成カチオン性脂質を用いてマーカをコードする遺伝子のインビボトランスフェクションのためのリポソームを調製してもよい (Felgner, et. al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7) ; Mackey, et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8027-31; Ulmer, et al. (1993) Science 259:1745-8を参照されたい)。カチオン性脂質の使用は負に荷電した核酸の封入を促進し、また、負に荷電した細胞膜との融合も促進する (Felgner and Ringold, (1989) Nature 337:387-8)。核酸の伝達に特に有用な脂質化合物および組成物は国際特許出願第 W O 9 5 / 1 8 8 6 3 号および第 W O 9 6 / 1 7 8 2 3 号、そして米国特許第 5 4 5 9 1 2 7 号に記載されている。外来遺伝子を特定の器官にインビボで導入するリポフェクションの使用は特定の利点を有し、トランスフェクションを特定の細胞型に向けることは細胞が不均一である組織、例えば、脾臓、肝臓、腎臓、および脳において特に有用である。脂質は標的化の目的でその他の分子に化学的に結合させてもよい。標的化ペプチド、例えば、ホルモンまたは神経伝達物質、およびタンパク質、例えば、抗体、または非 - ペプチド分子をリポソームに化学的に結合させてもよい。その他の分子も核酸のインビボトランスフェクションを促進するのに有用である。例えば、カチオン性オリゴペプチド (例えば、国際特許出願 W O 9 5 / 2 1 9 3 1 号)、D N A 結合タンパク質由来のペプチド (例えば、国際特許出願 W O 9 6 / 2 5 5 0 8 号)、またはカチオン性ポリマー (例えば、国際特許出願第 W O 9 5 / 2 1 9 3 1 号)。

10

20

【 0 0 7 5 】

本発明の実施に使用されるより好適なウイルスベクターは E 1 - 欠失アデノウイルスベクターであり、E 1、E 2 A 欠失ベクターが最も好ましい。より好ましいアデノウイルスベクターには、E 1 - 欠失アデノウイルス血清型 5 ベクターが含まれ、E 1、E 2 A 欠失ベクターが最も好ましい。ベクターはその他のアデノウイルス血清型およびベクター骨格から欠失したウイルスタンパク質に対する配列を含む対応するパッケージング細胞から調製してもよい。最も好ましいアデノウイルスベクター / パッケージング細胞の組み合わせは、パッケージング細胞とベクターとがオーバーラップするアデノウイルス配列を含まないものであり、ここでオーバーラップは複製能力のあるアデノウイルス粒子の産生の統計的可能性を提供する。かかるベクターの産生において有用な好ましいパッケージング細胞には 2 9 3 および 9 1 1 細胞が含まれ、最も好ましい細胞は P E R . C 6 細胞系である。修飾された P E R . C 6 / E 2 A 細胞系は、非 - オーバーラップ・アデノウイルス E 1、E 2 A 配列を備え、E 1、E 2 A 欠失アデノウイルスベクターコンストラクトを補完する特別の態様であり、本発明の実施にもっとも好ましい。

30

40

【 0 0 7 6 】

本明細書に記載する本発明のベクターは、宿主細胞または対象において R N A または R N A から翻訳されるタンパク質の量を低下させる方法においても有用であり、該方法は、該細胞または対象をポリヌクレオチドをコードするベクターでトランスフェクトする工程を含み、該ポリヌクレオチドは第一の配列に作動可能に連結したプロモーターを含み、第一の配列は約 1 7 から約 2 3 ヌクレオチドからなり該宿主細胞または対象における m R N A 配列の約 1 7 から約 2 3 ヌクレオチドに相補的であり、該第一の配列はループ構造を形成することができる第二の配列に共有結合により連結する。本発明による好適なベクターは、上記の第一のヌクレオチド配列、およびステムループ構造を形成することができ、それによって第一の配列および第三の配列における全てのヌクレオチドが互いに塩基対を形成

50

することができる第二のヌクレオチド配列、およびそれに共有結合により連結した第三のヌクレオチド配列を含み、ここで該第二のヌクレオチド配列は、mRNA以外のRNA分子においてみられる天然のRNA配列、例えばtRNA、snRNA、rRNA、mtRNA、または構造的RNA配列由来のステムループ形成領域を含む。好ましいステムループ配列はlet-7ヌクレオチド配列、またはその部分、あるいはそれに基づく人工的に作成されたポリヌクレオチド配列由来のものである。上記ベクターの対象への投与は、該トランスフェクトされた細胞または該対象における該RNAの量を低下させるのに有効な量のベクターの投与を含む。

【0077】

自己相補的ポリヌクレオチドの配列に作動可能に連結されたプロモーターを含むポリヌクレオチドを含む本発明の好ましいベクターは、自己相補的ポリヌクレオチドを変性させ、その結果得られた変性したポリヌクレオチドを二本鎖ポリヌクレオチドに変換し、そして二本鎖ポリヌクレオチドを宿主細胞をトランスフェクトすることができ、該ポリヌクレオチドを転写することができるベクターにライゲーションすることによって調製される。あるいは、自己相補的ポリヌクレオチドは、互いにアニーリングすることができる2つの一本鎖ポリヌクレオチドとして化学合成し、その後ベクターにライゲーションすることによっても得られる。ライゲーションは、好ましくはアダプタープラスミドへ行い、これはトランスフェクト可能なウイルスベクター粒子をパッケージング細胞系においてヘルパー分子と共にトランスフェクションすることによって形成するのに用いられる。

【0078】

自己相補的ポリヌクレオチドをコードするベクターコンストラクトのさらなる態様は、該第二のヌクレオチド配列が少なくとも1つの酵素によって切断されうるヌクレオチド配列を含む。より好ましい態様は、少なくとも2つの酵素切断部位を有する第二の配列を含む。この態様において、長さはどの程度でも良い該第二の配列は、酵素による切断によって除去されることができ、ステムループ配列によって置換される。さらなる態様において第二のヌクレオチド配列は、ステムループ配列のベクターへのクローニングを容易にするのに有用な遺伝子をコードする。さらに特別の態様において、ステムループ配列のベクターへのクローニングを容易にするのに有用な遺伝子は大腸菌ccdB致死遺伝子である。

【0079】

本発明のベクターは様々な方法によって患者に投与することができる。それらは直接標的組織に添加しても良く、カチオン性脂質との複合体にしても良く、リボソーム中にパッケージングしても良く、当該技術分野で公知のその他の方法によって標的細胞に送達しても良い。所望の組織への局所投与はカテーテル、注入ポンプまたはステントによって行うことができ、自己相補的ポリヌクレオチドをバイオポリマーに導入してもしなくてもよい。送達の別の経路には、静脈内注射、筋肉内注射、皮下注射、エアロゾル吸引、経口（錠剤または丸剤形態）、局所的、全身的、眼内、腹腔内および/またはくも膜下腔内送達が含まれるがそれらに限定されない。

【0080】

好ましくは、本発明の遺伝子治療方法に用いられるウイルスベクターは複製欠損のものである。かかる複製欠損ベクターは通常感染した細胞におけるウイルスの複製に必要な少なくとも1つの領域を欠いている。これら領域は除去されたものでも良く（全体または部分）、当業者に周知の技術によって非機能性に変えられたものでもよい。かかる技術には、完全な除去、置換、部分的欠失または（複製のための）必須領域への1または複数の塩基の付加が挙げられる。かかる技術は遺伝子操作技術または変異原による処理を用いて、インビトロで行っても良く（単離DNAに対して）またはインサイチュで行っても良い。好ましくは、複製欠損ウイルスはウイルス粒子のキャプシド形成に必要なそのゲノムの配列を保持したものである。

【0081】

本発明の特定の態様では、レトロウイルスベクター系を用いる。レトロウイルスは、分裂細胞に感染するウイルスを組み込んでおり、その構築は当該技術分野で公知である。レト

10

20

30

40

50

ロウイルスベクターは様々なタイプのレトロウイルスから構築できる。例えば、M o M u L V (「マウスモロニー白血病ウイルス」)、M S V (「マウスモロニー肉腫ウイルス」)、H a S V (「ハーベイ肉腫ウイルス」); S N V (「脾臓壊死ウイルス」); R S V (「ラウス肉腫ウイルス」)およびフロイントウイルス。レンチウイルスベクター系、例えば、ヒト免疫不全ウイルス (H I V) またはウマレンチウイルスも本発明の実施に用いることができる。

【0082】

本発明の別の態様において、アデノ - 随伴ウイルス (「A A V」) が用いられる。A A V ウイルスは比較的小さなサイズで、感染した細胞のゲノムに安定かつ部位特異的に組み込まれる D N A ウイルスである。それらは細胞成長、形態または分化に影響を与えることなく広範な細胞に感染することができ、ヒトの疾患には関与していないようである。

10

【0083】

D N A ベクターをインビボで裸の (naked) D N A プラスミドとして導入することも可能である (米国特許第 5 6 9 3 6 2 2 号、5 5 8 9 4 6 6 号および 5 5 8 0 8 5 9 号を参照されたい)。遺伝子治療用の裸の D N A ベクターは、当該技術分野で公知の方法、例えば、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、形質導入、細胞融合、D E A E デキストラン、リン酸カルシウム沈降、遺伝子銃の使用、または D N A ベクタートランスポーターの使用により所望の宿主細胞に導入するとよい (例えば、Wilson, et al. (1992) J. Biol. Chem. 267:963-7; Wu and Wu, (1988) J. Biol. C hem. 263:14621-4; Hartmut, et al. 1 9 9 0 年 3 月 1 5 日出願カナダ特許出願第 2 0 1 2 3 1 1 号; Williams, et al (1991). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2726-30を参照されたい)。受容体 - 媒介 D N A 送達アプローチを用いることもできる (Curriel, et al. (1992) Hum. Gene Ther. 3:147-54; Wu and Wu, (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-32)。

20

【0084】

本発明は、特別の態様において、特定のポリペプチドまたは特定の非コード R N A 分子の発現を下方制御または阻害するのに用いられる自己相補的ポリヌクレオチドを含む組成物に関する。1つの好適な態様において、核酸はステムループ R N A 配列によって共有結合により連結した自己相補的 s R N A 分子をコードする。この態様において、核酸は核酸配列の発現を可能にするシグナルに作動可能に連結され、好ましくは、いったん細胞にベクターが導入されるとポリ核酸を発現する組換えベクターコンストラクトを用いて細胞に導入される。好適なベクターの例には、プラスミド、アデノウイルス、アデノ - 随伴ウイルス、レトロウイルスおよびヘルペスウイルスが含まれる。

30

【0085】

本発明は、本発明のポリヌクレオチドおよび/またはベクターを含む生体適合性の組成物を提供する。生体適合性の組成物は、固体、液体、ゲルまたはその他の形態の組成物であってよく、その中に本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、または抗体が活性形態で維持されている。活性形態とは例えば、生物活性を発揮することができる形態である。例えば、核酸は複製され、転写され、メッセンジャーへと翻訳され、あるいは相補的核酸とハイブリダイズできるものである; ベクターは、標的細胞をトランスフェクトできるものである。好適な生体適合性の組成物は、水溶液であり、例えば、T r i s、リン酸、または H E P E S バッファーによって緩衝されたものであり、塩イオンを含む。通常、塩イオン濃度は、生理レベル程度とする。生体適合性の溶液は、安定化剤および保存料を含んでいてもよい。より好適な態様において、生体適合性の組成物は、医薬上許容される組成物である。

40

【0086】

かかる組成物は、局所的、経口、非経口、鼻腔内、皮下、および眼内経路による投与用に製剤すればよい。非経口投与には、静脈内注射、筋肉内注射、および動脈内注射または注入技術が含まれる。組成物は非経口的に、標準的な周知の非毒性の生理的に許容される担体、賦形剤および媒体を所望により含む単位用量製剤において投与しても良い。

50

【 0 0 8 7 】

経口投与用の医薬組成物は、経口投与に好適な用量において当該技術分野で周知の医薬上許容される担体を用いて製剤すればよい。かかる担体によって、医薬組成物は、錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル、液剤、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁剤などに製剤され、患者によって摂取される。経口用の医薬組成物は、活性の化合物を固体賦形剤と混合することによって調製でき、所望によりその結果得られる混合物を粉碎し、顆粒混合物を処理し、所望により好適な補助剤を添加した後、錠剤または糖衣錠コアが得られる。好適な賦形剤には、炭水化物またはタンパク質増量剤、例えば糖類、例えばラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトール；トウモロコシ、小麦、米、ジャガイモ、またはその他の植物からのデンプン；セルロース、例えば、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、またはナトリウムカルボキシメチルセルロース；アラビアゴムおよびトラガカンを含むゴム類；およびタンパク質、例えばゼラチンおよびコラーゲンが含まれる。所望により、崩壊剤または可溶化剤を添加してもよく、例えば、架橋したポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸、またはその塩、例えばアルギン酸ナトリウムが挙げられる。糖衣錠コアを濃厚糖溶液などの好適なコーティングと組み合わせて用いてもよく、これはまた、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカー溶液、および好適な有機溶媒または溶媒混合物を含んでいても良い。色素または染料を錠剤または糖衣錠コーティングに添加して、産物の同定または活性化合物の量、即ち用量を決定するのに用いてもよい。

10

20

【 0 0 8 8 】

経口的に用いられる医薬製剤にはゼラチン製のプッシュ・フィットカプセル、軟カプセル、ゼラチンおよびコーティング製の密封カプセルが含まれ、コーティングは例えばグリセロールまたはソルビトールである。プッシュ・フィットカプセルは、活性成分と混合して増量剤または結合剤、例えば、ラクトースまたはデンプン、滑沢剤、例えばタルクまたはステアリン酸マグネシウム、そして所望により安定化剤を含んでいても良い。軟カプセルにおいて、活性の化合物は好適な液体、例えば、脂肪油、液体、または液体ポリエチレングリコールに溶解または懸濁すればよく、安定化剤を用いても用いなくてもよい。

【 0 0 8 9 】

好適な無菌注射可能製剤は、非毒性の非経口的に許容される溶媒または希釈剤中の溶液または懸濁液とすればよい。医薬上許容される担体の例には、生理食塩水、緩衝食塩水、等張食塩水（例えば、リン酸一ナトリウムまたは二ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウムまたは塩化マグネシウム、またはかかる塩類の混合物）、リンゲル液、デキストロース、水、滅菌水、グリセロール、エタノール、およびそれらの組み合わせが挙げられる。1, 3 - ブタンジオールおよび無菌不揮発性油は便宜に溶媒または懸濁媒体として用いられる。あらゆる銘柄の不揮発性油を用いることができ、合成モノ - またはジ - グリセリドが挙げられる。脂肪酸、例えば、オレイン酸も注射可能製剤に用いられる。

30

【 0 0 9 0 】

組成物媒体は生体適合性または非細胞毒性のホモ - またはヘテロ - ポリマーから調製されるヒドロゲルとしてもよく、例えば、親水性ポリアクリル酸ポリマーが挙げられ、これは薬剤を吸収するスポンジとして作用する。これらのうちいくらか、例えば特に、エチレンおよび/またはプロピレンオキシドからえら得るものは市販されている。ヒドロゲルは、例えば外科処置の間に処置されるべき組織の表面に直接付着させてもよい。

40

【 0 0 9 1 】

本発明の好適な医薬組成物は、複製欠損組換えウイルスベクターおよび本発明により同定されるポリヌクレオチドを含む。本発明の組成物の特別の態様は、トランスフェクションエンハンサー、例えばポロキサマー（poloxamer）を含む。ポロキサマーの例は市販のポロキサマー 407（BASF、Parsippany, NJ）であり、これは非毒性、生体適合性のポリオールである。組換えウイルスを組み入れられたポロキサマーは例えば外科処置の間に処置

50

されるべき組織の表面に直接付着させてもよい。ポロキサマーはヒドロゲルと実質的に同じ利点を有するが、粘度が低い。

【0092】

本発明による製剤は処置される特定の症状に必要な複数の活性の化合物を含んでいても良く、好ましくは互いに悪影響を及ぼさずに補完的活性を有するものである。その代わりに、またはそれに加えて、組成物は細胞毒性剤、サイトカインまたは成長阻害剤を含んでいても良い。かかる分子は所望の目的に有効な量組み合わせ好適に存在する。インビボ投与に用いられる製剤は無菌でなければならない。これは無菌ろ過膜によるろ過によって簡単に達成される。

【0093】

本発明の活性成分は調製したマイクロカプセルに封入してもよく、例えば界面重合によって、例えばヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン - マイクロカプセルおよびポリ - (メチルメタクリレート) マイクロカプセルに封入してもよく、コロイド性ドラッグデリバリーシステム (例えば、リポソーム、アルブミン微粒子、微小乳濁液、ナノ - 粒子およびナノカプセル) またはマクロ乳濁液としてもよい。かかる技術はRemington's Pharmaceutical Sciences (1980) 16th edition、Osol、A. Ed.に開示されている。

【0094】

徐放製剤を調製してもよい。好適な徐放製剤の例には、抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが含まれ、該マトリックスは造形品の形態、例えば、フィルム、またはマイクロカプセルである。徐放マトリックスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル (例えば、ポリ (2 - ヒドロキシエチル - メタクリレート)、またはポリ (ビニルアルコール))、ポリラクチド (米国特許第3773919号)、L - グルタミン酸とガンマ - エチル - L - グルタミン酸のコポリマー、非分解性エチレン - 酢酸ビニル、分解性乳酸 - グリコール酸コポリマー、例えば、LUPRON DEPOT (商標) (注射可能微粒子であって、乳酸 - グリコール酸コポリマーと酢酸ロイプロリドから構成される)、およびポリ - D - (-) - 3 - ヒドロキシ酪酸が挙げられる。ポリマー、例えばエチレン - 酢酸ビニルおよび乳酸 - グリコール酸は、100日以上にわたる分子の放出を可能にするが、特定のヒドロゲルはより短い期間にわたってタンパク質を放出する。

【0095】

本発明は、ヒトまたはその他の動物に有効量の本発明の組成物を投与することを含む治療方法を提供する。治療上有効な用量は、兆候または症状を寛解させる本発明のポリヌクレオチドの量をさす。かかる化合物の治療効率および毒性は標準的医薬手段によって細胞培養または実験動物において決定できる。例えば、ED50 (集団の50%に治療上有効な用量) およびLD50 (集団の50%を致死させる用量) である。治療効果に対する毒性の用量比は治療指標であり、比、LD50 / ED50として表される。大きい治療指標を示す医薬組成物が好ましい。細胞培養アッセイおよび動物実験から得られるデータを用いてヒト用の用量範囲を処方すればよい。かかる化合物の用量は好ましくはED50を含み毒性が無いかかわりである循環濃度の範囲内である。用量は用いる剤形、患者の感受性および投与経路に依存してこの範囲内を変動する。

【0096】

本発明のあらゆるポリヌクレオチドについて、治療上有効な用量はまず細胞培養アッセイまたは動物モデル、通常はマウス、ウサギ、イヌ、またはブタによって見積もられる。動物モデルを用いて所望の濃度範囲および投与経路が達成される。かかる情報を用いてヒトにおいて有効な用量および投与経路が決定される。正確な用量はそれぞれの医師によって治療される患者を考慮して選択される。用量および投与は、活性部分の十分なレベルを提供するように、または所望の効果を維持するために調整される。考慮されるさらなる因子には、疾患状態の重篤度、患者の年齢、体重および性別; 食事、所望の治療期間、投与方法、投与の時期と頻度、薬剤の組み合わせ、反応感受性、および治療に対する寛容性 / 耐性が挙げられる。長期作用性の医薬組成物は、3から4日に1回、週1回、または2週間に1回、特定の製剤の半減期およびクリアランス速度に応じて決めると良い。

10

20

30

40

50

【0097】

上記のように、組換えウイルスを用いて自己相補的一本鎖ポリヌクレオチド、および自己相補的一本鎖RNAをコードするDNAを導入することができる。本発明による組換えウイルスは一般に約 10^4 から約 10^{14} pfuの用量の形態において処方および投与される。AAVおよびアデノウイルスの場合、約 10^6 から約 10^{11} pfuの用量が好適に用いられる。pfuという語（「プラーク形成単位」）はウイルス粒子の懸濁液の感染力に対応し、適当な細胞培養を感染し、形成されたプラークの数を測定することにより決定される。ウイルス溶液のpfuタイターの決定の技術は従来技術によく記載されている。

【0098】

本発明による自己相補的ポリヌクレオチドは医薬上許容される担体中で投与すればよい。10
用量レベルは測定した治療効力に基づいて調整すればよい。

【0099】

別の態様において、自己相補的ポリヌクレオチドを合成し、化学修飾して細胞内ヌクレアーゼによる分解に対して耐性にしても良い。合成オリゴヌクレオチドはリボソームを用いて細胞に導入することができる。細胞への取り込みは、オリゴヌクレオチドがリボソームに封入された場合おこる。効率的な送達系を用いると、低毒性、非毒性濃度のポリヌクレオチド分子を用いて標的RNAを分解することができる。さらに、細胞-特異的結合部位と結合させたりリボソームによってポリヌクレオチドを特定の組織に向けることができる。

【0100】

本発明の別の態様において、ポリヌクレオチドベクターは標的組織に本発明のベクター送達系のいずれかを用いて移入される。この移入はエキソピボで、研究室において核酸が細胞に移入される手段を用いて、改変された細胞が次いでヒトまたはその他の動物に投与される方法で行ってもよいし、インピボでヒトまたはその他の動物中の細胞に核酸が直接移入される方法で行っても良い。好適な態様において、アデノウイルスベクター系を用いて発現ベクターを送達する。所望の場合、組織特異的プロモーターを上記の発現ベクターにおいて用いる。20

【0101】

非-ウイルスベクターを当該技術分野で公知の方法を用いて細胞に移入してもよく、かかる方法にはリン酸カルシウム共沈、リポフェクション（合成アニオン性およびカチオン性リボソーム）、受容体-媒介遺伝子送達、裸のDNA注入、エレクトロポレーションおよび遺伝子銃（bio-ballistic）または粒子加速が挙げられる。30

【0102】

本発明は、薬剤標的のインビトロ確認、細胞アッセイにおける遺伝子のノックダウンによる新規薬剤標的のスクリーニング、および動物実験において治療発展のインピボ標的確認のために用いることができる。

【0103】

本発明はまた、機能が未知または既知のRNAを標的化するガイド核酸のハイスループット送達および宿主における発現のための方法および組成物に関する。記載された方法は、宿主においてガイド核酸を含む自己相補的RNA分子を発現するアデノウイルスベクターで宿主を感染させ、標的RNA核酸のノックダウンによって宿主において誘導された表現型の変化を同定し、それによって標的核酸によってコードされる産物の機能を割り当てるものである。この方法は完全に自動化でき、複数ウェル形式で行って便利なサンプル核酸ライブラリーのハイスループット分析を行うことができ、ここでサンプルはこの方法において使用されるガイド配列をコードする。40

【0104】

本発明を用いてベクターのライブラリーを調製することができ、これは実質的に本明細書に記載するポリヌクレオチドのコンストラクトからなる。かかるライブラリーは区画化された単一の要素として調製してもよく、別々の要素として調製してもよい。ここでそれぞれの要素は実質的に特有のヌクレオチド配列をコードするベクターからなる。あるいは、ベクターのプールを含むライブラリーを調製してもよい。50

【0105】

ライブラリーを用いて、該ライブラリーのそれぞれの区画に属する特有のポリヌクレオチドを含む宿主細胞のRNA分子の機能の解明に役立てても良い。言い換えれば、天然のポリヌクレオチド配列の機能の決定であり、これは宿主細胞を本発明によるベクターでトランスフェクトすることを含み、該ベクターは該天然のポリヌクレオチドの部分に相補的なポリヌクレオチド配列を含み、そして細胞表現型の変化を検出することを含む。ライブラリーにおけるそれぞれのベクターを1または複数の細胞に導入し、タンパク質発現の変化、または表現型の変化を観察する。ベクターはプラスミド、裸のRNAを含んでいて良く、あるいはウイルスベクターコンストラクト中に含まれていても良い。あるいは、複数のガイド配列を導入しうる複数のベクターを単一の宿主細胞に導入することができる。好ましいウイルスベクターには、アデノウイルス、レトロウイルスおよびAAV-ベクターが含まれる。より好ましいのはアデノウイルスベクターであり、もっとも好ましいのはアデノウイルスベクターであって、複製欠損コンストラクトを含み、ベクター自体に含まれる配列に対して相補的な配列を有するパッケージング細胞において増殖するものである。

10

【0106】

本発明はウイルス産生の間のタンパク質、例えば致死タンパク質の一時的なノックダウンを提供し、それによって致死タンパク質をコードする配列を含むウイルスの複製とパッケージングが可能となる。sRNAを用いてあらゆるウイルスおよびウイルスパッケージング細胞系におけるウイルス産生の間の遺伝子発現がノックダウンできる。したがって、本発明は毒性タンパク質をコードするウイルスベクターの産生方法に関し、これは以下の工程を含む：

20

- (a) 細胞に本明細書に記載する、該毒性タンパク質をコードするmRNAに相補的な第一の配列を有するポリヌクレオチド配列を導入する工程、
- (b) 該ウイルスベクターを該細胞に導入する工程、
- (c) 該細胞を該ポリヌクレオチド配列の発現および該ウイルスベクターの複製を可能とする条件下で培養する工程、および
- (d) 該ウイルスベクターを回収する工程。

【0107】

本発明の好適な方法は、該ポリヌクレオチドを安定にトランスフェクトされたウイルスパッケージング細胞を用いる。

30

【0108】

アデノウイルス、レトロウイルスまたはアルファウイルスを用いたウイルス産生はかかるノックダウン方法により恩恵を受け、パッケージング細胞の例には、アデノウイルスパッケージング細胞、例えば、PER.C6細胞、およびその誘導体、HEK293細胞、とりわけ293および911細胞が含まれる。さらに、sRNAノックダウン方法は、組換えタンパク質産生の向上に有用である。かかるタンパク質産生方法は、異種性タンパク質発現の下方調節によって恩恵を受け、その後タンパク質産生のための最適な産生細胞のタイターが達成される。

【0109】

本発明は最適化の必要なくしてあらゆるウイルスパッケージングおよびタンパク質産生系に適用できる。本明細書に記載するノックダウンコンストラクトは、いかなる選択されたパッケージング細胞にトランスフェクトしてもよく、かかるトランスフェクトされた細胞を直接用いることができる。本発明はウイルスコンストラクトを用い、これは直接細胞の感染に用いられ、ウイルスまたはタンパク質産生を誘導する系にはさらなる化合物は要求されない。

40

【0110】

外来遺伝子の発現に用いられる転写開始点から発現カセットの5'末端の間の配列を用いてウイルス産生の間にかかる外来遺伝子の発現をノックダウンすることができる。本発明のポリヌクレオチドは、転写開始点から発現カセットの5'末端の間の配列を標的とするガイド配列を含み、毒性タンパク質に対する配列を担持するウイルスプラスミドとともに

50

パッケージング細胞に共 - トランスフェクトされる。あるいは、翻訳の阻害または m R N A の分解により標的配列の発現を下方調節するポリヌクレオチドをコードする本発明によるベクターが用いられる。ベクターは一過性に用いてもよいし、パッケージング細胞系の安定な誘導体を作成するのに用いてもよい。

【 0 1 1 1 】

本発明の様々な側面を以下の非限定的な実施例によりさらに詳細に説明する。

【 実施例 1 】

【 0 1 1 2 】

抑制のモニターのための l e t - 7 標的配列に基づくレポーターアッセイ系

実施例 1 は、簡単にアッセイされる遺伝子のノックダウンを測定する方法を提供するレポーターアッセイ系の開発について記載する。この系を用いて s i R N A とキメラ R N A が簡単にアッセイされるルシフェラーゼ遺伝子の発現を減少させることができるか否か判定した。この系は 2 つの成分からなる。第一の成分は、p G L 3 ルシフェラーゼレポーターベクターに基づくレポーター D N A 分子 (Promega から入手) であり、染色体 2 2 にみられるヒト l e t - 7 配列由来の l e t - 7 標的配列を含むように改変されている。かかるレポーターコンストラクトは以下のように設計した：「 p 」で始まる名前はコンストラクトがプラスミドにおけるものであることを意味し、レポーター遺伝子の名前が後に続き (例えば G L 3 または G L 2) 、その後の「 t 」で始まる標的配列はそれが標的配列であることを示す。例えば：p G L 3 - t L e t 7 は、レポーターとして G L 3 遺伝子を含み、ノックダウン R N A に対する標的として L e t 7 配列を含むプラスミドを意味する。第二の成分は、s i R N A あるいは s i R N A またはキメラ R N A を発現するプラスミドである。s i R N A は、約 2 3 ヌクレオチド長以下の二本鎖低分子干渉 R N A 分子である。本明細書において用いるキメラ R N A は、同じまたは異なる種由来のいずれでもよい少なくとも 2 種類の R N A 分子由来であり、互いに共有結合により連結した少なくとも 2 つのポリヌクレオチド配列から構築された R N A 分子である。科学文献には s i R N A は標的 m R N A の配列特異的分解を媒介すると記載されている。本出願においてこれら s i R N A は以下のように設計した：s i R N A の後、標的遺伝子の名前を続ける。例えば s i R N A G L 3 . 1 は G L 3 遺伝子を標的とする二本鎖 s i R N A である。本実施例において、レポーターコンストラクト、s i R N A 、およびルシフェラーゼ活性を標準化するために使用する内部コントロール (Renilla : p R L - T K) を混合して用いて宿主細胞をトランスフェクトし、ルシフェラーゼ活性を測定した。s i R N A がルシフェラーゼ m R N A の発現をノックダウンしていたら、ルシフェラーゼ活性のコントロールに対する低下が観察される。レポーター系を以下に記載する。この記載は例示的なものであり、本発明を限定するものではない。

【 0 1 1 3 】

レポーター系は p G L 3 ルシフェラーゼレポーターベクター (Promega) に基づくものとした。l e t - 7 標的 D N A 配列 (5 ' -ACTATACAACCTACTACCTCA-3 ' 配列番号 1) を p G L 3 - レポーターベクターの G L 3 コード領域のすぐ外側に導入し、それが l e t - 7 標的配列を含む G L 3 m R N A を発現するようにした。

【 0 1 1 4 】

A . p G L 3 - t L e t - 7 レポーターコンストラクトの構築

p G L 3 - コントロールベクター (GenBank 登録番号 U 4 7 2 9 6) を G L 3 コード配列のすぐ 3 ' 末端側のその特有の X b a I 部位において直鎖化した。二本鎖 l e t - 7 標的 D N A 配列を相補的 D N A オリゴヌクレオチド (オリゴ 1 およびオリゴ 2) を用いて作成した。p G L 3 の X b a I 部位へのクローニングを容易にするために、オリゴ 1 とオリゴ 2 を、アニーリングした際に、作成された二本鎖 l e t - 7 標的 D N A がそのそれぞれの末端に 5 ' オーバーハングを有し、X b a I 制限部位と適合するように設計した。オリゴ 1 とオリゴ 2 とのアニーリングは、これらオリゴを等モル量混合し、最終濃度がアニーリングバッファー [1 0 m M T r i s - H C l (p H 7 . 9) 、 1 0 m M M g C l ₂ 、 5 0 m M N a C l] 中、0 . 5 n m o l e / μ l となるようにし、その後混合物を 9

10

20

30

40

50

0 で1分、37 で60分インキュベーションすることによって行った。アニーリングしたこれらオリゴを直鎖化したpGL3ベクターのXbaI部位にSambrook et alに記載の常套技術を用いてライゲーションした。

【0115】

Let-7 標的DNA配列は、配列番号1である。

5'-ACTATACAACCTACTACCTCA-3'

配列：DNAオリゴ(5'から3')：

オリゴ1：5'-CTAGTACTATACAACCTACTACCTCA-3' (配列番号2)

オリゴ2：5'-CTAGTGAGGTAGTAGGTTGTATAGTA-3' (配列番号3)

【0116】

アニーリングしたオリゴ1と2は以下の二本鎖構造を与える

【化1】

ScaI 部位：(AGTACT)

オリゴ1 5'-CTAGTACTATACAACCTACTACCTCA-3'

||||||||||||||||||||

オリゴ2 3'-ATGATATGTTGGATGATGGAGTGATC-5'

10

【0117】

下線を引いたヌクレオチドは、XbaI適合性末端を示す。これらオリゴのベクターへのクローニングにより、さらなるScaI部位(太字ヌクレオチド)が生じ、これによってインサートを含むクロンの選抜が容易となり、フォワード(F)方向でインサートを含むクロンとリバース(R)方向でインサートを含むクロンの識別が可能となる。元の開始pGL3-コントロールベクターからのXbaI部位は、クローニングプロセスによって破壊され、したがってインサートを含むクロンには存在しない。クロンをインサートの存在について形質転換された細菌に対して直接PCRを行うことによって試験した。以下のプライマーを用いた：

【0118】

オリゴ3：5'-CATCTTCGACGCAGGTGTCGCA-3' (配列番号4) (PromegaカタログおよびU47296配列による位置1668-1689)

オリゴ4：5'-CCATCGTTCAGATCCTTATCGA-3' (配列番号5) (PromegaカタログおよびU47296配列による位置2210-2189)

与えられた位置はpGL3-コントロールベクター(登録番号U47296)に基づく。

【0119】

オリゴ3(配列番号4)およびオリゴ4(配列番号5)をプライマーとし、コロニーDNAを鋳型として用い、インサートを含まないクロンから得たPCR産物は543塩基対であった；インサートをフォワード(F)またはリバース(R)方向で含むPCR産物は569塩基対であった。

【0120】

インサートの方向をさらに第二ラウンドのPCRによって分析した。以下の2つの組み合わせのプライマーを用いた：

1)オリゴ1(配列番号2)およびオリゴ3(配列番号4)：R方向のLet-7標的配列のPCRにより297bpのDNA断片が生じる；F方向ではDNA産物は生じない。

2)オリゴ1(配列番号2)およびオリゴ4(配列番号5)：F方向のLet-7標的配列のPCRにより、302bpのDNA断片が生じる；R方向ではDNA産物は生じない。

【0121】

pGL3のXbaI部位へのフォワード方向でのLet-7標的DNA配列のクローニングの成功により生じるプラスミドはpGL3-tLet-7Fと称する。同様に、pGL

20

30

40

50

3 の X b a I 部位へのリバーズ方向での l e t - 7 標的 D N A 配列のクローニングの成功により生じるプラスミドは p G L 3 - t l e t - 7 R と称する。クローン p G L 3 - t l e t - 7 F と p G L 3 - t l e t - 7 R をともにさらなる実験に用いた。

【 0 1 2 2 】

B . s i R N A

p G L 3 および p G L 2 を標的とする s i R N A (ネガティブコントロールとして用いた ; 登録番号 X 6 5 3 2 4) は、Elbashir et al. (2001) Nature 411:494-498 に記載されている。s i R N A は標的配列とその相補鎖を含む二本鎖 R N A である。2 つのウリジン残基をこれら R N A の 3 ' 末端に付加した。

【 0 1 2 3 】

s i R N A - G L 2 . 1 :

G L 2 標的 D N A 配列

5 ' ..CGTACGCGGAATACTTCGA..3 ' (配列番号 6)

【 化 2 】

siRNA-GL2.1-

センス 5' -CGUACGCGGAAUACUUCGAUU-3' (配列番号 7)

||||||||||||||||

アンチセンス 3' -UUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU-5' (配列番号 8)

10

20

【 0 1 2 4 】

s i R N A - G L 3 . 1 :

G L 3 標的 D N A 配列

5 ' ..CTTACGCTGAGTACTTCGA..3 ' (配列番号 9)

【 化 3 】

siRNA-GL3.1-

センス 5' -CUUACGCUGAGUACUUCGAUU-3' (配列番号 1 0)

||||||||||||||||

アンチセンス 3' -UUGAAUGCGACUCAUGAAGCU-5' (配列番号 1 1)

30

【 0 1 2 5 】

l e t - 7 標的配列を標的とする s i R N A は :

s i R N A - l e t 7 . 1 :

L e t - 7 標的 D N A 配列

5 ' ..TATACAACCTACTACCTCA..3 ' (配列番号 1 2)

【 化 4 】

siRNA-let7.1-

センス 5' -UAUACAACCUACUACCUCAUU-3' (配列番号 1 3)

||||||||||||||||

アンチセンス 3' -UUAUAUGUUGGAUGAUGGAGU-5' (配列番号 1 4)

40

【 0 1 2 6 】

各 R N A オリゴ対を Elbashir et al. (2001) Nature 411:494-498 に記載のようにアニーリングさせて二本鎖 s i R N A を得た。

50

【0127】

C . p G L 3 - レポーターコンストラクトと s i R N A の共 - トランスフェクション
l e t - 7 標的化系を3つの成分からなる D N A / R N A 混合物を宿主細胞にトランスフ
ェクトすることによって試験した (例えば H e L a または P E R . C 6 / E 2 A 細胞) :

1 . ルシフェラーゼに基づくレポーターコンストラクト

a . p G L 3 - コントロール (Promega) 、または、

b . p G L 3 - t L e t - 7 F 、または、

c . p G L 3 - t L e t - 7 R

2 . 標準化のための内部コントロール

a . p R L - T K (Promega ; 登録番号 A F 0 2 5 8 4 6)

3 . 二本鎖 s i R N A

a . s i R N A - G L 3 . 1 、または、

b . s i R N A - l e t - 7 . 1 、または、

c . s i R N A - G L 2 . 1

【0128】

1 日目 :

H e L a または P E R . C 6 / E 2 A 細胞をトランスフェクションの 2 0 時間前に 9 6 -
ウェル形式において $4 . 5 \times 10^4$ 細胞 / $100 \mu\text{l}$ 培地 (H e L a 細胞について D M E
M + 1 0 % 熱不活性化ウシ胎仔血清 ; P E R . C 6 / E 2 A 細胞について D M E M + 1
0 % 非 - 熱不活性化ウシ胎仔血清) / ウェルにて播種した。

【0129】

2 日目 :

ウェル当たり D N A / R N A 混合物を $25 \mu\text{l}$ (総容積) の O p t i M E M 中に調製した
。これは以下を含む :

1 . $0 . 25 \mu\text{g}$ p G L 3 - コントロール、または、

$0 . 25 \mu\text{g}$ p G L 3 - t L e t - 7 F 、または、

$0 . 25 \mu\text{g}$ p G L 3 - t L e t - 7 R

2 . 25ng p R L - T K

3 . $66 . 5 \text{ng}$ s i R N A - G L 3 . 1 、または、

$66 . 5 \text{ng}$ s i R N A - l e t - 7 . 1 、または、

$66 . 5 \text{ng}$ s i R N A - G L 2 . 1 、または

s i R N A 無し

【0130】

L i p o f e c t A M I N E 2 0 0 0 ($0 . 8 \mu\text{l}$) および O p t i M E M ($24 . 2 \mu\text{l}$) を室温で 7 - 1 0 分間インキュベートし、各 D N A / R N A 混合物に添加した。この
混合物 (最終容積 $50 \mu\text{l}$) を室温で 1 5 - 2 5 分間インキュベートし、次いで細胞に添
加し、細胞から培地を除去した。細胞を 3 7 インキュベーターで 1 0 % C O ₂ 下で 4 8
時間インキュベートした。

【0131】

4 日目 :

細胞を収集し、溶解し、ホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼ活性をデュ
アル (Dual) ルシフェラーゼキット (Promega) を用いて製造業者の指示に従って測定し
た。各サンプルのホタルルシフェラーゼ絶対値 (l u c) をその内部ウミシイタケルシフ
ェラーゼ絶対値 (r e n) で割って相対 l u c / r e n - 値を得た。これら相対 l u c /
r e n - 値を s i R N A が含まれていないコントロールサンプルと比較した。

【0132】

P E R . C 6 / E 2 A に対する一過性トランスフェクションの結果を図 1 に示す。これは
P E R . C 6 / E 2 A 細胞における l e t - 7 s i R N A によって l e t - 7 標的配列
を含む p G L 3 - 融合コンストラクトのルシフェラーゼ活性が抑制されたことを示す。 P
E R . C 6 / E 2 A 細胞は、いずれかの方向 (p G L 3 - t L e t - 7 F 、 p G L 3 - t

10

20

30

40

50

10

【 0 1 3 3 】

本実施例は 1 e t - 7 に基づくキメラ RNA の調製について記載し、これらを実施例 1 に記載の系において遺伝子発現をロックダウンする能力について試験した。

20

30

【 0 1 3 7 】

【化 5】

C

40

【化 6】

5'-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAuu-3'

|||||

3'-uuACUCCAUCAUCCAACAUAU-5'

【0139】

さらに、5'および3'延長を有するキメラRNAを作成した。5'および3'延長の配列は隣接するlet-7L RNA配列に基づく：

5'末端：5'-GGCCUUUGGGG..(配列番号16)

3'末端：..CCGUGAAGUCCU-3'(配列番号17)

【0140】

これら延長配列は、Hutvagner et al. (2001) Science 293:834-838による延長と1塩基異なる。これはT7 RNAポリメラーゼの転写効率を向上させるためである。

【0141】

5'および3'延長を有するキメラRNA分子を以下に示す。5'および3'延長を太字で示す。

5'および3'延長を有するキメラRNAのステムループ構造(配列番号18)：

【化7】

5'-**ggc cuuugggg**UGAGGUAGUAGGUUGUAUAguuuggggcucugc

|||||

C

3'-**ccgugaaguccu**ACUCCAUCAUCCAACAUAUcaauagggquaucguc

【0142】

キメラlet-7 siRNAの合成は以下に記載するようにT7 RNAポリメラーゼを用いるキメラRNAのインビトロ転写により行った。ポリメラーゼに対する鋳型はpUC19にクローニングしたDNAであった。

【0143】

pGL3レポーターコンストラクトのsiRNAまたはキメラRNAとの共-トランスフェクション

実施例1に記載したのと同様に、実施例2においても、細胞をDNAとRNAの混合物でトランスフェクトした。RNA成分はループ-RNA型のサンプルも含んでいた。DNA/RNA混合物は以下の成分からなるものとした：

1. ルシフェラーゼに基づくDNAレポーターコンストラクト

a. pGL3-コントロール、または、

b. pGL3-tlet-7F、または、

c. pGL3-tlet-7R

2. 標準化のための内部コントロール

a. pRL-TK

3. アニリングしたRNA

a. 二本鎖siRNA-GL2.1、GL2を標的とするsiRNA(オーバーハングを有する小分子RNA二本鎖)、または、

b. 二本鎖siRNA-GL3.1、GL3を標的とするsiRNA(オーバーハングを有する小分子RNA二本鎖)、または、

c. アニリングしたループRNA-GL3.2、GL3を標的とするループが連結したsiRNA、または、

d. 二本鎖siRNA let7.1、let-7配列を標的とするsiRNA(オーバーハングを有する小分子RNA二本鎖)、または、

e. アニーリングしたループRNA - Let - 7. 2、Let - 7 配列を標的とするループが連結した siRNA。

【0144】

ルシフェラーゼに基づくレポーターコンストラクトおよびRNAを図8に模式的に示す。図9は共-トランスフェクトされたRNAの配列に対応する標的配列を含むレポーターの下方制御を示す。ここでも、実施例1に示したように、siRNA GL3. 1はすべてのレポーターの発現レベルの特異的減少をもたらした。なぜならこれらはすべて標的配列を担持するからである。siRNA Let - 7. 1によってレポーター、pGL3 - t Let 7 FおよびpGL3 - t Let 7 Rの抑制が示されたが、pGL3 - コントロールは抑制されなかった。コントロールsiRNA GL2. 1ではレポーターコンストラクトの有意な抑制は示されなかった。二本鎖領域の間をループで連結しているキメラRNA型、ループRNA GL3. 2およびループRNA Let 7. 2では、個々のRNA鎖からなる対応するsiRNAである、siRNA s GL3. 1およびLet - 7. 1と同様のレポーターの配列特異的減少が示された。結論として、両鎖がループで連結しているRNAは、別々の2つの鎖からなるsiRNAと同様に作用する。

10

【0145】

B. キメラRNA分子をコードするDNA断片の作成

RNAポリメラーゼに対する鋳型は二本鎖DNAである。DNA鋳型をその3'末端において相補的であるオーバーラップするオリゴを用いたPCRによって作成した。これらオリゴを以下に示す。

20

オリゴヌクレオチド：

T7 - pre - h Let 7 L. 3 - F (配列番号19)：

5' -CCGAAGCTTA ATACGACTCA CTATAGGCCT TTGGGGTGAG GTAGTAGGTT GTATAGTTTG GGGCTCTGC C CTGCTATG-3'

Pre - h Let 7 L. 3 - R (配列番号20)：

5' -CGCATGAATT CGCCGGCACT TCAGGTGAG GTAGTAGGTT GTATAGTTAT CCCATAGCAG GGCAGAG-3'

T7 - pre - GL3. 3 - F (配列番号21)：

5' -CCGAAGCTTA ATACGACTCA CTATAGGCCT TTGGGGTCGA AGTACTCAGC GTAAGGTTTG GGGCTCTGC C CTGCTATG-3'

30

Pre - GL3. 3 - R (配列番号22)：

5' -CGCATGAATT CGCCGGCACT TCAGGTGCA AGTACTCAGC GTAAGGTTAT CCCATAGCAG GGCAGAG-3'

【0146】

オリゴヌクレオチド対(T7 - pre - h Let 7 L. 3 - FとPre - h Let 7 L. 3 - R；T7 - pre - GL3. 3 - FとPre - GL3. 3 - R)を1：1モル比で40 μMの50 mM Tris - HCl pH 7. 9、10 mM MgCl₂、100 mM NaClバッファー中で混合した。混合物を95℃で5分間、65℃で3分間インキュベートし、温度を20℃に低下させながら3'末端をゆっくりとアニーリングさせた(30分間)。以下の図において、フォワード(F)オリゴは大文字、リバーズ(R)オリゴは小文字で示す。

40

【0147】

アニーリングしたPre - h Let 7 L. 3オリゴ：

【化8】

5' -...GTATAGTTTG GGGCTCTGCC CTGCTATG-3' (配列番号76)

||||||| |||||||

(配列番号77) 3'-gagacgg gacgataccc tattgatatg...-5'

50

【0148】

アニーリングした Pre - GL 3 . 3 オリゴ :

【化9】

5'-..GTAAGGTTTG GGGCTCTGCC CTGCTATG-3' (配列番号78)

||||||| |||||||

(配列番号79) 3'-gagacgg gacgataccc tattggaatg..-5'

【0149】

アニーリングしたオリゴのうち、2 μ l を、10 mM Tris - HCl pH 7.5、
5 mM MgCl₂、7.5 mM ジチオトレイトール、33 μ M 各 dNTP、20 U D
NA ポリメラーゼ I、ラージ (クレノウ) フラグメントからなる延長混合物 (40 μ l 最
終容積) 中で室温で15分間インキュベートした。

【0150】

アニーリングした Pre - hLet7L . 3 オリゴの延長 :

【化10】

5'-..GTATAGTTTG GGGCTCTGCC CTGCTATGGG ATAA-->

||||||| |||||||

<--ac cccgagacgg gacgataccc tattgatatg..-5'

20

【0151】

アニーリングした Pre - GL 3 . 3 オリゴの延長 :

【化11】

5'-..GTAAGGTTTG GGGCTCTGCC CTGCTATGGG ATAA-->

||||||| |||||||

<--ac cccgagacgg gacgataccc tattggaatg..-5'

30

【0152】

オリゴの延長により作成した DNA 断片の全体を以下に示す。配列は二本鎖 DNA として
示す ; 上側鎖 (大文字) 5' から 3' ; 下側鎖 (小文字) 3' から 5'。T7 プロモータ
ー (nt 9 - 26) ; クローニング部位 : HindIII 部位 (nt 4 - 9) ; EcoRI
部位 (nt 119 - 124) ; 直鎖化のための制限部位 Cac8I または NaeI (nt
113 - 118)。

【化12】

Pre-hLet7L.3:

1 5'-CCGAAGCTTA ATACGACTCA CTATAGGCCT TTGGGGTGAG GTAGTAGGTT GTATAGTTTG
3'-ggcttcgaat tatgctgagt gatataccgga aacccactc catcatccaa catatcaaac

61 GGGCTCTGCC CTGCTATGGG ATAACCTATAC AACCTACTAC CTCACCTGAA GTGCCGGCGA
cccgagacgg gacgataccc tattgatatg ttggatgatg gaggggactt cacggccgct

121 ATTCATGCG-3' (配列番号23)

taagtacgc-5' (配列番号24)

40

50

【化 1 3】

Pre-GL3.3:

1 5'-CCGAAGCTTA ATACGACTCA CTATAGGCCT TTGGGGTCGA AGTACTCAGC GTAAGGTTTG
 3'-ggcttcgaat tatgctgagt gatatccgga aacccagct tcatgagtcg cattccaaac

61 GGGCTCTGCC CTGCTATGGG ATAACCTTAC GCTGAGTACT TCGACCTGAA GTGCCGGCGA
 cccgagacgg gacgataccc tattggaatg cgactcatga agctggactt cacggcogct

121 ATTCATGCG-3' (配列番号 2 5)
 taagtacgc-5' (配列番号 2 6)

10

【0 1 5 3】

C . p U C 1 9 への D N A 断片のクローニング

P C R 産物を H i n d I I I と E c o R I で消化し、公表された方法によって同じ酵素で消化した p U C 1 9 にクローニングした (Sambrook et al.)。

【0 1 5 4】

D . T 7 R N A ポリメラーゼを用いたインビトロ転写

鋳型を C a c 8 I または N a e I で直鎖化し、製造業者の指示に従って T 7 R N A ポリメラーゼ (Promega) によるインビトロ転写に用いた。その後鋳型 D N A を D N a s e (Promega) で、製造業者の指示に従って除去した。

20

【0 1 5 5】

インビトロで合成した R N A を実施例 1 において s i R N A オリゴ - 混合物について用いたのと同じアニーリングプロトコールによって自己 - アニーリングさせた。トランスフェクションを実施例 1 に記載のように行ったが、ただし、自己 - アニーリングした R N A を実施例 1 に用いた s i R N A の代わりに用いた。

【0 1 5 6】

この方法を用いて作成したキメラ R N A の直鎖状配列を、各キメラ R N A についてステム - ループ表示を用いて以下に示す。大文字配列は R N A 中で塩基対形成できる領域であり、この配列の一方が標的配列にアニーリングすることができる；これらの場合、第一の大文字領域である。

30

【0 1 5 7】

次の節において R N A 分子の名前は以下のように構成される：「s」は s i R N A の鎖、「R」は R N A の鎖、そして「h」はヒト配列を意味する。名前に P r e が存在する場合、それは分子が 5' - および 3' - 延長を含むことを意味する。

【0 1 5 8】

s R - h L e t 7 . 2 - a s (ループ R N A L e t 7 . 2)

l e t - 7 s i R N A は l e t - 7 ループにより連結しており、5' - および 3' - 延長を欠く；

40

【化 1 4】

5'-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAAguuuggggcucugcccugcuaugggauaacUAUACAACC
UACUACCUCAuu-3' (配列番号27)

5'-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAAguuuggggcucugc

|||||

c

3'-uuACUCCAUCAUCCAACAUAUcaauaggguaucguc

10

【0159】

s R - G L 3 . 2 - a s (ループRNA GL3 . 2)

GL3 siRNAはlet-7ループにより連結しており、5'-および3'-延長を欠く：

【化15】

5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGAguuuggggcucugcccugcuaugggauaacCUUACGCUGA

GUACUUCGAuu-3' (配列番号28)

5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGAguuuggggcucugc

|||||

c

3'-uuAGCUUCAUGAGUCGCAUUCcaauaggguaucguc

20

【0160】

Pre - h L e t 7 L . 3

let-7 siRNAはlet-7ループにより連結しており5'-および3'-延長を含む：

【化16】

(配列番号18) :

30

5'-**ggccuuugggg**UGAGGUAGUAGGUUGUAUAAguuuggggcucugcccugcuaugggauaa
cUAUACAACCUACUACCUCAuccugaagugcc-3'

5'-**ggccuuugggg**UGAGGUAGUAGGUUGUAUAAguuuggggcucugc

|||||

c

3'-**ccgugaaguccu**ACUCCAUCAUCCAUAUAUcaauaggguaucguc

40

【0161】

Pre - G L 3 . 3

GL3 siRNAはlet-7ループにより連結しており5'-および3'-延長を含む：

【化17】

(配列番号 29)

5' -**ggccuuugggg**UCGAAGUACUCAGCGUAAGguuugggggcucugcccugcuaugggauaa
cCUUACGCUGAGUACUUCGA**uccugaagugcc**-3'

5' -**ggc** uuuuggggUCGAAGUACUCAGCGUAAGguuugggggcucugc
 |||||
 3' -**ccgugaaguccu**AGCUUCAUGAGUCGCAUUCcaauaggguaucguc

10

【0162】

大文字配列はRNA分子中で相補性を有する領域であり、これら配列の一方は標的配列と塩基対形成することができる；これらの場合、第一の大文字領域である。

【0163】

RNA、sR-hLet7.2-asおよびsR-GL3.2-asは化学合成したが、上記方法によっても作成することができる

【0164】

E. 機能的な連結化ループ配列の分析

20

野生型Let-7連結化ループのサイズは30ntである(5'-GUUUGGGGCUCUGCCCUGCUAUGGGUAAC-3') (配列番号75)。

【0165】

理想的には合成オリゴを作成し、それらを発現ベクターにクローニングするのが好ましい(以下を参照)。しかし好ましいオリゴのサイズはオリゴ合成を可能にするには長すぎる。ガイド配列のサイズを劇的に変化させることはできないが、ループ配列は30ntであり短くすることができる(図10および図11を参照)。様々なループ配列を野生型Let-7ループ配列またはその他のマイクロRNAループ配列に基づいて選択した(Lagos-Quintana, M et al. Science (2001) 294: 853、Lau, et al. Science (2001) 294: 858、Lee and Ambros Science (2001) 294: 862)。

30

【0166】

選択したLet-7ループの誘導体はLet-7ループの予測二次フォールディングに基づく。2つの安定なLet-7ループの構造が予測された(以下の配列番号35から41および45を参照されたい)。ループにおける突出した12ヌクレオチドおよび予測GGG/CCCステムは構造2において欠失しており、その結果ループL12となる(配列番号30)(図10および図11も参照されたい)。構造1における予測ステムのUGG/CCUG部分およびループにおける突出したヌクレオチドの欠失の結果ループL11となる(配列番号31)。

【0167】

マイクロRNAの選択したループは、それらがより短く、Let-7RNAと同じ5'-ガイド-ループ-塩基対形成配列-3'の編成を有するために選んだ。リバーズ編成を有するマイクロRNAのループ、5'-塩基対形成配列-ループ-ガイド-3'も同様に機能的であろう。コンストラクトを上記のPCRを用いてGL2ガイド配列に関して合成し、そのGL2レポーターに対するノックダウン効率を実施例3に記載の一過性トランスフェクション実験において測定し、野生型Let-7ループと比較した(図12)。すべてのループがノックダウン効果を示し、それはGL2に対して特異的でありGL3レポーターに対しては効果がなかった。12ヌクレオチドまで短くしたループ配列(例えば、L12)でもGL2レポーターを特異的にノックダウンした。

40

【実施例3】

【0168】

50

発現のための L e t - 7 プロモーター

本実施例は s i R N A を産生する D N A 発現コンストラクトおよび D N A ベクターにおけるヒト l e t - 7 プロモーターおよびヒト l e t - 7 ゲノム配列の同定とクローニングについて記載する。l e t - 7 プロモーターを s i R N A を産生する発現コンストラクトに用いた。しかし、以下に記載のようにその他のプロモーターも同様に用いることができる。

【 0 1 6 9 】

本実施例には以下が含まれる：

- 1 . l e t - 7 ガイド配列をプローブとして用いた D N A データベースサーチの結果；
- 2 . l e t - 7 ゲノムクローンから転写される R N A の予測二次構造；
- 3 . ヒト l e t - 7 プロモーターの単離の説明；
- 4 . ヒト l e t - 7 ゲノムクローンの単離の説明；および、
- 5 . l e t - 7 ゲノムコンストラクトの改変方法。

10

【 0 1 7 0 】

A . L e t - 7 プロモーターのクローニング

l e t - 7 ガイド配列をプローブとして用いた D N A データベースサーチの結果、ヒトゲノム、染色体 9、11、および 22 上で 3 つの完全なマッチ、および染色体 9、21、X、19 および 5 上で 5 つのほぼ完全なマッチが得られた (Pasquinelli et al. (2000) Nature 408:86-89 も参照されたい)：

【 0 1 7 1 】

20

1) > r e f | N T _ 0 1 1 5 2 3 . 4 | H s 2 2 _ 1 1 6 8 0 ヒト染色体 2 2

【 化 1 8 】

クエリー：1 tgaggtagtagggtgtatagt 21 (配列番号 3 2)

|||||

対象： 2667925 tgaggtagtagggtgtatagt 2667905

【 0 1 7 2 】

2) > r e f | N T _ 0 0 9 2 1 5 . 3 | H s 1 1 _ 9 3 7 2 ヒト染色体 1 1

【 化 1 9 】

30

クエリー：1 tgaggtagtagggtgtatagt 21 (配列番号 3 2)

|||||

対象： 1342370 tgaggtagtagggtgtatagt 1342390

【 0 1 7 3 】

3) > r e f | N T _ 0 2 5 8 0 8 . 2 | H s 9 _ 2 5 9 6 4 ヒト染色体 9

【 化 2 0 】

クエリー：1 tgaggtagtagggtgtatagt 21 (配列番号 3 2)

|||||

対象： 77615 tgaggtagtagggtgtatagt 77595

40

【 0 1 7 4 】

4) > r e f | N T _ 0 1 1 5 1 2 . 3 | H s 2 1 _ 1 1 6 6 9 ヒト染色体 2 1

【 化 2 1 】

クエリー： 1 tgaggtagtaggttgtat 18 (配列番号 3 3)

|||||

対象： 3576555 tgaggtagtaggttgtat 3576572

【 0 1 7 5 】

5) > r e f | N T _ 0 1 1 7 9 9 . 5 | H s X _ 1 1 9 5 6 ヒト染色体 X

【 化 2 2 】

クエリー： 1 tgaggtagtaggttgtatagt 21 (配列番号 3 2)

|||||

対象： 278879 tgaggtagtagattgtatagt 278899

10

【 0 1 7 6 】

6) > r e f | N T _ 0 1 1 0 9 1 . 5 | H s 1 9 _ 1 1 2 4 8 ヒト染色体 1 9

【 化 2 3 】

クエリー： 1 tgaggtagtaggttgtatagt 21 (配列番号 3 2)

|||||

対象： 592412 tgaggtaggaggttgtatagt 592432

20

【 0 1 7 7 】

7) > r e f | N T _ 0 2 7 0 2 1 . 1 | H s 5 _ 2 7 1 8 1 ヒト染色体 5

【 化 2 4 】

クエリー： 1 tgaggtagtaggttgta 17 (配列番号 3 4)

|||||

対象： 276711 tgaggtagtaggttgta 276695

30

【 0 1 7 8 】

すべての位置は 1 e t - 7 遺伝子の潜在候補である。これらの位置から R N A 構造が 1 e t - 7 R N A と類似の R N A 二本鎖構造にフォールディングされることが予測された（模式的に以下に示す）。比較のために図 2 において潜在的構造をセグメントに分けて示す： 5 ' 延長、1 e t - 7 - アンチセンス、ループ、1 e t 7 - センス、および 3 ' 延長。1 e t - 7 - アンチセンス配列に下線を引いた。

【 0 1 7 9 】

以下の参考文献は上記ヒト染色体 D N A から転写された 3 つの予測 R N A の二次構造を予測するためのコンピュータプログラムを提供する：

M. Zuker、D.H. Mathews & D.H. Turner、" Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide "、In RNA Biochemistry and Biotechnology (1999) 11-43、J. Barciszewski & B.F.C. Clark、eds、NATO ASI Series、Kluwer Academic Publishers、(mfold version 3.1)

D.H. Mathews、J. Sabina、M. Zuker & D.H. Turner、" Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure "、J. Mol. Biol. (1999) 288:911-940。

【 0 1 8 0 】

40

50

以下の二次構造の予測は、Zuker and Turnerによる「mfoldバージョン3.1プログラム」(let7-アンチセンス配列に下線を引いた)を使用して得た：

【0181】

1) NT__011523.4 | Hs22__11680 ヒト染色体22

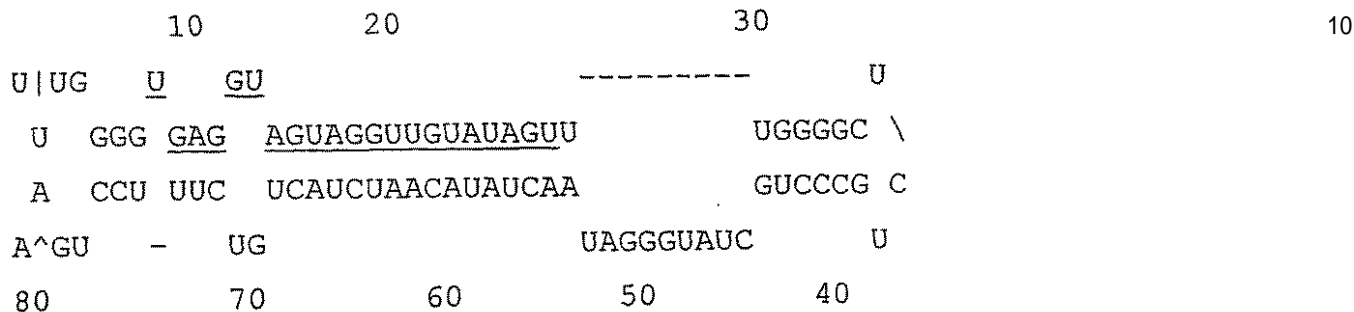
構造1

フォールディング塩基：1から81

最初の(initial)dG = -36.1

配列番号35

【化25】



【0182】

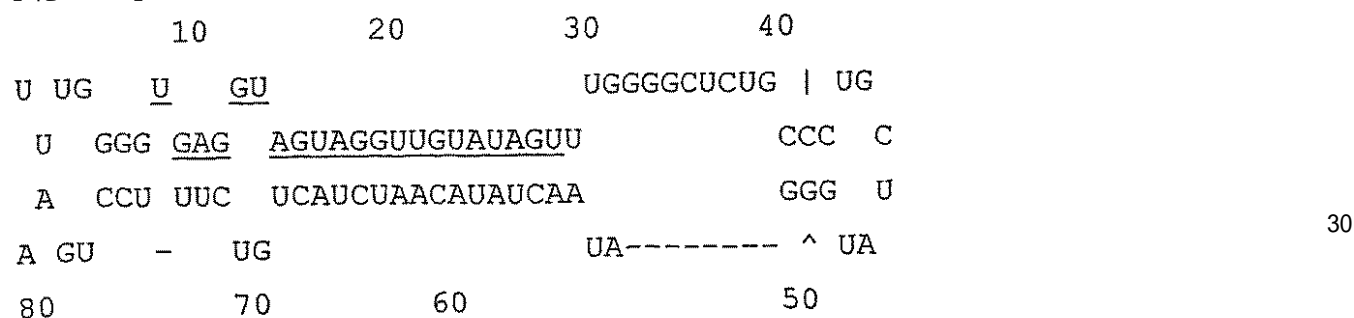
構造2

フォールディング塩基：1から81

最初のdG = -34.4

配列番号35

【化26】



【0183】

Hutvagner et al. (2001) Science 293:834-838において、このゲノム位置由来のより長い前駆体(末端においてさらに4塩基対)の予測および実験データが報告されている。

【0184】

2) NT__009215.3 | Hs11__9372 ヒト染色体11

構造1

フォールディング塩基：1から80

最初のdG = -33.7

配列番号36

【化27】

10

20

30

40

```

      10      20      30      40
U|      UU   G   U           UAGAAUUAC   AA
  CCCAGG  GAG  UAG  AGGUUGUAUAGUU           AUC  G
  GGGUUC  UUC  AUC  UCCGACAUGUCA           UAG  G
-^      CU   G   C           -----   AG
80      70      60      50

```

10

【 0 1 8 5 】

3) N T _ 0 2 5 8 0 8 . 2 | H s 9 _ 2 5 9 6 4 ヒト染色体 9

構造 1

フォールディング塩基 : 1 から 8 3

最初の d G = - 3 6 . 6

配列番号 3 7

【 化 2 8 】

```

      10      20      30
G-|      U   GU           .-UUA   UC
  UGGGA  GAG  AGUAGGUUGUAUAGUU           GGG  \
  AUCCU  UUC  UCAUCUAACAUAUCAA           CCC  A
CA^      -   UG           \ ---   AC
80      70      60      40
                        A---   A
                        CC  C
                        GG  U
                        UAGA  G
                        50

```

20

30

【 0 1 8 6 】

構造 2

フォールディング塩基 : 1 から 8 3

最初の d G = - 3 5 . 8

配列番号 3 7

【 化 2 9 】

40

```

      10      20      30      40
G-      U   GU           UUAGG   ACA|   C
  UGGGA  GAG  AGUAGGUUGUAUAGUU           GUC   CCCA  C
  AUCCU  UUC  UCAUCUAACAUAUCAA           UAG   GGGU  A
CA      -   UG           -----   A--^   C
80      70      60      50

```

50

【 0 1 8 7 】

4) NT__0 2 5 8 0 8 . 2 | H s 9 __ 2 5 9 6 4 ヒト染色体 9、A (3 0 2 5 7 6 - 3 0 2 6 7 7)

構造 1

フォールディング塩基：1 から 1 0 2

最初の d G = - 4 9 . 1

配列番号 3 8

【 化 3 0 】

	10	20	30	40	
U	A	AGU		-----	UG
UGCUCU	UCAG	<u>GAGGUAGUAGAUUGUAUAGUUGU</u>		GGGGUAG	\
AUGAGG	AGUC	UUCCGUUAUCUAACAUAUCAAUA		UCCCAUU	A
G^	-	CC-		GAGGACUUG	UU
100	90	80	70	60	50

10

【 0 1 8 8 】

5) NT__0 1 1 5 1 2 . 3 | H s 2 1 __ 1 1 6 6 9 ヒト染色体 2 1 : 2 1 D

構造 1

フォールディング塩基：1 から 9 2

最初の d G = - 4 2 . 1

配列番号 3 9

【 化 3 1 】

	10	20	30	40	
	A	UU	<u>G</u>	<u>U</u>	UA G UA AC
GUGUGC	UCCGGG	<u>GAG</u>	<u>UAG</u>	<u>AGGUUGUAUGGUU</u>	GA U C \
CACACG	AGGUUC	UUC AUC	UCCAACAUGUCAAA	UU A G C	
^	-	CU	G	U	-- G GG UC
90	80	70	60	50	

20

30

構造 2

フォールディング塩基：1 から 9 2

最初の d G = - 4 0 . 8

配列番号 3 9

【 化 3 2 】

	10	20	30	40	
A	UU	<u>G</u>	<u>U</u>	-----	A UU
GUGUGC	UCCGGG	<u>GAG</u>	<u>UAG</u>	<u>AGGUUGUAUGGUU</u>	UAG G \
CACACG	AGGUUC	UUC AUC	UCCAACAUGUCAAA	GUC C A	
-	CU	G	U	UUGAGG^	C AC
90	80	70	60	50	

40

【 0 1 8 9 】

6) NT__0 1 1 7 9 9 . 5 | H s X __ 1 1 9 5 6 ヒト染色体 X 作業草案配列セグメント : X B

50

構造 1

フォールディング塩基：1 から 9 6

最初の d G = - 4 8 . 0

配列番号 4 0

【化 3 3】

	10	20	30	40	
	-	U	GU	.-UUA	UC
GUGCU	CUGUGGGA	GAG	AGUAGAUUGUAUAGUU	GGG	\
CAUGG	GGCACCCU	UUC	UCAUCUGACAUAAUCAA	CCC	A
^	U	-	UG	\ ---	AU
90	80	70		50	
				C	UU
				AUC	\
				UAG	G
				~	AG
				60	

10

20

【0 1 9 0】

構造 2

フォールディング塩基：1 から 9 6

最初の d G = - 4 7 . 5

配列番号 4 0

【化 3 4】

	10	20	30	40	
-	U	GU	----		UCAU
GUGCU	CUGUGGGA	GAG	AGUAGAUUGUAUAGU	UUUAGGG	A
CAUGG	GGCACCCU	UUC	UCAUCUGACAUAAUCA	AGGUUCU	C
U	-	UG	AUAG	^	ACCC
90	80	70	60	50	

30

【0 1 9 1】

40

7) NT _ 0 1 1 0 9 1 . 5 | H s 1 9 _ 1 1 2 4 8 ヒト染色体 1 9 ; 1 9 C

構造 1

フォールディング塩基：1 から 1 2 2

最初の d G = - 6 5 . 8

配列番号 4 1

【化 3 5】


```

          10          20          30          40          50
|      C      .-CC  CU   G      U   GGA----- A
CCUGCCG GCCCC      GGG  GAG  UAGGAGGUUGUAUAGU GA      GG C
GGGCGGC CGGGG      CCC  UUC  AUCCUCCGGCAUAUCA CU      CC A
^      C      \  --   CU   G      -   AGAGGAA  C
120          110          80          70          60
          90          100
          AGGCUGCG   UG
          CCC  \
          GGG  C
          CA----- CA

```

10

【 0 1 9 2 】

配列番号 4 1

構造 2

フォールディング塩基： 1 から 1 2 2

最初の d G = - 6 2 . 8

20

【 化 3 6 】

```

          10          20          30          40          50
      .-CGCCCCCC  CU   G      U   GGA----- A
CCUGCCG          GGG  GAG  UAGGAGGUUGUAUAGU GA      GG C
GGGCGGC          CCC  UUC  AUCCUCCGGCAUAUCA CU      CC A
      \  -----   CU   G      -   AGAGGAA  C
120          80          70          60
          90          100
      A|   G  -   UG
          GGCU CG CCC  \
          CCGG GC GGG  C
      -^   G  A  CA
          110

```

30

40

染色体 1 9 において見出された配列の長さを約 8 0 ヌクレオチドに限定することにより、その他の染色体上にみられた配列について示されたものと類似の予測ステムループ構造が、塩基対形成ヌクレオチドの最初の方の 5 ' 方向から開始することによって生じる。

【 0 1 9 3 】

ヒトゲノム DNA に対する PCR を用いて 1 e t - 7 についての内在性プロモーターをクローニングした。プライマーは 1 e t - 7 配列に隣接する 3 つのゲノム位置のすべてについて設計した (例えば、5 ' -TGAGGTAGTAGGTTGTATAGT-3 ' 配列番号 3 2)。3 ' 1 e t - 7 延長配列の 3 ' にアニーリングする 2 種類のリバープライマーを用いた。さらに 3 種類の、5 ' 1 e t - 7 延長の 5 ' にアニーリングするフォワードプライマーを用いた。完全な機能を保障するが、最小の 1 e t - 7 プロモーターを同定するために、3 つのフ

50

ォワードプライマーを *l e t - 7* 転写開始部位の異なる距離の上流においてアニーリングさせた。以下の例においては染色体 22 由来の配列を用いた。同様に、その他の染色体由来の配列を用いることもできる。染色体 22 についてのプライマーを以下に挙げる。

【0194】

位置 NT__011523.4 | Hs22__11680 ヒト染色体 22 についてのオリゴヌクレオチド (5' から 3') :

L e t 7 遺伝子 22 F1 : 5' -GCACGTTCTAGAGAATCCCTGTGCCCTTGGTG (配列番号 42)

L e t 7 遺伝子 22 F2 : 5' -GCACGTTCTAGACCGTGAAGCCGCTACTCAGC (配列番号 43)

L e t 7 遺伝子 22 F3 : 5' -GCACGTTCTAGAGGGTTGACAGTCGTATCTGC (配列番号 44)

L e t 7 遺伝子 22 R1 : 5' -CCGTGCAAGCTTTGTGACACTTCTCAGTGTAAG (配列番号 45)

L e t 7 遺伝子 22 R2 : 5' -CCGTGCAAGCTTCCTGCCACTGAGCTGGCCAG (配列番号 46)

10

【0195】

ゲノム領域とマッチする配列を下線で示した。別の 5' 配列を追加してクローニングを容易にした (プライマー *L e t 7* 遺伝子 22 F1 - 3 における *X b a I* 部位、プライマー *L e t 7* 遺伝子 22 R1 - 2 における *H i n d I I I* 部位)。

【0196】

ゲノム断片を得るために異なるプライマーの組み合わせを用いた :

【表 1】

断片名	フォワードプライマー	リバースプライマー
<i>L e t 7</i> 遺伝子 22 A	<i>L e t 7</i> 遺伝子 22 F3	<i>L e t 7</i> 遺伝子 22 R1
<i>L e t 7</i> 遺伝子 22 B	<i>L e t 7</i> 遺伝子 22 F2	<i>L e t 7</i> 遺伝子 22 R1
<i>L e t 7</i> 遺伝子 22 C	<i>L e t 7</i> 遺伝子 22 F1	<i>L e t 7</i> 遺伝子 22 R1
<i>L e t 7</i> 遺伝子 22 D	<i>L e t 7</i> 遺伝子 22 F3	<i>L e t 7</i> 遺伝子 22 R2
<i>L e t 7</i> 遺伝子 22 E	<i>L e t 7</i> 遺伝子 22 F2	<i>L e t 7</i> 遺伝子 22 R2
<i>L e t 7</i> 遺伝子 22 F	<i>L e t 7</i> 遺伝子 22 F1	<i>L e t 7</i> 遺伝子 22 R2

20

【0197】

P C R 断片を酵素 *X b a I* と *H i n d I I I* で消化し、*p I P s p A d a p t 6 - d e l t a P o l y A* の *A v r I I* 部位と *H i n d I I I* 部位にクローニングし、それによって *C M V* プロモーター配列を置換した (図 3 を参照されたい)。*p I P s p A d a p t 6 - d e l t a P o l y A* は、*p I P s p A d a p t 6* から以下のように構築した。*p I P s p A d a p t 6* をメチラーゼ陰性大腸菌株 D M 1 中で増殖させて第二の *X b a I* - 部位のメチル化を防いだ。DNA を単離し、*X b a I* で消化し、それによってポリ A シグナルを含む 142 bp の断片を切り出した。再ライゲーションしたベクターを *p I P s p A d a p t 6 - d e l t a P o l y A* と称する。

30

【0198】

ゲノム断片 *L e t 7* 遺伝子 22 A - F を含むこれらのコンストラクトを哺乳類細胞にトランスフェクトし (実施例 1 に記載のように) *l e t - 7* RNA の発現とその *p G L 3 - t l e t 7* の抑制効果について試験した。これは異なる手段によって行った :

40

【0199】

p G L 3 - t L e t 7 - F、または *p G L 3 - t L e t 7 - R* レポーターからのルシフェラーゼ活性の抑制

断片、*L e t 7* 遺伝子 22 A、*L e t 7* 遺伝子 22 B、および *L e t 7* 遺伝子 22 C は、染色体 22 上の *L e t 7* 遺伝子のゲノム配列の異なる長さを表す。これら断片を *p I P s p A d a p t 6 - d e l t a P o l y A* プラスミドにクローニングした。レポーターコンストラクトを用いて、実施例 1 と類似の方法、ただし以下が異なる実験において *L e t - 7* 発現プラスミド、*L e t 7* 遺伝子 22 A、*L e t 7* 遺伝子 22 B、*L e t 7* 遺伝子 22 C を試験した :

【0200】

50

図 1 3 A - B に模式的に示すように L e t - 7 に基づく発現プラスミドによって R N A を置換した。

【 0 2 0 1 】

以下の 3 成分からなる D N A 混合物を宿主細胞（例えば H e L a または P E R . C 6 / E 2 A 細胞）にトランスフェクトした：

4 . ルシフェラーゼに基づくレポーターコンストラクト

a . p G L 3 - コントロール（Promega）、または、

b . p G L 3 - t L e t - 7 F、または、

c . p G L 3 - t L e t - 7 R

5 . 標準化のための内部コントロール

a . p R L - T K（Promega；登録番号 A F 0 2 5 8 4 6）

6 . L e t - 7 に基づく発現コンストラクト

a . p I P s p A d a p t - L e t - 7 遺伝子 A（断片 L e t 7 遺伝子 2 2 A 含有）、または、

b . p I P s p A d a p t - L e t - 7 遺伝子 B（断片 L e t 7 遺伝子 2 2 B 含有）、または、

c . p I P s p A d a p t - L e t - 7 遺伝子 C（断片 L e t 7 遺伝子 2 2 C 含有）

【 0 2 0 2 】

1 日目：

H e L a または P E R . C 6 / E 2 A 細胞をトランスフェクションの 2 0 時間前に 9 6 - ウェル形式において 4.5×10^4 細胞 / 1 0 0 μ l 培地（H e L a 細胞について D M E M + 1 0 % 熱不活性化ウシ胎仔血清；P E R . C 6 / E 2 A 細胞について D M E M + 1 0 % 非 - 熱不活性化ウシ胎仔血清）/ ウェルにて播種した。

【 0 2 0 3 】

2 日目：

ウェル当たりの処理は以下のとおり：D N A 混合物を 2 5 μ l の（総容積）O p t i M E M に調製した。これは以下を含む：

1 . 2 0 0 n g p G L 3 - コントロール、または、

2 0 0 n g p G L 3 - t L e t - 7 F、または、

2 0 0 n g p G L 3 - t L e t - 7 R

2 . 2 0 n g p R L - T K

3 . 1 0 0 n g L e t - 7 に基づく発現コンストラクト、p I P s p A d a p t - L e t - 7 遺伝子 A、または p I P s p A d a p t - L e t - 7 遺伝子 B、または p I P s p A d a p t - L e t - 7 遺伝子 C。

【 0 2 0 4 】

L i p o f e c t A M I N E 2 0 0 0（0 . 8 μ l）および O p t i M E M（2 4 . 2 μ l）を室温で 7 - 1 0 分間インキュベートし、各 D N A 混合物に添加した。この混合物（最終容積 5 0 μ l）を室温で 1 5 - 2 5 分間インキュベートし、次いで細胞に添加し、細胞から培地を除去した。細胞を 4 8 時間 3 7（H e L a）または 3 9（P e r . C 6 / E 2 A）のインキュベーターで 1 0 % C O₂ 下でインキュベートした。

【 0 2 0 5 】

4 日目：

細胞を回収し、溶解し、ホタルルシフェラーゼおよびウミシイタケルシフェラーゼ活性をデュアルルシフェラーゼキット（Promega）を用いて製造業者の指示に従って測定した。各サンプルのホタルルシフェラーゼ絶対値を内部ウミシイタケルシフェラーゼ絶対値で割って相対 l u c / r e n - 値を得た。これら相対 l u c / r e n - 値を、プラスミドを用いないか非関連プラスミドを用いたコントロールサンプルと比較した。

【 0 2 0 6 】

P E R . C 6 / E 2 A 細胞に対する一過性トランスフェクションの結果を図 1 4 に示す。レポーターコンストラクトと L e t - 7 発現コンストラクト（p I P s p A d a p t - L

10

20

30

40

50

e t - 7 遺伝子 A - C) の共トランスフェクションにより、F - 方向に l e t - 7 標的配列を含むレポーターコンストラクト；p G L 3 - t L e t - 7 - F に対する L e t - 7 発現コンストラクトの活性が示された。p G L 3 - t L e t - 7 - R はノックダウンを示さなかった。これはおそらく、非対称的な L e t - 7 R N A のプロセッシングによる。L e t - 7 標的配列を欠く、p G L 3 レポーターには影響が無かった。最小領域 (3 3 8 b p) 、L e t - 7 遺伝子 - C は、この実験で示すノックダウン活性に十分であった。

【 0 2 0 7 】

ルシフェラーゼレベルの減少

手順は実施例 1 と同じとしたが、s i R N A - L e t 7 . 1 を L e t 7 遺伝子 2 2 A - F を含有するプラスミドコンストラクトに置換するという点では異なる手順とした。G L 3 ルシフェラーゼの m R N A レベルを製造業者の指示に従って T a q m a n P C R (P E A p p l i e d B i o s y s t e m s) を用いて配列特異的分解について測定した。R N A を T R I z o l 試薬 (L i f e T e c h n o l o g i e s) を用いて製造業者の指示に従って単離し、その後 0 . 1 U / μ l R Q 1 R N a s e (D N a s e フリー； P r o m e g a) を用いて 3 7 ° で 2 0 分間 D N a s e 処理を行った。単一チューブでの反応を行って c D N A を合成し、続いて T a q m a n P C R 反応を行った。該反応は 1 0 0 n g のトータル R N A を含み総用量 2 5 μ l (1 x T a q M a n バッファー A (P E A p p l i e d B i o s y s t e m s) 、5 m M M g C l ₂ 、3 0 0 μ M 全 d N T P s 、3 0 0 n M l u c - 1 - F o r 、3 0 0 n M l u c - 1 - R e v 、1 5 0 n M l u c - 1 - プローブ、0 . 0 2 5 U / μ l A m p l i T a q G o l d 、0 . 1 U / μ l R N a s e 阻害剤、および 0 . 2 5 U / μ l M u l t i S c r i b e 逆転写酵素からなる) であった。T a q m a n 分析を A B I P r i s m 7 7 0 0 S e q u e n c e D e t e c t o r 装置を用いて行った。

【 0 2 0 8 】

この分析に用いたプライマーおよびプローブの組み合わせは以下のとおりである：

プライマー：

l u c - 1 - F o r : 5 ' A A G C G A C C A A C G C C T T G A T 3 ' (配列番号 4 7)

l u c - 1 - R e v : 5 ' T T C G T C T T C G T C C C A G T A A G C 3 ' (配列番号 4 8)

T a q M a n プローブ (5 ' F A M レポーター色素； 3 ' T A M R A)：

l u c - 1 - プローブ : 5 ' A T G T C T C C A G A A T G T A G C C A T C C A T C C T T G 3 ' (配列番号 4 9)

【 0 2 0 9 】

反応は以下のプログラムを用いて行った：

4 8 ° で 3 0 分、9 5 ° で 1 0 分、その後 4 0 サイクルの [9 5 ° で 1 5 秒、6 0 ° で 1 分]。

【 0 2 1 0 】

1) l e t - 7 R N A の発現

L e t 7 遺伝子 2 2 A - F を含むプラスミドコンストラクトを哺乳類細胞にトランスフェクトし、回収して R N A を単離した。R N A を P a s q u i n e l l i e t a l . (2 0 0 0) N a t u r e 4 0 8 : 8 6 - 8 9 に記載のようにして l e t - 7 R N A 発現についてノザンブロッティングによって分析した。

【 0 2 1 1 】

B . L e t - 7 R N A のその他の標的配列への再プログラミング

「再プログラミング」の語は、l e t - 7 ガイド配列と、その他の R N A 配列に基づくガイド配列の置換のことをいう。G L 3 配列を本実施例において用いた。再プログラムされたコンストラクトを l e t - 7 ガイド配列およびその相補鎖を除去し、それらを G L 3 ガイド配列およびその相補鎖で置換することによって行った。かかる再プログラムされたキメラ R N A は、l e t - 7 標的配列を含む R N A ではなく G L 3 標的配列を含む R N A を標的とするであろう。これらコンストラクトは L e t 7 遺伝子 2 2 A - F 断片を有するプラスミドに基づく。

【 0 2 1 2 】

この新しいガイド配列とこのガイド配列と塩基対形成できる配列を P C R を用いてコンス

トラクトに導入した。例えば、染色体 22 上の *let-7* ゲノム位置について、*GL3* 配列を導入した；フォワードプライマー（*let-7* . N19 - F4）およびリバースプライマー（*let-7* . N19 - R4）からなる 2 つのプライマーを逆平行に、互いに逆向きになるよう設計し、これらはそれぞれその 3' 末端に *let-7* 配列、内部に新しい標的配列（N19）、およびその 5' 末端に *let-7* ループ配列を含むものであった。このプライマーの 5' 配列は 14 塩基にわたって相補的であった。

【0213】

let-7 . N19 - F4 :

5' -TCTGCCCTGC TATGGGATAA C nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn TCCTGAAGTG GCTGTA-3' (配列番号 50)

let-7 . N19 - R4 :

5' -CATAGCAGGG CAGAGCCCCA AAC nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn CCCCAAAGGG CAGT-3' (配列番号 51)

【0214】

N19 は目的の標的配列である；*GL3* について、N19 は：

5' -CTTACGCTGAGTACTTCGA-3' (配列番号 9) である。

let-7 ゲノムクローンのガイド配列の置換プロセスを図 4 に示す。これらプライマーを *let-7* 遺伝子 22A - F DNA を含むプラスミドコンストラクトに対する別々の PCR 反応に用いた。プライマー *let-7* . N19 - R4 をフォワードプライマー、例えば、*let-7* 遺伝子 22F1 - 3 と組み合わせて用いた。プライマー *let-7* . N19 - F4 をリバースプライマー、例えば、*let-7* 遺伝子 22R1 - 2 と組み合わせて用いた。このようにして得た 2 つの PCR 産物の混合物を鋳型として用いて、外側プライマー、*let-7* 遺伝子 22F1 - 3 および *let-7* 遺伝子 22R1 - 2 を用いた PCR 反応を行った。この工程によって得た PCR 産物を *pIPspAdapt6-deltaPolyA* に *let-7* 遺伝子 22A - F 断片について記載したのと同じ要領でクローニングした。

【0215】

新しいガイド配列を有するこのキメラ *let-7* RNA の発現を、*let-7* RNA 自体について先に記載した 3 つの方法によって分析した：

1. *pGL3* - コントロール、または *pGL3* - *tlet-7* - F、または *pGL3* - *tlet-7* - R レポーターコンストラクトからのルシフェラーゼ活性の抑制。
2. ルシフェラーゼ mRNA レベルの減少。
3. 新しい標的配列を有するキメラ *let-7* RNA の発現。

【0216】

この実施例において、新しいガイド配列およびガイド配列と塩基対形成することができる配列を、実施例 3A に記載したのと同様の要領で PCR を用いてコンストラクト *pIPspAdapt-let-7* 遺伝子 C に導入した。

【0217】

新しい N19 ガイド配列は以下の通り：

let-7 - 100%、5' -TATACAACCTACTACCTCA-3' ; (配列番号 52)

GL3、5' -CTTACGCTGAGTACTTCGA-3' ; (配列番号 9)

GL2、5' -CGTACGCGGAATACTTCGA-3' ; (配列番号 6) および、

EGFP、5' -GCTGACCCTGAAGTTCATC-3' ; (配列番号 53)

【0218】

作成したクローンを以下のように名づけた：プラスミド__プロモーター名__ガイド配列名、例えば、それぞれ、*pIPspAdapt-let-7-glet-7-100%*、*pIPspAdapt-let-7-gGL3*、*pIPspAdapt-let-7-gGL2*、および *pIPspAdapt-let-7-gEGFP*。ガイド配列の前の「g」は、プロモーター配列（例えば、*let-7*）とガイド配列（例えば、*glet-7*）を識別するために導入した。

10

20

30

40

50

【0219】

クローンpIPspAdapt-Let-7-gLet7-100%においては、Let-7標的とガイド配列を100%相補的とし、RNA中のこの領域において完全な塩基対形成を可能とした。天然のlet-7 RNAはこの領域において100%相補的ではない；それは、2つの非-正準塩基対（G-U塩基対）と突出したUを含む。

【0220】

クローンの活性はルシフェラーゼレポーターアッセイにおいて上記したように試験し、ルシフェラーゼに基づくレポーターコンストラクト（pGL3-コントロール、またはpGL3-tLet-7F、またはpGL3-tLet-7R、またはpGL2）を用いた。この実験において用いた成分の模式図を図15に示す。結果を図16に示す。ルシフェラーゼレポーターレベルの減少が同族の(cognate)標的配列を含むレポーターにおいてのみ観察された。即ち：プラスミドpIPspAdapt-Let-7-gLet-7-100%はpGL3-tLet-7-Fの減少を示し、プラスミドpIPspAdapt-Let-7-gGL3は、GL3標的配列を含むすべての3つのレポーター（pGL3-コントロール、pGL3-tLet-7F、pGL3-tLet-7R）の減少を示し、プラスミドpIPspAdapt-Let-7-gGL2は、pGL2レポーターのみの減少を示した。非-特異的効果は観察されず、これはいずれのレポーターの発現も抑制しなかった、プラスミドpIPspAdapt-Let-7-gEGFPによっても確認された。

10

【0221】

20

C. ノザン分析による発現コンストラクトのRNA発現

RNAがDNA発現コンストラクトから転写されていることを示すために、発現分析をノザンプロットングを用いて行った。

【0222】

細胞をキメラ発現DNAコンストラクトでトランスフェクトし、ノザンプロットングで以下に例証するように分析した。

【0223】

1日目：

HeLa、U2OS、PER.C6/E2A細胞をトランスフェクションの24時間前に6-ウェル形式において 3.0×10^4 細胞にてウェルあたり2mlの培地に播種した。感染実験のためにウェルあたり2mlの培地中の 1.5×10^4 細胞を用いた（HeLa細胞およびU2OS細胞について、DMEM+10%熱不活性化ウシ胎仔血清；PER.C6/E2A細胞についてDMEM+10%非-熱不活性化ウシ胎仔血清+10mM MgCl₂）/ウェル。

30

【0224】

2日目：

DNA混合物をウェルあたり250μl（総容積）のOptiMEM中に調製した。これは以下を含む：

Let-7に基づく発現コンストラクトを6ウェルプレートにてウェルあたり3μg。

【0225】

40

LipofectAMINE2000（4μl）およびOptiMEM（246μl）を室温で7-10分間インキュベートし、各DNA混合物に添加した。この混合物（最終容積500μl/ウェル）を室温で15-25分間インキュベートし、次いで細胞に添加した。細胞を10%CO₂下で37℃インキュベーター中で24、48、または72時間インキュベートした。

【0226】

3日目および/または4日目および/または5日目：

細胞をTriZol（Invitrogen）を用いて製造業者の指示に従って回収した。簡単に説明すると、細胞を1-2mlのPBSで洗浄し、1mlのTriZol中で溶解した。6ウェルのサンプルをプールし、グリコーゲンを50μg/mlまで添加した。クロロホル

50

ムを添加した (1 ml の用いた *Trizol* あたり 0.2 ml)。サンプルをボルテックスにかけ、5 分間インキュベートし、9300 g で 15 分間遠心した。水相を新しいチューブに移した。イソプロパノール (1 ml の *Trizol* 当たり 0.5 ml) を添加し、7500 g で 5 分間遠心した。ペレットを 80% エタノールで洗浄し、*RNAse* - 無含水に溶解した。*RNA* サンプルの濃度を UV 吸光度 (A_{260}) または *RiboGreen* (*Molecular Probes*) 測定によって製造業者の指示に従って測定した。

【0227】

各サンプルから 0.5 - 15 μ g の *RNA* をゲル分析のために準備した。*RNA* を変性ローディング色素 (*TBE Urea* サンプルバッファー; *Biorad*) と混合し、15% ポリアクリルアミド 1x *TBE* - ゲル (*Biorad*) にローディングする直前に 90 で 3 分間加熱することにより変性させた。ゲル泳動を 200 V で 50 分間行った。ゲルを *Hybond N+* フィルター (*Amersham*) に *Transblot semi-dry Electrophoretic Transfer* (*Biorad*) を用いて 0.2 A / プロットで最大 25 V で 30 分間プロッティングした。プロッティングしたフィルターを製造業者の指示に従って *Rapid Hyb* 溶液 (*Amersham*) を用いてプローブとハイブリダイズさせた。プローブはガイド配列に相補的なオリゴヌクレオチドの 5' 末端を標準的方法を用いて [32 P] - *ATP* で標識することによって作成した。

10

【0228】

図 17 においてコンストラクト *pIPspAdapt-Let-7-gGL3* 由来の *RNA* 種の発現を示す。*Let-7* に基づく発現コンストラクトでトランスフェクトされた *PER.C6.E2A* 細胞の *RNA* 調製物のノザンプロットを 32 P で末端標識された *GL3* ガイド配列を認識するプローブ (*GL3* プローブ配列: 5' -CTTACGCTGAGTACTTCGA-3' 配列番号 9) とハイブリダイズさせた。プロセッシングされた *RNA* 種は、サイズマーカーとしてローディングした合成 *GL3 siRNA* 二本鎖 (21 nt) とともに移動した。シグナルは非関連配列を有するコントロールサンプルにおいては検出されなかった。

20

【0229】

類似の発現研究を異なるガイド配列および塩基対形成配列を有する多数のその他の *Let-7* に基づくコンストラクトについて行った。これらコンストラクトの標的配列は様々な標的に対して設計され、ハイブリダイゼーションにおいて用いたオリゴヌクレオチドの配列と同一であった。標的配列を以下に挙げる:

30

PPAR ガンマ (登録番号 *NM_005037*; nt 173 - 191;

5' -CAGATCCAGTGGTTGCAGA-3'、配列番号 54)

IGF2R (登録番号 *NM_000876*; nt 510 - 528;

5' GGAGGTGCCATGCTATGTG-3' 配列番号 55)

【0230】

図 18 は、*Let-7* または *GL3* 以外の配列を含む発現プラスミドが正しい長さおよび予測配列を有するキメラ *RNA* 分子を発現したことを示す。

【実施例 4】

【0231】

RNA ポリメラーゼ *III* プロモーターに基づく発現

40

これまでに記載した実施例において、キメラ *RNA* の発現は *Let-7* プロモーターの活性に依存していた。本実施例では、*Let-7* プロモーターを異種性プロモーターと置換してキメラ *RNA* 発現に用いた。好ましいプロモーターは偏在的に活性なものである。本実施例は、実施例 3 からのコンストラクトの偏在的に活性なプロモーター、特に、*RNA* ポリメラーゼ *III* によって認識されるプロモーター (*pol III* プロモーター) を含むベクターへのクローニングを記載する。

【0232】

真核生物において、*pol III* プロモーターは、内在的に様々な小分子、構造的 *RNA*、例えば: 5S *rRNA*、*tRNA*、*VA RNA*、*Alu RNA*、*H1*、および *U6* 核内低分子 *RNA* を産生する。その他の好適な利用可能なプロモーターには、*CMV*、*R*

50

S V、M M L V、t e t - 誘導性、および I P T G - 誘導性プロモーターが含まれる。P o l I I I プロモーターはしばしば治療的アンチセンスRNAまたはリボザイムRNAの発現のために選択される (Medina and Joshi (1999))。Medina and Joshiからの p o l I I I プロモーターを用いて s i R N A、s t R N A およびキメラRNAの転写に好適なプロモーターを決定した。

【0233】

このアプローチは p o l I I I プロモーターに基づく発現コンストラクトを用いた s i R N A、s t R N A およびキメラRNAの発現に用いた。このアプローチの例は、s i R N Aの p o l I I I プロモーターから転写された t R N Aの3'末端への融合である。s i R N Aは、s t R N A配列またはキメラRNAからなり、これは相補的ガイド配列にループ構造を介して連結されたガイド配列からなる。ガイド配列と相補的ガイド配列の相対順序は逆にしても良い。また、ループ構造は、線虫、ショウジョウバエ、またはヒト起源由来の、例えば染色体9、11および22にみられる l e t - 7ループ由来のものでよい。

10

【0234】

キメラRNA分子は内在性細胞内プロセシング機構によってプロセシングされる；例えば、t R N Aの3'末端に融合させた s i R N A部分は、t R N A3'プロセシングエンドリボヌクレアーゼを含む内在性分子によってプロセシングされ、それによって s i R N A部分が放出される。切断のための部位は人工的に導入してもよく、例えば同族のリボザイムの導入と組み合わせてリボザイム標的配列を導入しても良い。

【0235】

プロモーターの活性を人工的に誘導性 p o l I I I 発現系を得るように適合させた。例えば Meissner et al. (2001) Nuc Acids Res 29:1672-1682に記載されている。

20

【0236】

L e t - 7プロモーターをRNAポリメラーゼ I I I プロモーターによって置換した。一例として、L e t - 7プロモーターをヒトU6 s n R N Aプロモーターの要素と置換した (図19)。効率的なプロモーター活性のために、転写産物の第一のヌクレオチドをGとし、転写終結シグナルは5以上のTの連続とした。発現したRNAは19 - 21 n tの (標的に向けられた) ガイド配列および、ループ配列によって連結されたガイド配列と塩基対形成することができる配列を含んでいた。

【0237】

ゲノムヒトU6遺伝子 (登録番号M14486) をヒトゲノムDNAを用いたPCRに基づく戦略によってクローニングした。クローニングされる領域は転写開始部位の - 265上流のヌクレオチドから開始し、転写開始部位の下流のヌクレオチド + 198までであった。用いたプライマーは以下の通りである：

30

h U 6 (- 265) - F 1 - X b a I

5' -GcacgTTCTAGAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCT-3' (配列番号56)

h U 6 (+ 198) - R 1 - H i n d I I I

5' -ccgtgcAAGCTTTGGTAAACCGTGCACCGGCGTA-3' (配列番号57)

【0238】

PCR産物をL e t - 7遺伝子のクローニングについて記載したのと同様の戦略で p I P s p A d a p t 6 - d e l t a P o l y AのX b a IおよびH i n d I I I部位にクローニングした (実施例3を参照されたい)。

40

【0239】

このクローンから開始して、転写されたU6 s n R N A配列の n t + 2 から n t + 102までを標的配列を下方制御することができるRNA配列と置換した。L e t - 7遺伝子のガイド/標的配列の置換の戦略と類似したアセンブリーPCR戦略を用いて (実施例3を参照されたい) これらRNA配列を好ましくはガイド配列、連結化ループ、ガイド配列と塩基対を形成できる配列を含むものとした。第一の5' G - ヌクレオチドおよび3'終結シグナルUUUUUはインタクトなままとした。

【0240】

50

一例として、p G L 3 - t L e t - 7 レポーターに向けられた標的配列を用いた。L e t - 7 に基づくプロモーターについて記載したガイド配列 (TGAGGTAGTAGGTTGTATA、配列番号 58) を、U 6 に基づくプロモーターについてのガイド配列 (GAGGTAGTAGGTTGTATAG; 配列番号 59) と比べて 1 ヌクレオチドシフトさせて U 6 における位置 1 を G - ヌクレオチドとした。転写は開始ヌクレオチドを G とした場合より効率的であった。用いたこのガイド配列は標的配列に対して完全に相補的であった。

【0241】

発現プラスミド：

p I P s p A d a p t - U 6 (+ 1) - L 1 2 - g l e t 7 は、U 6 (+ 1) プロモーター、それに続いて l e t 7 ガイド配列および L 1 2 ループ配列 (配列番号 30) を含む p I P s p A d a p t プラスミドであった。 10

クローニングに用いたプライマーは以下の通りである：

G J A 1 4 1 (配列番号 60)

5' -GTTTGCTATAACTATACAACCTACTACTTTTTACATCAGGTTG-3'

G J A 1 4 2 (配列番号 61)

5' -GTTATAGCAAACCTATACAACCTACTACCTCGGTGTTTCGTCCTTTC-3'

【0242】

その結果えられた R N A 配列は以下の通り (ガイドに下線を施した)：

5' -GAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUGCUAUAACUAUACAACCUACUACUUUUU-3' (配列番号 62) 20

【0243】

予測 R N A フォールディング：

構造 1

最初の d G = - 29.8

配列番号 62

【化37】

```

      10          20
      .
      --|          UG
      GAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU  C
      UUUCAUCAUCCAACAUAUCAA  U
      UU^          UA
      .          40          30
  
```

30

【0244】

p I P s p A d a p t - U 6 (+ 1) - L 1 3 - g l e t 7 は、U 6 (+ 1) プロモーター、それに続いて l e t 7 ガイド配列および L 1 3 ループ配列 (配列番号 66) を含む p I P s p A d a p t プラスミドであった。

クローニングに用いたプライマーは以下の通りである：

G J A 1 4 3 (配列番号 63) 40

5' -GTTGTGCTATCAACTATACAACCTACTACTTTTTACATCAGGTTG-3'

G J A 1 4 4 (配列番号 64)

5' -GTTGATAGCACAACCTATACAACCTACTACCTCGGTGTTTCGTCCTTTC-3'

R N A 配列 (ガイドに下線を施した)：

5' -GAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUGCUAUAACUAUACAACCUACUACUUUUU-3' (配列番号 65)

【0245】

予測 R N A フォールディング：

構造 1

最初の d G = - 32.6

配列番号 65

50

【化 3 8】

```

          10          20
--|
          UG
GAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUG C
UUUCAUCAUCCAACAUAUCAAC U
UU^
          UA
50          40          30

```

10

【0 2 4 6】

上記 2 例において、RNA 配列は 5' - G (G / A) (G / A) によって開始するため RNA の 3' 末端 (... UUUU U - 3') と塩基対形成することができる。下線を施した U は RNA の端の 5' 末端と塩基対を形成する。この結果 3' 末端に 2 nt のオーバーハングが生じる。開始配列として G (G / A) (G / A) を有さないコンストラクトも可能である；これらは 3' 末端に 5 nt のオーバーハングを有する (以下を参照)。

【0 2 4 7】

簡単に説明するとヒト U 6 クローンに対して 2 つの PCR 反応を行って「レフト断片」と「ライト断片」を作成した。一例として、p I P s p A d a p t - U 6 (+ 1) - L 1 2 - g l e t 7 のクローニングを示す。しかし原則として、ガイド配列は以下の記載にしたがって構築できる：

用いたプライマーは以下の通りである：

「レフト断片」については：

h U 6 (- 2 6 5) - F 1 - X b a I (配列番号 5 6)

5' -GcacgTTCTAGAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCT-3'

U 6 - R 2 : G J A 1 4 2 (配列番号 6 1)

5' -GTTATAGCAAACCTATACAACCTACTACCTCGGTGTTTCGTCCTTTC-3'

「ライト断片」については：

U 6 - F 2 : G J A 1 4 1 : (配列番号 6 0)

5' -GTTTGCTATAACTATACAACCTACTACTTTTTACATCAGGTTG-3'

h U 6 (+ 1 9 8) - R 1 - H i n d I I I (配列番号 5 7)

5' -ccgtgcAAGCTTTGGTAAACCGTGCACCGGCGTA-3'

【0 2 4 8】

フォワード (U 6 - F 2 / G J A 1 4 1、配列番号 6 0) およびリバースプライマー (U 6 - R 2 / G J A 1 4 2、配列番号 6 1) からなる 2 つのプライマーを逆平行に互いに逆を向くように設計し、これらはそれぞれ 3' 末端に U 6 配列、内部に新しい標的配列 (N 1 9)、および 5' 末端に連結化ループ配列を含むものであった。プライマーの 5' 配列は 1 2 塩基について相補的であった。

【0 2 4 9】

得られた「レフト断片」および「ライト断片」をゲルで単離し、1 対 1 の比で混合し次の外側プライマーを用いたアセンブリー PCR 反応の鋳型とした。

【0 2 5 0】

アセンブリー PCR :

h U 6 (- 2 6 5) - F 1 - X b a I (配列番号 5 6)

5' -GcacgTTCTAGAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCT-3'

h U 6 (+ 1 9 8) - R 1 - H i n d I I I (配列番号 5 7)

5' -ccgtgcAAGCTTTGGTAAACCGTGCACCGGCGTA-3'

【0 2 5 1】

この工程により得られた PCR 産物を L e t 7 遺伝子 2 2 A - F 断片 (実施例 3) につい

50

て記載したのと同じ戦略を用いて p I P s p A d a p t 6 - d e l t a P o l y A にクローニングした。

【0252】

得られたプラスミドを、実施例 1 から 3 に記載のレポーター系において試験した。実験は L e t - 7 に基づくプラスミドについて実施例 3 において記載したのと同様に行ったが、この実施例ではこれらプラスミドを U 6 - プロモーターに基づくプラスミド (p I P s p A d a p t - U 6 (+ 1) - g l e t 7 - L 1 2 および p I P s p A d a p t - U 6 (+ 1) - g l e t 7 - L 1 3) に置換した。

【0253】

U 6 に基づくプロモーター発現プラスミドによりトランスフェクトされた細胞のサンプルのノザンプロットにより、RNA 種の発現および合成 s i R N A に匹敵するサイズの種へのプロセッシングが示された。 10

【0254】

図 2 1 に示す結果は明らかに標的 L e t - 7 配列 (p G L 3 - t L e t - 7 F およびある程度は p G L 3 - t L e t - 7 R) によるレポータープラスミドの抑制を示した。この実験において、U 6 プロモーターに基づく発現プラスミドは l e t - 7 プロモーターに基づく発現プラスミドよりも強いノックダウン効果を示した。試験した両方のループ配列は類似の活性を示した。

【実施例 5】

【0255】

ウイルスによる共感染 20

上記の諸実験はすべて一過性トランスフェクション実験であった。即ち、プラスミド DNA が P E R . C 6 / E 2 A 細胞にトランスフェクトされた。細胞においてアデノウイルスの存在下でノックダウン活性を試験するために、以下の実験を行った。E 2 A 欠失アデノベクターを補完しない P E R . C 6 細胞に、実施例 2 および 3 に記載した s i R N A または発現プラスミドをトランスフェクトしたが、ただし 1 つの点において異なっていた：トランスフェクションの 2 0 - 2 4 時間前に細胞にアデノウイルスを感染させた。これらの細胞で複製できないウイルスは、E G F P を発現するため、M O I 3 を用いて形質導入効率が 9 0 % を超えるかを判定できる。様々なウイルス骨格について試験した (欧州特許第 1 1 9 1 1 0 5 号を参照されたい) 。 30

【0256】

アデノウイルスによる感染自体は、本実施例で用いた条件下で一過性にトランスフェクトされたプラスミドによって得られるノックダウン活性に影響を与えなかった。図 2 2 に示すようにウイルスに感染した細胞とウイルスによって感染されなかった細胞との間にノックダウン効率の差は無かった。

【実施例 6】

【0257】

ウイルスノックダウン

プラスミド、p G L 3 - コントロール、p G L 3 - t L e t - 7 F、p G L 3 - t L e t - 7 R、および p R L - T K のプロモーターを有するレポーター遺伝子を p I P s p A d a p t 6 - d e l t a p o l y A - コンストラクトに再クローニングしてレポーターのアデノウイルスバリエーションの作成を可能にした。標準的再クローニング手順を以下の制限部位を用いて行った：p G L 3 - コントロール、p G L 3 - t L e t - 7 F、および p G L 3 - t L e t - 7 R の断片については H i n d I I I および B a m H I ; ベクター p I P s p A d a p t 6 の A v r I I (平滑) / B a m H I にクローニングされた p R L - T K の断片については B g l I I (平滑) および B a m H I 。 40

【0258】

p I P s p A d a p t 型のコンストラクトを一過性トランスフェクション実験において機能性について試験したところプラスミドとして活性であるようであった。

【0259】

記載したすべての p I P s p A d a p t に基づくレポーターコンストラクトをヘルパー D N A とともに P E R . C 6 / E 2 A に一過性にトランスフェクトした。アデノウイルスを記載された方法を用いて形成した (米国特許第 6 3 4 0 5 9 5 号) 。ウイルスコンストラクトは「 A d 」を付して名づけた。例えば、 A d G L 3 - t L e t - 7 F は、 G L 3 レポーター遺伝子およびフォワード方向に L e t - 7 標的配列を有するアデノウイルスである。

【 0 2 6 0 】

共感染実験を以下を含むアデノウイルスの組み合わせを用いて行った：

- 1) ルシフェラーゼレポーターコンストラクト (A d G L 3 - コントロール、 A d G L 3 - t L e t - 7 F 、 A d G L 3 - t L e t - 7 R) の 1 つ、および、
- 2) 内部コントロール (A d R L - T K)、および、
- 3) U 6 プロモーターに基づく発現コンストラクト (例えば、 A d - U 6 (+ 1) - L 1 2 - g L e t - 7) 。

10

【 0 2 6 1 】

この実験において感染される細胞は H e L a または U 2 O S であった。

【 0 2 6 2 】

H e L a 細胞または U 2 O S 細胞を、ルシフェラーゼレポーターコンストラクトについては M O I 1 5 0 0 で、それとともに M O I 5 0 0 にて内部コントロール (A d R L - T K) で前 - 感染させた。4 時間後、U 6 プロモーターに基づく発現コンストラクトを M O I 3 0 0 0 または 8 0 0 0 で添加した。これらウイルスは粗溶解液であった (米国特許第 6 3 4 0 5 9 5 号) 。細胞を感染の 2 4 、 4 8 および 7 2 時間後に回収した。ノザンプロットを行ってノックダウン R N A 分子の発現レベルを測定した。

20

【 0 2 6 3 】

アデノウイルス U 6 に基づくプロモーター発現コンストラクトで感染した細胞のサンプルのノザンプロットにより、R N A 種の発現および内在性 L e t - 7 R N A のサイズに匹敵するサイズの種へのプロセッシングが示された (図 2 0) 。

【 0 2 6 4 】

ルシフェラーゼ活性を上記のデュアルルシフェラーゼキットを用いて測定した。結果を図 2 4 に示す。異なるループ配列を有する 2 つの U 6 - プロモーターに基づく発現コンストラクトについて試験した。両方の U 6 プロモーターに基づく発現コンストラクトは、L e t 7 標的配列を含むレポーターウイルス A d G L 3 - t L e t - 7 F の明白な配列特異的ノックダウンを示した。有意な抑制は L e t - 7 標的配列を欠く A d G L 3 - ウイルスについては見られなかった。これは明らかに U 6 に基づくウイルス発現コンストラクトがノックダウン活性を有することを示す。

30

【 0 2 6 5 】

好ましくは p o l I I I プロモーター (より好ましくは U 6 に基づくプロモーター) を含み、その後好ましくは 1 9 - 2 1 ヌクレオチドのガイド配列 (例えば、g G L 3 または g L e t 7) を含み、好ましくはその後連結化ループ配列 (例えば、L 1 2 または L 1 3) を含み、好ましくは続いて R N A レベルでガイド配列と塩基対を形成できる 1 9 - 2 1 ヌクレオチド配列を含み、その後好ましくは 5 以上の T 残基からなる p o l I I I 転写終結シグナルを含む発現コンストラクトが好ましい。

40

【 0 2 6 6 】

U 6 プロモーターの転写活性を得るために、転写産物の第一のヌクレオチドは好ましくは G ヌクレオチドである。この G ヌクレオチドはガイド配列の第一のヌクレオチドとすることができる。好ましくは 5 より多い T - または A 残基の内部配列は避けるべきである。というのはこれによって p o l I I I による途中の転写終結が起こってしまうからである。ループ配列は以下のものとすればよい。

L 1 2 : 5 ' - G U U G C U A U A A C - 3 ' (配列番号 3 0) ; または、

L 1 3 : 5 ' - G U U G U G C U A U C A A C - 3 ' (配列番号 6 6) ; またはその他の連結配列 (例えば実施例 2 に記載のデータを参照されたい) 。

50

【0267】

好ましくは連結化ループの下流の配列はガイド配列と塩基対形成することができるものである。転写産物の3'末端の5つのU残基からなる終結シグナルは部分的にガイド配列の5'末端に相補的なものとしてことができ、これによって転写産物は2-4ヌクレオチドのオーバーハングを3'末端に有する二本鎖構造へとフォールディングされることが予測される。例えば2ヌクレオチドの3'オーバーハングを作るためには、ガイド配列の開始ヌクレオチドは位置1(G)、位置2(GまたはA)、位置3(GまたはA)でなければならない(上記を参照されたい)。

【0268】

あるいは、連結化ループの下流の配列をガイド配列と相補的にする。この場合、3'末端のUの連続がオーバーハングを形成する。 10

【0269】

19-21ntガイド配列は、標的遺伝子における標的配列に対して塩基対形成できる配列である。上記のRNA分子において、RNA部分の順序は、5'から3'に向けて：ガイド配列、連結化ループ、ガイド配列と塩基対形成できる配列である。しかしこの順序を逆にして以下を作成しても良い(5'から3'に向けて)：ガイド配列と塩基対形成できる配列、連結化ループ、ガイド配列。上記のようにリバース方向におけるGL2.2ガイドに基づくコンストラクトは、ノザンプロットにおいて効率的な発現およびおよそ21ntのRNAへのプロセッシングを示す。

【0270】

内在性RNAのロックダウンのために、標的RNAに対応する約17から約22ヌクレオチドの配列を選択した。標的mRNAから複数の配列を選択して、特定のmRNAに対して特異的な標的配列を同定することもできる。標的mRNAに対して高い相同性を有するその他のmRNA配列との配列アラインメントを用いて特有の標的mRNAの領域を同定することもできる。あるいは、複数のmRNAの発現のロックダウンを目的とする場合、配列アラインメントを利用してその他の遺伝子に対して高い相同性を有する領域を同定することもできる。相同性の高い領域から選択された標的配列は、その配列を含むすべてのmRNAをロックダウンするであろう。 20

【0271】

ここではGNAS遺伝子(NM_000516)を例示するが本発明はこれに限定されず、その他のRNAも本方法を用いてロックダウンすることができる。 30

【0272】

GNAS標的配列(例えば、5'-CGATGTGACTGCCATCATC-3'(配列番号80))を含むU6-プロモーターに基づくコンストラクトを作成した。コンストラクトの作成は、実施例4に記載のようにPCRに基づく方法によって行っても良いし、実施例11におけるようにオリゴヌクレオチドの直接クローニングを用いて行ってもよいし、当業者に公知のあらゆる技術によって行うことができる。その結果得られたベクターアデノウイルスから、Ad-U6(+1)-gGNAS、が上記の方法によって得られた(米国特許第6340595号、米国特許第6413776号)。脊椎動物細胞に導入した後、RNAは以下の予測配列を有するベクターから転写される： 40

【0273】

5'-GAUGAUGGCAGUCACAUCGGUUUGCUAUAACCGAUGUGACUGCCAUAUC(U)₂₋₅-3'(配列番号81)。

【0274】

および以下の予測RNAフォールディングを有する：

【化39】

UG

5'-GAUGAUGGCAGUCACAUCGGUU C

CUACUACCGUCAGUGUAGCCAA U

3'-₂₋₅(U)

UA

【0275】

標的RNAの発現レベルの減少を実証するために、上記と類似の実験を行ったが、ただしレポーターウイルスは用いなかった。簡単に説明すると、例えば、HeLa細胞またはU2OS細胞を様々なMOI（MOI300、1000、3000、10000）にてAd-U6(+1)-gGNAウイルスまたはコントロールウイルスAd-U6(+1)-gGL2.2で感染させた。感染の72時間後、RNAを感染した細胞から単離した。GNA SmRNAの発現レベルをリアルタイムPCR分析およびノザンブロットティングによって分析した（図27および28を参照されたい）。 10

【0276】

リアルタイムPCR分析のために、検出は例えば、SYBR GreenまたはTaqmanプロブを用いて行った。ここでSYBR Green検出は以下のプライマーを用い標準的技術によって行った：

H P A - 03 For : TCCCTCCCGAATTCTATGAGC (配列番号82)

H P A - 03 Rev : GGCACAGTCAATCAGCTGGTAC (配列番号83)。

20

【0277】

リアルタイム分析の結果を図27に示す。値をサンプルの内部GAPDH値に対して標準化し、サンプル濃度における変動を校正した。値をAd-U6(+1)-gGL2.2を有するコントロールサンプルに比較してプロットした。

【0278】

ノザンブロットティングによる分析はRT-PCRによって得たGNA ScDNAプロブを用いて標準的技術によって行った。結果を図28に示す。ハイブリダイゼーションの前に等量のローディングをプロットのメチレンブルー染色によって確認し、これを図の下側に示す。上記の実験により、内在性遺伝子が本明細書に記載する本発明のアデノウイルスノックダウンコンストラクトによって効率的にノックダウンされることが例証された。 30

【0279】

さらなる分析において、別の内在性遺伝子を選択して本発明によるノックダウンウイルスコンストラクトによるウイルス感染の後のmRNAの配列特異的減少を例証した。標的とされる選択した遺伝子および選択した配列を以下に示す。複数の標的配列をこれら遺伝子の2つについて選択した。

【0280】

選択した遺伝子：IKKベータ(AF080158)、PPARガンマ(NM_005037)、M6PR(NM_002355)

選択した標的配列：

40

IKKベータ-1：CUUAAAGCUGGUUCAUAUC (配列番号84)

IKKベータ-2：AGAAUCAUCCAUCGGGAUC (配列番号85)

IKKベータ-3：CGUCGACUACUGGAGCUUC (配列番号86)

PPARガンマ-2：UACUGUUGACUUCUCCAGC (配列番号87)

PPARガンマ-3：UUGAACGACCAAGUAACUC (配列番号88)

PPARガンマ-4：AUUCAAGACAACCUGCUAC (配列番号89)

M6PR-2：GGAAGUAAUUGGAUCAUGC (配列番号90)。

【0281】

アデノウイルスは前述のように産生した。U2OS細胞をMOI300、1000および3000にて感染し、感染の24、48および144時間後に収集した。対応するmRN 50

A の発現レベルを以下のプライマーの組み合わせを用いて上記のようなリアルタイム PCR 分析によって測定した：

PPAR ガンマ (NM__005037)：

H P A - 0 1 R e v : GGAGCGGGTGAAGACTCATG (配列番号 9 1)

H P A - 0 1 F o r : ATTGTCACGGAACACGTGCA (配列番号 9 2)

M 6 P R (NM__002355)：

H P A - 0 4 F o r : CAGTGGTGATGATCTCCTGCAA (配列番号 9 3)

H P A - 0 4 R e v : TGCCACGCTCCTCAGACAC (配列番号 9 4)

I K K ベータ (A F 0 8 0 1 5 8)：

H P A - 0 7 F o r : GCAGACCGACATTGTGGACTTAC (配列番号 9 5)

H P A - 0 7 R e v : CCGTACCATTTCCTGACTGTCA (配列番号 9 6)

10

【0282】

図 29 A - C は MOI および時間依存的な試験した標的の mRNA レベルの特異的減少を示す。

【0283】

G N A S :

G N A S はヘテロダイマー G - タンパク質 (、 、) である G_s の G サブユニットをコードする。G タンパク質は、いわゆる G - タンパク質共役受容体 (GPCR) とよばれる 7 回膜貫通受容体と相互作用する。リガンドの GPCR に対する結合は受容体の立体配置の変化を引き起こし、その結果 G - タンパク質が活性化される。活性化された G タンパク質は サブユニットと サブユニットとに解離する。G の場合、 サブユニットはアデニル酸シクラーゼと相互作用し、この酵素を活性化する。アデニル酸シクラーゼは ATP を cAMP へと変換する。G_s と共役した GPCR の活性化はそれゆえ活性化によって細胞の cAMP レベルを上昇させる。細胞内の cAMP レベルの変化は、cAMP 応答要素 (CRE) によって測定できる。cAMP 応答要素は活性化された cAMP 応答要素結合タンパク質 (CREBP) と結合すると転写を活性化する。CREBP はタンパク質キナーゼ A (PKA) により活性化され、これは cAMP により活性化される。CRE がルシフェラーゼ遺伝子に結合すると、細胞内の cAMP レベルの変動を可視化することができる。細胞内 cAMP の上昇の結果、ルシフェラーゼ量が増加し、cAMP の減少の結果、ルシフェラーゼ含量が減少する。

20

30

【0284】

以下のアッセイは機能レベルでの G N A S のノックダウンの測定に関するものである。

【0285】

U2OS 細胞を G_s と共役した GPCR (2 アドレナリン作動性受容体) をコードする アデノウイルスコンストラクト (MOI 500) で、ルシフェラーゼ遺伝子上流に CRE 要素を担持する アデノウイルスレポーターコンストラクト (MOI 750) とともに感染させた。感染した細胞を G N A S を標的化する sRNA (配列番号 81) をコードする アデノウイルスコンストラクトまたは空のウイルス (MOI 1500) で共感染させた。

【0286】

感染の 2 日後、 2 アドレナリン作動性受容体を 2 アドレナリン作動性受容体のアゴニストである イソプロテレノールで活性化した。6 時間後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

40

【0287】

受容体の活性化の後、G N A S のノックダウンの成功の結果、空ウイルスでトランスフェクトしたコントロール細胞におけるレベルと比較して cAMP レベルはかなり低かった。

【0288】

cAMP レベルの減少が G N A S のノックダウンによるものであり、cAMP レベルに対する非 - 特異的効果によるのではないことを確認するために、フォルスコリンを三重に感染した細胞に添加した。フォルスコリンは、アデニル酸シクラーゼの直接的活性化によって細胞内 cAMP レベルを上昇させ、G - タンパク質 (G N A S) に依存しない。

50

【 0 2 8 9 】

図 3 0 は G N A S の機能的ノックダウンの測定結果を示す。アデノウイルス G N A S ノックダウンコンストラクトで感染させた細胞におけるルシフェラーゼ活性は、G N A S ノックダウンコンストラクトで感染させなかった細胞のルシフェラーゼレベルよりかなり低かった。フォルスコリンによる結果は、c A M P の減少は C R E B P の活性化につながるシグナル伝達経路の一般的な下流の効果によるのではなく G N A S のノックダウンによることが示された。

【 実施例 7 】

【 0 2 9 0 】

ヒトダイサーの共発現

10

本実施例は、ヒトダイサー c D N A のクローニングと発現について記載する。ダイサー c D N A のクローニングは鋳型として m R N A を用いた R T - P C R により達成した。ダイサーを前の実施例のコンストラクトと共発現させ、それによりコンストラクトから転写される R N A のプロセッシングを上昇させた。ヒトダイサーの共発現は系に利益をもたらす。というのはダイサーは、系を、組織または発生段階の特定の状況では低いかあるいは存在しない内在性ダイサー活性に非依存的にするからである。

【 0 2 9 1 】

生化学的および遺伝的データにより R N a s e I I I ファミリーのヌクレアーゼのメンバーであるダイサーの、二本鎖 R N A から活性の s i R N A 種への正確なプロセッシングへの関与が示された (Bernstein et al. (2001) Nature 409:363-366; Knight et al. (2001) Science 293:2269-71)。ダイサーのヒトホモログは d s R N A 基質からのおよそ 2 2 n t の R N A の形成に機能する。ダイサーはヒトにおける l e t - 7 s R N A の成熟にも必要とされる (Hutvagner et al. (2001) Science 293:834-838)。

20

【 0 2 9 2 】

ヒトダイサーホモログを逆転写酵素 - P C R および配列登録番号 N M _ 0 3 0 6 2 1 に基づくプライマーを用いてクローニングした。位置は N M _ 0 3 0 6 2 1 配列の開始点に対するものである。

【 0 2 9 3 】

【 表 2 】

30

プライマー	配列：5' から 3'	位置	配列番号
h ダイサー F 1	cgcAAGCTTGGGCATGCTGTGAT	42-61	配列番号 6 7
h ダイサー F 2	ccgaagcttatGAAAAGCCCTGCTTTGCAA	183-203	配列番号 6 8
h ダイサー F 3	ccgaagctTCCAGAGCTGGCTTATATCAG	1592-1612	配列番号 6 9
h ダイサー F 4	ccgaagcttACTGATTCTGCATATGAATGG	4611-4631	配列番号 7 0
h ダイサー R 1	ctgagctagcTTGTTAGAGCAACAGCCTAGA	6960-6940	配列番号 7 1
h ダイサー R 2	ctgagctagcTCAGCTATTGGGAACCTGAGGT	5957-5936	配列番号 7 2
h ダイサー R 3	ctgagctagcAATACACTGCTCAGTGTGCAA	4850-4830	配列番号 7 3
ダイサー R 4	hctgagctagcGATTGAACATAGGATCGATAT	1834-1814	配列番号 7 4

40

【 0 2 9 4 】

ヒトダイサー c D N A のサイズが大きいいため、クローニングはまず c D N A のより小さい

50

領域を単離することにより行った。PCR断片をサブクローニングし、ともにライゲーションして全長ヒトダイサーcDNAを得た。異なるプライマーの組み合わせを用いて異なるサイズのDNA断片を作成し、全長cDNAのクローニングを容易にした。これによってダイサーの長いcDNAが得られる問題が避けられる。しかし、コード領域の外側のプライマーを用いてラウンドにおいてクローニングすることも可能である。クローニングのためにフォワードプライマーはHindIII部位を含み、リバースプライマーはNheI部位を含むものであった。全長cDNAをpIPSPAdapt6ベクターのHindIIIおよびNheI部位にクローニングした。このベクターを用いて直接トランスフェクションするかまたはダイサーcDNAを担持し（共）感染によってそれを発現するアデノウイルスベクターを作ることによって哺乳類細胞において発現させた。

10

【0295】

クローニングされたダイサーcDNA発現プラスミドを他の実施例において記載したコンストラクトと組み合わせて哺乳類細胞に導入した。ダイサーcDNAまたはそのホモログを有するコンストラクトの共発現により転写されたsRNAのプロセッシングが促進された。

【実施例8】

【0296】

内在性に発現された21-23nt RNA配列の同定および小分子RNAの規定された発現ライブラリーの構築

本実施例はsRNAの同定と単離について記載する。

20

【0297】

21-23ntのLet-7 RNAはショウジョウバエやヒトを含む様々な動物種で保存されている (Pasquinelli et al. (2000) Nature 408:86-89)。Let-7 RNAはより長い前駆体RNAに由来する (Hutvagner et al. (2001) Science 293:834-838)。ショウジョウバエ抽出物における長いdsRNAのインキュベーションにより、dsRNAから21-23ntのsiRNAが生じることが報告された。これら21-23ntのsiRNAは単離、クローニング、および配列決定された (Elbashir et al. (2001) Genes Dev 15:188-200)。新規な内在性の21-23ntのsiRNAもこのアプローチを用いてショウジョウバエにおいて同定された (Elbashir et al. (2001) Genes Dev 15:188-200)。

30

【0298】

Let-7 RNA - ファミリーに属するsRNAを以下のように同定した。内在性 (様々なRNA起源由来; 組織、細胞型など) ヒト21-23nt-RNA配列をショウジョウバエについて記載された方法によってクローニングすることによって得た (Elbashir et al. (2001) Genes Dev 15:188-200)。

【0299】

得られた配列情報は以下の面に使用した:

1. これらを用いてこれら配列を含む発現ライブラリーが構築される。該ライブラリーは上記実施例に記載したように、let-7前駆体セグメント (let-7 5' 延長、let-7ループ、およびlet-7 3' 延長配列) と組み合わせて21-23nt RNA配列を有するキメラRNAの発現に基づく。これら21-23ntのRNAの機能およびその標的RNAは、細胞アッセイを行うことによって研究される。

40

2. 天然の21-23nt RNAの配列同定によりそのゲノム位置の探索が可能となる。このゲノム配列の同定と特徴づけにより、これらsRNAのファミリーのメンバーの産生とプロセッシングに関する情報が提供される。このファミリーの最初のメンバーであるlet-7 RNAと類似して、新しいファミリーメンバーの情報をを用いてキメラRNA発現系を先の実施例においてlet-7について説明したようにして作ることができる。さらに、ゲノム配列情報は先の実施例に記載したlet-7系の最適化に有用である。

【実施例9】

【0300】

50

sRNA種の未規定の発現ライブラリーの構築

本実施例は実施例8において同定したsRNAのクローニングについて記載する。21 - 23ヌクレオチドRNAの配列を知る必要は無い。この方法により以下からなるDNA断片を作成した(番号順) :

1. クローニングの補助のための5'リンカー配列 ;
2. 21 - 23ヌクレオチド配列、これは好ましくは標的配列に対してアンチセンスのもの ;
3. 中央リンカー(ループ)配列 ;
4. 上記2の21 - 23ヌクレオチド配列と塩基対形成することができる配列 ; および、
5. クローニングの補助のための3'リンカー配列。

10

【0301】

これらDNA断片を制限エンドヌクレアーゼで消化してベクターにクローニングした。好ましいベクターはlet - 7またはp o l I I Iプロモーターを含む発現プラスミドである。

【0302】

実施例8に記載のように、let - 7 RNAのファミリーに属する内在性sRNAをクローニングと配列決定により同定した。本実施例において、単離したsRNAは直接発現コンストラクトにクローニングし、前もってその配列を同定しなかった(図5を参照されたい) :

【0303】

1. sRNAを子ウシ腸アルカリホスファターゼで処理して5'リン酸基を除去した。

20

【0304】

2. 工程1の産物をその3'末端においてリンカー1の5'リン酸基にライゲーションして中間体ポリヌクレオチドを形成した。

リンカー1は、ステムループ構造にフォールディングされうるオリゴヌクレオチドであり、末端3'OH基を有しており、プライマーとして利用できる。好ましいオリゴヌクレオチドはステム - ループの二本鎖部分に制限部位を含む。この制限部位の存在により後の切り出しと必要に応じてリンカー配列の置換が容易となる。ライゲーションはT4RNAリガーゼを用いて行った。

【0305】

3. 工程2の産物を5'末端においてT4ポリヌクレオチドキナーゼによってリン酸化した。

30

【0306】

4. 工程3の産物をその5'リン酸末端においてリンカー2の3'OH末端にライゲーションした。リンカー2は、5'末端OH基を有するオリゴヌクレオチドである。

【0307】

5. 工程4の産物を処理してリンカー1の3'末端がアニーリングできるようにした。これをプライマーとしてリンカー1の3'末端を用いるRNaseH活性を欠く逆転写酵素による、延長反応に用いた。

【0308】

6. 工程5の産物を変性させて、プライマー4をアニーリングさせた。プライマー4は工程5の産物の端の3'末端に相補的である。注 : リンカー2とプライマー5は同一の配列を含む。

40

【0309】

7. アニーリングしたプライマー4をDNAポリメラーゼまたは逆転写酵素あるいは両者の混合物によって伸長させた。

【0310】

8. さらに任意の増幅ラウンドをプライマー4を用いて行った。増幅はクレノウフラグメントDNAポリメラーゼ、またはT4DNAポリメラーゼ、あるいは熱安定性DNAポリメラーゼを用いて行った。

50

【0311】

9. 工程7の産物（任意に行った場合は工程8の産物）を制限酵素1で消化して発現ベクターの適切な部位にクローニングした。発現ベクターは、先の実施例に記載のようにlet-7遺伝子またはpolIIIプロモーターに基づくものであり、ウイルス、例えばアデノウイルスでもよく、非-ウイルスのものでもよい。

【0312】

10. 存在するループ配列（リンカー1に埋め込まれている）が活性のsRNA種を得るために機能的でない場合、このループをその他の活性sRNAを生じるループ配列と置換した；例えば、let-7ループ配列。切断部位をリンカー1に含めてこの任意工程を可能とした。

10

【実施例10】

【0313】

内在性RNA標的に対するsRNA発現ライブラリーの構築

現在未知または特徴付けられていない遺伝子を含むあらゆる遺伝子の発現のノックダウンを可能とすることは有益であるため、本実施例では、19種類のヌクレオチドガイド配列を合成し、クローニングしてライブラリーを作る方法を記載する。

【0314】

実施例8および9と同様に、sRNA発現ライブラリーを構築した。例えば、その標的（mRNA、構造的RNAなど）を特定するsRNAの配列をデータベース、細胞抽出物から得るかまたは化学合成した。例えば、発現したRNA配列を含むデータベースから配列を得た。これにはmRNA、EST、SAGEが含まれるがこれらに限定されず、キナーゼ、プロテアーゼ、ホスホジエステラーゼ、ホスファターゼ、G-タンパク質共役受容体、成長因子、リパーゼ、ABCトランスポーター、DNase、RNaseなどを含むがこれらに限定されないタンパク質をコードするものでもしないものでもよい。構造的RNA配列（例えば、snRNA、rRNA、tRNA、snRNAなど）からの配列を用いることもできる。これらからこれら配列を含むオリゴヌクレオチドの集まりを作った。オリゴヌクレオチド混合物を、図6に概説する戦略を用いた発現コンストラクトへのクローニングに用いた。別の例は19nt配列のランダムな作成であり、これによって4¹⁹の組み合わせ（2.7 × 10¹¹）のライブラリーが生じ、これを同様に図6に概説した方法に従って発現コンストラクトにクローニングした。

20

30

【0315】

この方法の工程（1）において、特定の配列（即ちランダム配列）、N19を含むオリゴヌクレオチドを合成した。N19は5'末端側にリンカー配列が隣接しており、3'末端側にはステムループ構造へとフォールディングされることができ、末端3'OH基を含むプライマーとして利用できる配列が隣接している。この3'末端をDNAポリメラーゼまたは逆転写酵素による延長反応においてプライマーとして用いた。好ましくは、ステムループの二本鎖部分は制限部位を含む。5'リンカー配列もクローニングを容易にするために制限部位を含んでいても良い。

【0316】

工程（2）において、工程（1）の産物を変性させ、プライマー4をアニーリングさせた。プライマー4は工程（1）の産物の端の3'末端に対して相補的であった。工程（1）の最初のオリゴヌクレオチドの端の5'末端とプライマー4は同一の配列を含むものであった。5'リンカー配列が制限部位を有さない場合、プライマー4をクローニングを容易にするために制限部位を含むように設計すると良い。

40

【0317】

工程（3）において、アニーリングしたプライマー4をDNAポリメラーゼまたは熱安定性DNAポリメラーゼ（例えば、Taq）によって延長した。

【0318】

任意の工程（4）は、DNAポリメラーゼによるコンストラクトのさらなる増幅を提供する。

50

【0319】

工程(5)において、工程(3)の産物または任意工程(4)の産物を制限酵素1(E1)で消化し、適当な制限部位を有する発現ベクターにクローニングした。好ましい発現ベクターはlet-7またはp01IIIプロモーターを含むものである。記載した方法は特にプールされたレトロウイルスまたはレンチウイルスまたはAAVあるいは組み込みアデノウイルスsRNA発現ライブラリーの構築に好適である。

【0320】

任意の工程(6)において、ループ配列が活性のsRNA種を得るために機能的でない場合、それを活性のsRNAを生じる別のループ配列に置換しても良い；例えば、let-7ループ配列である。制限酵素3および4(それぞれE3およびE4)によって認識される制限部位をステムループ配列に含めて置換を可能にした。

10

【実施例11】

【0321】

sRNA発現ライブラリーの産生

好ましい発現コンストラクトは標的RNAを非常に強くノックダウンするレベルにてsiRNAを生じさせる。例えば、先の実施例に記載のU6プロモーターに基づく発現コンストラクトである。

【0322】

これら標的に対して向けられたオリゴヌクレオチドを設計することができ、ノックダウン発現クローンの構築に用いた。好ましくは、フォワード(F)オリゴヌクレオチドは標的に対するガイド配列、次いで連結化ループ配列、その後にガイド配列と塩基対を形成することができる配列を含むが、ガイド配列とその相補鎖の順序は逆にしても良い。リバーズ(R)オリゴヌクレオチドは、同族のフォワードオリゴヌクレオチドに対して相補的である。フォワードおよびリバーズオリゴヌクレオチドの特定の対を互いにアニーリングさせて二本鎖構造を形成させ、これを発現ベクターへのクローニングに用いた。アニーリングしたFおよびRオリゴヌクレオチドはクローニングベクターのオーバーハングとマッチする適当なオーバーハングを備えるように設計されている場合は直接クローニングしてもよいし、制限酵素で消化してクローニングベクターのオーバーハングとマッチする適当なオーバーハングを作成してからクローニングしてもよい。

20

【0323】

内在性標的に対するライブラリーの構築は好ましくは、アニーリングしたオリゴヌクレオチドが直接クローニングされたDNAベクターコンストラクトを用いて行うのが好ましい。

30

【0324】

例えば、U6プロモーターに基づく発現コンストラクトを作成するためには、酵素SapIによって直鎖配列に変換されるベクターを作成する。SapIはその認識部位(GCTCTTC(N)₁₋₄)の近くを切断する。これは、あらゆる配列を切断することができ、認識配列は切り出された断片に存在し、最終コンストラクトには存在しないという点で有用である。したがって、あらゆる配列をベクターの直鎖化に選択することができる。それゆえそれは様々なプロモーターに基づく発現プラスミドの構築に用いられ、配列を破壊することが無い。好ましくは、U6プロモーターは異なるオーバーハングを有する両方のクローニング部位の作成に用いられる。さらにクローニング効率を向上させるために、切り出される断片に大腸菌致死遺伝子である、ccdBを含めた。制限断片が切り出されず、ccdB遺伝子がプラスミド中に残った場合は、トランスフェクションの後に大腸菌コロニーが形成されなかった(図25A)。正しい発現プラスミドを含む大腸菌のみがコロニーを形成した。接合部の配列を模式的に図25Bに示す。

40

【0325】

アニーリングしたオリゴヌクレオチドは以下の配列を有し、上記のようにSapI消化の後にU6プロモーターに基づくベクターに直接クローニングすることができた：

フォワードオリゴヌクレオチド：

50

5' -ACC-G-N18--ループ-N18*-C-TTT-3'

リバーズオリゴヌクレオチド:

3' -C-N18*-ループ*-N18-GAAAAAT-5'

【0326】

pol III プロモーターを用いる場合は、第一のヌクレオチドは転写を促進するために、好ましくはG-ヌクレオチドである。それゆえ、好適な態様において、19 nt ガイド配列はG-N18である。N18*-Cは19 nt ガイド配列(G-N18)と塩基対形成することができる配列であり、ループは連結化ループ配列であり、ループ*はループの相補鎖である。図25Bも参照されたい。

【0327】

オリゴヌクレオチドをより小さく設計した。即ち、56ヌクレオチドではなく51 nt とした:

フォワードオリゴヌクレオチド:

5' -CC-G-N18--ループ-N18*-3'

リバーズオリゴヌクレオチド:

3' -N18*-ループ*-N18-GAA-5'

【0328】

これにともなって発現ベクターを適合させる必要があった。図26を参照されたい。

【0329】

本発明を用いてランダム標的配列を作り、未規定のライブラリーを作成することができる。標的配列は未知であるが、好ましくはGで開始することによりPol IIIによる翻訳を容易にする。これらオリゴヌクレオチドにより4¹⁸の組み合わせを有するライブラリーを作成することができた(6.87 × 10¹⁰)。

【0330】

上記のように作成した非-ウイルスDNA発現ライブラリーを用いて疾患関連細胞アッセイを行ってノックダウン-誘導性表現型をスクリーニングすることもできる。これはリポフェクタミンまたはPEIなどの当該技術分野で公知のDNA移入方法を用いてアレイに並べた集団としてDNAをトランスフェクトすることによって行う。かかるライブラリーは、ベクター中にライブラリーを作成するのに先立って発現プラスミドにおいて選抜可能なマーカーを含めることによって個々のまたは複数の遺伝子が安定にノックダウンされた細胞系の集まりを作成するのに用いる。

【0331】

個々のノックダウンコンストラクトを様々な程度にプールにしても良い。コンストラクトの1つの大きなプールとしても良く、かかるプールのサブセットにしても良い。プールのセットおよびサブセットは疾患関連アッセイに用いることができ、表現型は選抜可能な表現型、例えばフローサイトメトリーの表現型(例えば、マーカーの誘導または抑制)あるいは成長優性の(growth advantage)表現型とする。

【実施例12】

【0332】

アレイに並べたアデノウイルスライブラリーの構築

本実施例はアレイに並べたアデノウイルスsRNA発現ライブラリーの構築について記載する。「アレイに並べたアデノウイルスsRNA発現ライブラリー」とは、アデノウイルスの集団(複数ウェルプレート、例えば96または384ウェルプレートに含まれたもの)であって様々な(ヒト)sRNAの発現を媒介し、それぞれのウェルが1つの遺伝子を標的とするsRNA発現コンストラクトを担持する特有の組換えウイルスを含む。即ちウェル当たり1つの標的遺伝子である。アレイに並べたアデノウイルスライブラリーについての詳細は国際特許出願WO99/64582号、米国特許第6340595号および第6413776号(Arrayed adenoviral libraries for performing functional genomics)を参照されたい。特定の内在性mRNAを下方制御するsRNAを発現するアレイに並べたアデノウイルスライブラリーを用いて、疾患関連ヒト一次細胞型、例えば、HUV

10

20

30

40

50

ECを含む細胞を感染させることができる。これらアッセイを用いて発現したsRNAにより、代謝経路、例えばNf k a p p a B経路を特異的に阻害する遺伝子をスクリーニングすることができ、それによってサイトカイン、例えば、IL8の上方制御を阻害することができる。

【0333】

A. アデノウイルスのアレイに並べたsRNAライブラリーの構築

オリゴヌクレオチドを特定の遺伝子から転写される特定のmRNAを標的化するように設計し、ノックダウンアデノウイルス発現クローンの構築に用いた。好ましいオリゴヌクレオチドは、標的に対するガイド配列を含む第一の配列（フォワード（F））が、共有結合によりステム-ループ第二の配列に連結しており、第二の配列が第一の配列と塩基対形成することができる第三の配列に共有結合により連結するように設計したものである。別の態様はガイド機能を逆にしたものであり、その結果、第三の配列がガイド配列として働く。リバーズ（R）オリゴヌクレオチドは同族のフォワードオリゴヌクレオチドに対して相補的である。フォワードおよびリバーズオリゴヌクレオチドの特定の対を互いにアニーリングさせて二本鎖構造を形成させ、プロモーター、例えばpolIII-依存的let-7またはU6プロモーターを含むpIPspAdapt6（国際特許出願第WO99/64582号に記載）に基づく発現ベクターへのクローニングに用いた。発現カセットにさらに1または複数の特有の制限酵素認識配列を含めても良く、それによって内在性mRNAに対するsRNA配列をコードするアニーリングしたFおよびRオリゴヌクレオチドを方向性にライゲーションさせることができる。一本鎖オリゴヌクレオチド成分を合成して96または384ウェルプレートにおいてアニーリングさせて二本鎖オリゴヌクレオチドを作成しても良い。

10

20

【0334】

sRNA Adapterプラスミドのアレイを次いで、アレイに並べた形式において宿主微生物に形質転換した。宿主微生物は例えば、細菌、好ましくは大腸菌（株DH10B）またはアデノウイルスITRを含むコンストラクトの増殖に好適な株である。形質転換した細菌を播種し、6ウェルLB-アンピシリンプレートで増殖させ、その後コロニーピッカーで個々の細菌コロニーをピックアップし、さらに96ウェルプレートにおいて液体LB増殖培地（+100μg/mlアンピシリン）に播種した。

【0335】

本発明の好ましい方法は、96ウェル大腸菌形質転換プレートから直接液体培養を開始し、個々のコロニーを播種したりピックアップしない。両方の場合において結果として得られる96ウェルプレートを回転式振盪培養機（New Brunswick Scientific、Innova、床式またはその均等物）で37で300rpmにてインキュベートした。細菌を約12から約24時間培養した後、約100μlの細菌培養液を100μlの50%グリセロールとMultimekロボット（Beckman Coulter）またはその均等物を用いて混合し、80で保存した。これらプレートを「グリセロールストックプレート」と称する。

30

【0336】

B. プラスミドDNAの調製

アデノウイルスsRNA発現ライブラリーの構築における第二の工程は、アデノウイルス産生に十分な量における一次ライブラリーからの個々のプラスミドのDNAのアレイに並べた精製である。この目的のため、細菌培養物を以下のように調製した。グリセロールストックプレートを解凍し、3μlの細菌培養物をCybiWellロボット（CyBio）を用いて280μlの液体LB増殖培地（+100μg/mlアンピシリン）を満たした96ウェルプレートに移した。これらの播種したプレートを次いで回転式振盪培養機（37、300rpm）（New Brunswick Scientific、Innova、床式）で18時間インキュベートした。96ウェルプレートを遠心分離し（3分間、2700rcf）、細菌をペレットにした。96ウェルプレートの遠心分離はすべてエッペンドルフマイクロタイタープレート遠心機（5810型）で行った。上清をデカントによって廃液コンテナに捨てた。細菌細胞の溶解とタンパク質およびゲノムDNAの沈降は常套のアルカリ法によって行った

40

50

。アルカリ法を行うために用いたバッファは、Qiagen(P 1、P 2、P 3)から購入した。第一の工程において、細菌ペレットを60 μ lのバッファP 1に再懸濁した。第二の工程において、60 μ lのバッファP 2を再懸濁した細菌細胞に添加した。溶液をおだやかに混合し、5分間のインキュベーション時間を設けて完全に細胞を溶解した。最後に、60 μ lのバッファP 3を添加し、混合工程を設けてタンパク質とゲノムDNAを沈降させた。96ウェルプレートを次いで遠心分離した(40分間、3220 rcf)。上清(100 μ l)を回収し、80 μ lのイソプロパノール(プラスミドDNA沈降用)を含む新しいV底96ウェルプレートにCybiWellロボット(CyBio)を用いて移した。ペレットを含有するプレートを破棄した。96ウェルプレートを遠心分離し(45分間、2700 rcf)、上清をデカントによって廃液コンテナに捨てた。微量の塩を除くために、ペレットを100 μ lの70%エタノールで洗浄し、96ウェルプレートを再び遠心分離した(10分間、2700 rcf)。上清を再びデカントによって廃液コンテナに捨て、DNAペレットを層状気流キャビネットにて1時間乾燥させた。最後に、DNAを20 μ lの無菌TEバッファ(1 mM Tris-HCl (pH 7.6)、0.1 mM EDTA)に溶解した。コンストラクトの完全性を制限酵素マッピングおよびアレイ全体またはその一部の配列決定によって評価した。溶解したDNAを含むプレート(以後DNAプレートと称する)を次に使用するまで-20 で保存した。

10

【0337】

C. DNA定量

PER. C6/E2A細胞のトランスフェクションに用いる前に、96ウェルプレートに含まれたプラスミドDNA調製物を定量した。この目的のため、5 μ lのプラスミドDNAをDNAプレートからピペットで取り、100 μ lのTEバッファを含有する96ウェルプレートに移した。100 μ lの「定量溶液」を添加した。この溶液は、2 μ lのSybr Green (Molecular Probes)を10 mlのTEバッファに溶解することによって調製した。混合工程の後、Fluorimeter (Fluostar, BMG)において測定を行った。以下の設定を用いた：発光：485 nm；励起：520 nm、ゲイン：35。標準DNAサンプル(ラムダDNA)の様々な希釈液(TEバッファ中)を用いて測定を行うことによって標準曲線を作成した。この曲線に個々のDNAサンプルについての結果を当てはめることにより、ウェル当たりのDNA濃度を算出した。各DNAプレートのウェル当たりの平均DNA濃度を次に計算した。平均すると、DNA濃度20 - 100 ng / μ lのDNAが得られた。

20

30

【0338】

D. Per. C6/E2A細胞のトランスフェクション

pIPSPAdApt6プラスミド型は、E1遺伝子が欠失し、プロモーター(1et-7-またはpolIII-由来)が導入されたアデノウイルス血清型5ゲノムの5'部分(bp1-454およびbp3511-6093)を含む。プラスミドpIPSPAdApt6とは対照的に、pIPSPAdAptのsRNA発現誘導体はCMVプロモーターおよびSV40ポリアデニル化部位を欠く。組換えアデノウイルス粒子の作成に必要とされる2つのほかの材料は、コスミドおよびパッケージング細胞系(国際特許出願第WO99/64582号、米国特許第6340595号)。コスミド(pWE/Ad.AflII-I-ritrE2A)はアデノウイルス血清型5ゲノム(bp3534-35953)の主な部分を含むが、E2A遺伝子が欠失している。Per. C6/E2Aパッケージング細胞系は、E1およびE2A遺伝子の発現を媒介するプラスミドでトランスフェクトされたヒト胚網膜細胞(HER)由来である。PER. C6/E2A細胞系のゲノムに組み込まれたアデノウイルス遺伝子は、アダプタープラスミドおよびコスミド上のアデノウイルス配列と相同性を共有しない。その結果、複製能力のあるアルアデノウイルス(RCA)を含まないベクターストックが調製された。

40

【0339】

ウイルスを得るため、このアダプタープラスミドをコスミドとともにパッケージング細胞系PER. C6/E2A.に共-トランスフェクトした。アダプターおよびヘルパープラ

50

スミドが P E R . C 6 / E 2 A 細胞系にトランスフェクトされると、完全な A d 5 ゲノムが相対的組換えによって再構成された。ヘルパーおよびアダプタープラスミドは相対的配列 (b p 3 5 3 5 - 6 0 9 3) を含み、これはこの組換え現象の基質である。上記のように調製し、定量した D N A プレートを用いて P E R . C 6 / E 2 A 細胞系のトランスフェクションを行った。このトランスフェクションの前に、これらプレートに含まれるプラスミドを P I - P s p I 制限酵素 (New England Biolabs) による消化によって直鎖化した。この目的のため、一定容量のプラスミド D N A (各 D N A プレートの平均 D N A 濃度から計算して、平均 6 6 . 7 n g の D N A を表す) を D N A プレートからピペットで V - 底 9 6 ウェルプレートに移した。このプレートは 1 x 制限バッファー (New England Biolabs : 1 0 m M T r i s - H C l (p H 8 . 6) 、 1 0 m M M g C l ₂ 、 1 5 0 m M K C l 、 1 m M D T T) 、 1 0 0 μ g / m l B S A および 6 ユニットの P I - P s p I 制限酵素 (2 0 U / μ l のストックからのもの) から構成される制限混合物を含む。各 D N A プレートについて、等容量のプラスミドを全てのウェルに用いた。D N A サンプルを D N A プレートから制限混合物を含むプレートに移し、続く混合を J o B i ウェルロボット (CyBio) を用いて行った。制限混合物を含むプレートを湿らせたペーパータオルを含むプラスチック箱に置き (蒸発を避けるため) 、 6 5 ° で 4 時間インキュベートした。ヘルパープラスミド (p W E / A d . A f l I I - r I T R E 2 A) (Q i a g e n M a x i - p r e p キットを用いてバッチで調製した) も P a c I 制限酵素 (New England Biolabs) で直鎖化した。

10

20

30

40

50

【 0 3 4 0 】

直鎖化したアダプターおよびヘルパープラスミドによる P E R . C 6 / E 2 A 細胞のトランスフェクションは下記のように設定した。0 . 1 8 6 7 μ l の直鎖化したヘルパープラスミド (9 3 n g の D N A を含有) を 1 . 1 1 μ l の無血清 2 x D M E M (Life Technologies) と混合して「ヘルパー混合物」を形成させた。0 . 5 9 7 μ l のリポフェクタミン (Life Technologies) を 1 . 1 1 μ l の 2 x D M E M と混合して「リポ混合物」を形成させた。直鎖化したアダプタープラスミドを含む 9 6 ウェルプレートの各ウェルに、1 . 3 μ l の「ヘルパー混合物」および 1 . 7 μ l の「リポ混合物」を C y B i - ウェルロボット (CyBio 、 「ドロップター」を備えている) を用いてピペットによって入れた。プレートを次いでおよそ 1 時間室温でインキュベートした後、2 8 . 5 μ l の無血清 D M E M を添加した。混合は混合物のピペッティングを上下に 3 回することによって行った (C y B i ウェルロボット) 。同じ装置を用いて、3 0 μ l の混合物を $2 . 2 5 \times 1 0^4$ 細胞 / ウェルの密度で播種した P E R . C 6 / E 2 A 細胞を含む 9 6 ウェルプレートに移した。細胞を 1 0 0 μ l の P E R . C 6 / E 2 A 培地 (1 0 % F B S (Life Technologies) 、 5 0 μ g / m l ゲンタマイシンおよび 1 0 m M M g C l ₂ を含む D M E M (Life Technologies) から構成される) に播種したが、3 0 μ l の D N A / リポフェクタミン混合物の添加に先立って、プレートのすべてのウェルから培地を除去した。3 9 ° で 3 時間、1 0 % C O ₂ でのインキュベーションを行った。1 7 0 μ l の P E R . C 6 / E 2 A 培地をプレートに添加し、3 9 ° 、 1 0 % C O ₂ でのインキュベーションを一晩行った。トランスフェクトした P E R . C 6 / E 2 A 細胞を含む 9 6 ウェルプレートを 3 4 ° 、 1 0 % C O ₂ で 3 週間インキュベートした。この温度によってアデノウイルス複製に必要な E 2 A 因子の発現が可能となる。このインキュベーション期間の間に、ウイルスが作成および複製された。これは C P E (細胞変性効果) の出現によって明らかとなった。C P E を示すウェルのパーセンテージを手操作または自動イメージスキャナーおよび適切なアルゴリズムを用いてスコア付けし、これによってウイルス産生効率の評価が可能となった。9 6 ウェルプレートを - 8 0 ° でさらにウイルスを増殖させるまで保存した。

【 0 3 4 1 】

E . ウイルス増殖

最終のウイルス増殖工程は、C P E およびより均質の (homogenous) ウイルスタイターを示すより高いパーセンテージのウェルを得ることを目的とする。ウイルスを以下の手法に従って増殖させた。- 8 0 ° で保存したトランスフェクションプレートを室温で約 1 時間解

凍した。96チャンネルHydraディスペンザー (Robbins) を用いて、20 μ l の上清を96ウェルプレートにおける180 μ l のDMEM + 10% FBS中の 2.25×10^4 細胞/ウェルの密度で播種したPER.C6/E2A細胞に移した。一連の96ウェルスを操作した後、ディスペンザーのニードルを60 μ l の5%漂白剤で3回ピペッティングすることによって消毒、滅菌した。ニードルに存在する残った漂白剤を70 μ l の滅菌水で3回洗浄することによって除去した。細胞を34、10%CO₂でおよそ10日間インキュベートし、CPEを示すウェルの数をスコア付けした。概して、CPEを示すウェルの数は増殖の後増加していた。プレートを次いで-80で保存した。

【0342】

増殖工程後のライブラリーウイルスを含有する200 μ l の粗細胞溶解液から、96 - チャンネルHydraディスペンザーを用いて25 μ l の6のアリコットを384ウェルプレートに調製した。4つの96ウェルプレートから、6つの同一の384ウェルアリコットプレートを調製した。個々のプレートの間においてニードルの消毒を3回の200 μ l の5%漂白剤での3回の洗浄工程および残った漂白剤を除くための3回の250 μ l の滅菌水での洗浄工程によって行った。384ウェルアリコットプレートをアッセイにおいてさらに使用するまで-80で保存した。

10

【0343】

ライブラリー構築の模式図を図7に示す。

【0344】

さらにウイルスコートタンパク質に改変を導入して、異なるまたは向上した親和性 (tropism) を得た (欧州特許第1191105号)。

20

【0345】

上記のアレイに並べたアデノウイルスライブラリーを疾患関連細胞アッセイに用いてノックダウン誘導性細胞表現型についてスクリーニングすることができる。かかるライブラリーは特にアデノウイルスベクターコンストラクトがアデノウイルスベクターを組み込んでいる場合、例えば米国特許第6051430号または国際特許出願第WO99/32647号/欧州特許第1042494号およびVirology 2001 Sep 30; 288(2): 236-46に記載のような場合に有用である。かかるアデノウイルスsRNA発現ライブラリーにより、個々のまたは複数の遺伝子が安定にノックダウンされた細胞系のライブラリーが得られた。個々のノックダウンアデノウイルスはアレイとして用いることもできるし、様々な程度に

30

【実施例13】

【0346】

アレイに並べたAAVライブラリー構築

本実施例はアレイに並べたAAVsRNA発現ライブラリーの構築について記載する。これは、複数ウェルプレート、例えば96または384ウェルプレートに含まれた、様々な特有の(ヒト)sRNAの発現を媒介するアデノウイルス随伴ウイルス(AAV)ベクターの回収を含む。各ウェルは特定の遺伝子を標的とするsRNA発現コンストラクトを担持する特有の組換えAAVベクターを含む。特定の内在性mRNAを下方制御するsRNAを発現するアレイに並べたAAVライブラリーを用いて、例えばHUVECなどの疾患関連ヒト一次細胞型を含む細胞を感染させて、sRNAの発現により、例えばNfkapB経路などの代謝経路を特異的に阻害する遺伝子をスクリーニングすることができ、それによって1または複数のサイトカイン、例えば、IL8の産生を下方制御することができる。

40

【0347】

A. AAVに基づくsRNAライブラリーの構築

50

特定の遺伝子から転写される特定の mRNA を標的とするオリゴヌクレオチドを設計し、ノックダウン AAV 発現クローンの構築に用いた。好ましいオリゴヌクレオチドは上記のように設計されたものである（実施例 12）。フォワードおよびリバースオリゴヌクレオチドの特定の対をアニーリングさせて二本鎖構造を形成させ、これを AAV ITR 配列、AAV パッケージングシグナル（米国特許第 6140103 号を参照）およびプロモーター、例えば、p o l I I I - 依存的 l e t - 7 または U 6 プロモーターからなる AAV 発現ベクターへのクローニングに用いた。発現カセットはアニーリングした F および R オリゴヌクレオチドを方向性にライゲーションするためにさらに特有の制限酵素認識配列を含んでいても良い。

【0348】

10

sRNA - AAV ライゲーションのアレイを次いで再びアレイに並べた形式において、宿主微生物、例えば、細菌、好ましくは大腸菌（株 DH10B）または AAV ITR を含むコンストラクトの増殖により適した株に形質転換した。形質転換された細菌を播種し、6 ウェル LB - アンピシリンプレートで培養し、その後コロニーピッカーにより個々の細菌コロニーをピックアップし、さらに 96 ウェルプレートにおいて液体 LB 増殖培地（+ 100 μ g / ml アンピシリン）に播種し、その後プラスミド DNA を単離した。

【0349】

本発明の好ましい方法では、個々のコロニーを播種したりピックアップしたりせず、直接 96 ウェル大腸菌形質転換プレートから液体培養を開始する。両方の場合において結果として得られた 96 ウェルプレートを回転式振盪培養機（New Brunswick Scientific、Innova、床式またはその均等物）で 37、300 rpm でインキュベートした。細菌を約 12 から約 24 時間培養した後、約 100 μ l の細菌培養物を Multimek ロボット（Beckman Coulter）またはその均等物を用いて 100 μ l の 50% グリセロールと混合し、-80 で保存した。これらプレートを「グリセロールストックプレート」と称する。これらの「グリセロールストックプレート」から、プラスミド DNA を実施例 12 に記載のように調製および定量することができる。

20

【0350】

B. アレイに並べた形式において AAV ウイルス粒子を作成するための細胞のトランスフェクション

アレイに並べた AAV 収集物を作成するために、AAV ウイルス粒子を A に記載のアレイに並べた sRNA - AAV プラスミド DNA から、AAV パッケージング細胞系または一過性 AAV パッケージング系を用いて産生した。AAV パッケージング細胞系または米国特許第 6140103 号に記載のその誘導体を用いるとよい。あるいは、パッケージングシグナルを有しない rep - cap 発現コンストラクトまたはそのほかの sRNA - AAV コンストラクトとのオーバーラップと、アレイに並べた sRNA - AAV DNA の一過性共 - トランスフェクションをソラレン処理したアデノウイルスで感染した細胞に対して行って、ヘルパーアデノウイルスの必要なヘルパー遺伝子をトランスにて提供した。両アプローチについて、トランスフェクトされる細胞系は 96 ウェルプレートに播種した。ウイルス産生、増殖およびタイター測定は AAV ベクター技術の分野で知られた方法で行った。96 ウェルプレートにおいて AAV sRNA - ウイルスを産生した後、液体ハンドラーを用いて 384 ウェルアリコットプレートに再びアリコットとし、さらに使用するまで -80 で保存した。

30

40

【0351】

上記のアレイに並べた AAV ライブラリーは様々な程度でプールすると良い。即ち、レトロウイルスの 1 つの大きなプールまたは、かかるレトロウイルスプールのサブセットとすればよい。プールのセットおよびサブセットを用いて疾患関連細胞アッセイを行って、ノックダウン誘導性表現型をスクリーニングすることができる。また、これら AAV sRNA 発現ライブラリーを用いて安定にノックダウンされた個々のまたは複数の遺伝子を有する細胞系の収集物を作成することができる。

【実施例 14】

50

【0352】

sRNAを発現するレトロウイルスライブラリー

本実施例において、モロニーマウス白血病ウイルスに基づくレトロウイルスプラスミド LZRSpBMN-LacZを用いた (Kinsella TM and Nolan GP (1996)。エピソードのベクターは迅速かつ安定に高-タイターの組換えレトロウイルスを産生する。Hum. Gene Ther. 7:1405-13)。

【0353】

A. レトロウイルスに基づくsRNAライブラリーの構築

LZRSpBMN-LacZにおいては、LacZ遺伝子がenv-pol配列を置換している。さらに、EBV EBNA-1遺伝子およびEBV oriP複製起点がプラスミド骨格に存在している。これによってパッケージング細胞におけるプラスミドのエピソード性の複製が可能となる。このようにして、パッケージング細胞の一過性トランスフェクションの後に高いタイターの上清を作成することができた。トランスフェクトされた細胞を選抜した。これはホスホグリセロールキナーゼ-1プロモーターの制御下にピューロマイシン耐性遺伝子もプラスミド骨格に存在しているためである。ピューロマイシンの存在下でトランスフェクトされたパッケージング細胞を培養することにより、通常高いタイターの上清が得られる。

10

【0354】

上記のキメラRNAを発現させるため、LZRSpBMN-LacZベクターをさらに発現カセットをLacZ遺伝子と置換することによって改変した。この発現カセットは偏在的に活性なプロモーター、とりわけ、U6およびlet7プロモーターを含むがそれらに限定されないRNAポリメラーゼIII (polIIIプロモーター) によって認識されるプロモーターを含む。発現カセットは当業者に周知のようにレトロウイルスベクターのウイルス骨格中の様々な位置にいずれの方向でもクローニングすることができる (例えば、Medina MF, Joshi S. RNA-polymerase III-driven expression cassettes in human gene therapy. Curr Opin Mol Ther 1999 Oct; 1(5): 580-94を参照されたい)。

20

【0355】

発現カセットにはさらに、内在性mRNAに対するsRNAをコードするアニーリングしたFおよびRオリゴヌクレオチドを方向性にライゲーションおよびクローニングするために特有の制限酵素認識配列を含めた (実施例10を参照されたい)。

30

【0356】

オリゴヌクレオチドは前記のように設計した。フォワードおよびリバースオリゴヌクレオチドの特定の対をアニーリングさせて二本鎖構造を形成させ、改変されたLZRSpBMN-LacZベクターまたはその均等物へのクローニングに用いた。一本鎖オリゴヌクレオチド成分を96または384ウェルプレートで合成およびアニーリングさせて二本鎖オリゴヌクレオチドを作成することができる。

【0357】

アレイに並べたレトロウイルスプラスミド-sRNAライゲーションのライブラリーを再びアレイに並べた形式において、宿主微生物、例えば細菌、好ましくは大腸菌 (株DH10B) またはかかるコンストラクトの増殖により適した株に形質転換した。形質転換された細菌を6ウェルLB-アンピシリンプレートに播種して培養し、その後コロニーピッカーで個々の細菌コロニーをピックアップし、さらに96ウェルプレートにおいて300 μ lの液体LB増殖培地 (+ 100 μ g/mlアンピシリン) に播種し、その後プラスミドDNAの単離を行った。

40

【0358】

本発明の好ましい方法では、個々のコロニーの播種やピックアップをせずに、96ウェル大腸菌形質転換プレートから直接液体培養を開始する。両方の場合において結果として得られた96ウェルプレートを37 $^{\circ}$ Cで300 rpmで回転式振盪培養機 (New Brunswick Scientific、Innova、床式またはその均等物) でインキュベートした。約12から約24時間細菌を培養した後、約100 μ lの細菌培養物をMultimekロボット (Beck

50

man Coulter) またはその均等物を用い $100 \mu\text{l}$ の 50% グリセロールと混合し、 -80 で保存した。これらプレートを「グリセロールストックプレート」と称する。これら「グリセロールストックプレート」から、プラスミド DNA を実施例 12 に記載のように調製および定量することができる。

【0359】

B. トランスフェクションおよびウイルス回収

好適なパッケージング細胞系を次いで精製レトロウイルスプラスミド-sRNA コンストラクトからアレイに並べたレトロウイルスライブラリーを作成するのに用いた。好適なパッケージング細胞系は Phoenix (NX) パッケージング細胞によって提供されるものであるが (Nolan GP and Shatzman AR (1998)、Expression vectors and delivery systems, Curr. Opin. Biotechnol. 9: 447-450)、そのほかのパッケージング細胞も同様に好適である。Phoenix 細胞は 2 種類のコンストラクトから gag/pol および env タンパク質を発現し、これによって複製能力のあるレトロウイルスの作成の機会が最小化される。さらに、これらコンストラクトのそれぞれに選抜マーカが存在するため、それを保持している細胞の選抜が可能となる。

【0360】

エコトロピック (ecotrophic) パッケージング細胞 (NX-E) は、げっ歯類細胞のみに感染できるレトロウイルスを産生するが、広宿主性 (NX-A) パッケージング細胞において産生されたウイルスは様々な起源からの細胞に感染することができる。NX 細胞は組織培養ペトリ皿に良好には接着しない。トリプシン処理はできるだけ短くし、細胞が集密または過集密下で培養しないように注意すべきである。

【0361】

パッケージング細胞のトランスフェクションは常套の標準的リン酸カルシウム共沈を用いて行ったが、他の方法、例えばリポフェクタミンおよび PEI (国際特許出願第 WO 99/64582 号、米国特許第 6340595 号および米国特許第 6413776 号) も同様に好適である。このため、細胞系を 96 ウェルプレートに播種した。ウイルス産生、増殖およびタイター測定はレトロウイルスベクター技術の分野で公知の方法によって行えばよい。96 ウェルプレートでのレトロウイルス-sRNA ウイルスの産生後、トランスフェクトされた細胞を液体ハンドラーを用いて 384 ウェルアリコットプレートにてアリコットとすればよい。

【0362】

ウイルス粒子を単離するために、レトロウイルス-含有上清の回収はトランスフェクションの 24 時間後に培地を新鮮な培地に交換することによってはじめると良い。24 時間の回収時間で通常高いタイターの上清を得るのに十分である。このため、培地をおだやかに皿から取り除き、 $3000 \times g$ で遠心分離し、アリコットとした。アリコットは -80 で保存すると少なくとも 6 ヶ月は安定である。

【0363】

別法として、細胞をトリプシン処理してトランスフェクトされた細胞を選抜し、 2.5 mg/ml のピューロマイシンを追加した培地を含む新しいプレートに移した。選抜は 8 日間の最小期間は行わなくてはならない。この期間の後、培地をピューロマイシンを含まない通常の培地と交換した。24 時間、培地を新しい培地と交換することによってレトロウイルス-含有上清を回収した。上清を $3000 \times g$ で遠心分離し、アリコットとして -80 で保存した。

【0364】

上記のアレイに並べたレトロウイルスライブラリーを疾患関連細胞アッセイに用いてノックダウン誘導性表現型をスクリーニングすることができる。これらレトロウイルス-sRNA 発現ライブラリーを用いて、安定にノックダウンされた個々のまたは複数の遺伝子を有する細胞系の収集物を作成することもできる。

【0365】

個々のノックダウンレトロウイルス、例えば上記ライブラリーのその他のベクターに基づ

10

20

30

40

50

くメンバーなどを様々な程度にプールしても良い。即ち、1つの大きなレトロウイルスのプールまたはかかるレトロウイルスプールのサブセットとしてプールすればよい。プールのセットおよびサブセットを疾患関連アッセイに用いることができる。ここで表現型は選抜可能な表現型、例えばフローサイトメトリー表現型（例えば、マーカーの誘導または抑制）あるいは増殖に有利な表現型である。

【実施例 15】

【0366】

ウイルス産生の間に外来遺伝子の発現を抑制するための s i R N A
アデノウイルスおよびレトロウイルス産生の間の外来遺伝子の発現のロックダウンのための s R N A を用いる非限定的な例を以下に示す。

10

【0367】

アデノウイルス産生：

C M V プロモーターの転写開始点およびアデノウイルスベクター p I P s p A d a p t 6 のポリリンカーの間の特有の配列を用いて遺伝子を下方制御した。これら配列は常に転写された m R N A の部分であり毒性タンパク質の配列には依存しない。この配列を以下に示す（配列番号 97）

5' -TCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGG AACGGTGCATTGGAAGCTTGGTACCGGTGAATTGCGCGGCC-3'

【0368】

別法として、毒性タンパク質をコードする m R N A における特有の核酸配列をロックダウンコンストラクトのための標的配列として用いることができる。これら配列を標的とする本発明のポリヌクレオチド配列または該ポリヌクレオチド配列をコードするベクターをウイルスプラスミドとともにパッケージング細胞に共 - トランスフェクトして外来タンパク質産生を抑制することができる。あるいは、本発明のポリヌクレオチド配列、または該ポリヌクレオチド配列をコードするベクターをパッケージング細胞に安定に組み込んでも良い。

20

【0369】

レトロウイルス産生：

外来遺伝子を含むレトロウイルスベクターは、2つのスプライス部位である、スプライス供与部位とスプライス受容部位に囲まれたパッケージングシグナルを含む。ウイルス R N A の複製にはベクター全体の転写が必要である。しかし、パッケージングシグナルはタンパク質産生の前にスプライシングにより切り出されて m R N A が生じる。ウイルス R N A の複製を可能にし、外来遺伝子の発現を抑制するために、スプライス供与部位およびスプライス受容部位に隣接する配列を本発明のポリヌクレオチド配列のための標的として用いた。該ポリヌクレオチド配列の第一の配列は、共有結合により連結し、毒性タンパク質をコードする m R N A における特有の配列を形成するこれら2つの部分の相補鎖からなる。第一の部分はスプライス供与配列の上流の約9から11ヌクレオチドの配列に相補的であり、第二の部分はスプライス受容配列の下流の約9から11ヌクレオチドの配列に相補的である。R N A がスプライシングされて m R N A が生じると、スプライス供与部位の上流の配列およびスプライス受容部位の下流の配列は互いに結合して上記のポリヌクレオチドと相補する標的となり、それによってスプライシングされた m R N A 配列が分解およびロックダウンされる。スプライシングされないプロウイルス R N A 配列はロックダウンされない。というのは2つの標的配列が連結していないからである。

30

40

【0370】

また、上記のポリヌクレオチド配列または該ポリヌクレオチド配列をコードするベクターをウイルスプラスミドとともにパッケージング細胞に共 - トランスフェクトして外来タンパク質産生を抑制した。あるいは、ポリヌクレオチド配列を安定にパッケージング細胞に組み込んでも良い。

【0371】

本明細書に記載した本発明の多くの改変を本発明の精神と枠内から逸脱することなく行う

50

ことができることは明らかであり、特定の態様のみを例示したが、本発明は添付の請求の範囲の文言によってのみ限定される。

【図面の簡単な説明】

【0372】

【図1】図1は、PER.C6/E2A細胞におけるlet-7標的配列を含むpGL3-融合コンストラクトのルシフェラーゼ活性の、let-7 siRNAによる抑制を示す。PER.C6/E2A細胞は、siRNA二本鎖のいずれか、即ちsiRNA GL3.1、siRNA let-7.1、siRNA GL2.1、またはsiRNA無しと組み合わせて、いずれかの方向においてlet-7標的配列を含むpGL3-融合コンストラクト(pGL3-tLet-7F、pGL3-tLet-7R)またはlet-7 10 配列を含まないpGL3-コントロールによって一過性にトランスフェクトされた。siRNA let-7.1の共-トランスフェクションにより、レポーターpGL3-tLet-7FおよびpGL3-tLet-7Rのルシフェラーゼ活性が特異的に抑制されたが、pGL3-コントロールでは抑制されなかった。ポジティブコントロールであるsiRNA GL3.1の共-トランスフェクションでは、すべてのレポーターコンストラクト(pGL3-tLet-7F、pGL3-tLet-7R、pGL3-コントロール)の抑制が示された。

【図2】図2は、線虫let-7ガイド配列をプローブとして用いたDNAデータベース 20 サーチの結果を示す表である。ヒトゲノムの、染色体9、11、19、21、22およびXにおいて3つの完全なマッチが見られた。

【図3】図3は、Let-7遺伝子DのXbaI/HindIII断片をpIPspAdapt6-deltaPolyAのAvrII/HindIII部位に挿入することによって形成されたプラスミドpIPspAdapt Let-7遺伝子Dを示す。

【図4】図4は、Let-7 RNAの別の標的配列への再プログラミングを示す。Let-7 30 遺伝子22A-Fを含有するプラスミドコンストラクトを2つの別々のPCR反応の鋳型として用いた。プライマーLet-7.N19-R4をフォワードプライマー、例えば、Let-7遺伝子22F1-3と組み合わせて用いた。プライマーLet-7.N19-F4は、リバースプライマー、例えば、Let-7遺伝子22R1-2と組み合わせて用いた。これら2つの別々のPCR反応産物を鋳型として用いて最終PCR反応を行った。外側プライマーであるLet-7遺伝子22F1-3とLet-7遺伝子22R1-2のみをこの最終PCR反応に用いた。この最終反応から得たPCR産物をpIPspAdapt6-deltaPolyAに、Let-7遺伝子22A-F断片について記載したのと同じ方法によってクローニングした。

【図5】図5は、ランダムに産生/単離したsRNAからのライブラリーの作成プロセスを示す。

【図6】図6は、個々のキメラsRNAをコードするコンストラクトの調製プロセスを示し、個々のキメラsRNAは未知の機能に関連するRNAを含んでいて良く、キメラsRNAのライブラリーの構築において自動的かつ有用なものである。

【図7】図7は、アデノウイルスキメラsRNAライブラリーの構築と使用の模式図である。 40

【図8】図8は、実施例2において用いたルシフェラーゼに基づくレポーターコンストラクトおよびsiRNAコンストラクトの模式図である。

【図9】図9は、共-トランスフェクトされたRNAの配列に対応する標的配列を含むレポーターの下方制御を示す。

【図10】図10は、30ヌクレオチド長の野生型let-7ループ、および野生型let-7ループに基づくより短い12-ヌクレオチドループの比較である。太字ヌクレオチドは12ヌクレオチドループ12(L12)を作成するために野生型let-7ループから欠失させたヌクレオチドを表す。

【図11】図11は、ロックダウン効率について試験したさらなるループ配列を示す。これらループ(L1、L2、L3、L4、L5、L6、L11、およびL12)は11から 50

16ヌクレオチドとサイズが異なる。

【図12】図12は、11から30ヌクレオチドと長さが異なるループ配列を含むコンストラクトのノックダウン効率を示す。これらコンストラクトはGL2標的ノガイドに関して合成した。ノックダウン効率は実施例3において記載した一過性トランスフェクション実験において測定した。

【図13-A】図13Aは、ヒトLet-7ゲノムコンストラクトの模式図である。

【図13-B】図13Bは、RNAを置換するためのLet-7に基づく発現プラスミドの模式図である。

【図14】図14は、PER.C6/E2A細胞におけるlet-7に基づく発現プラスミドの一過性トランスフェクションおよびlet-7に基づく発現プラスミドの長さの異なるループ配列のノックダウン効率の比較を示す。 10

【図15】図15は、再プログラムされたlet-7キメラクローンおよびルシフェラーゼに基づくレポーターコンストラクト、pGL3-コントロール、またはpGL3-tLet-7F、またはpGL3-tLet-7R、あるいはpGL2の模式図である。

【図16】図16は、再プログラムされたlet-7キメラクローンについてのルシフェラーゼレポーターレベルを示す。

【図17】図17は、PER.C6.E2A細胞におけるコンストラクトpIPspAdapt-Let-7-gGL3由来のRNA種の発現を示すノザンプロットを示す。

【図18】図18は、let-7以外の配列または正確な長さおよび予測された配列を有するキメラRNA分子も発現するGL3を含む発現プラスミドを示す。 20

【図19】図19は、どのようにLet-7プロモーターがヒトU6snRNAプロモーターの要素によって置換されたかを示す。効率的なプロモーター活性のためには、転写産物の第一のヌクレオチドはGであり、転写終結シグナルは5以上のTの連続である。発現したRNAは19-21ntのガイド配列（標的に向けられた）およびループ配列によって連結されたガイド配列と塩基対形成できる配列を含む。

【図20】図20は、U6に基づくプロモーター発現アデノウイルスベクターによってトランスフェクトされた細胞のサンプルのノザンプロットを示す。プロットは、RNA種の発現と、内在性Let-7RNAに匹敵するサイズの種へのプロセッシングを示す。レーン1は非感染細胞を含み、レーン2はU6(+1)L12gLet7で感染した細胞を含み、レーン3はU6(+1)L13gLet7で感染した細胞を含む。 30

【図21】図21は、レポータープラスミドと異なるプロモーターおよび異なるループ配列を有する標的Let-7配列のノックダウン効率の比較である。ループL12（配列番号30）は、図10および11に示した。ループL13（配列番号66）は14ヌクレオチド長である。

【図22】図22は、Ad-EGFPのアデノウイルス重複感染によるトランスフェクション実験である。アデノウイルスの感染は、この実施例で用いた条件下で一過性にトランスフェクトされたプラスミドによって得られたノックダウン活性に影響を与えなかった。

【図23】図23は、アデノウイルスLet-7に基づくプロモーター発現コンストラクトで感染した細胞のサンプルのノザンプロットを示し、これは、RNA種の発現および合成siRNAに匹敵するサイズの種へのプロセッシングを示す 40

【図24】図24は、異なるループ配列を有する2つのウイルスU6-プロモーターに基づく発現コンストラクトのノックダウン効率の比較、およびウイルス発現コンストラクトによるノックダウンの成功を示す。

【図25-A】図25Aは、ライブラリー構築のためのクローニング戦略の模式図であり、SapI部位と大腸菌致死遺伝子の利用を示す。

【図25-B】図25Bは、ライブラリー構築のためのクローニング戦略の模式図である。56ntインサートについてのアデノウイルスベクターの開発である。

【図26】図26は、ライブラリー構築のためのクローニング戦略の模式図である。51ntインサートについてのアデノウイルスベクターの開発である。

【図27】図27は、リアルタイムPCRによって測定した、アデノウイルスノックダウ 50

ンコンストラクトによる内在性 G N A S のノックダウンの成功を示す。結果は、ノックダウン効果が M O I に依存することを示す。

【図 28】図 28 は、内在性 G N A S を標的としたアデノウイルスノックダウンコンストラクトの特異性を示す。

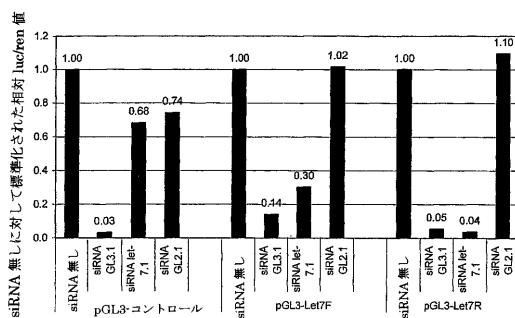
【図 29】図 29 A - C は、リアルタイム P C R によって測定した、アデノウイルスノックダウンコンストラクトによるいくつかの内在性 m R N A のノックダウンの成功を示す。ノックダウン効果は M O I と時間に依存的であった。

【図 30】図 30 は、G N A S の機能的ノックダウンを示す。G N A S を標的とした s R N A をコードするアデノウイルスコンストラクトは機能レベルで G N A S を特異的にノックダウンした。

10

【図 1】

Figure 1



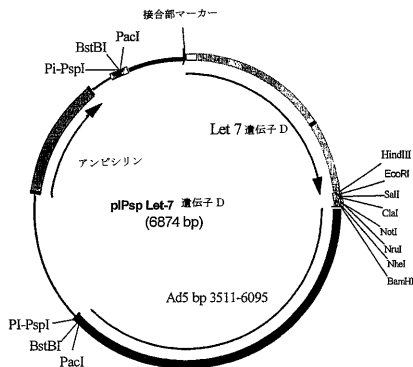
【図 2】

Figure 2

5' 延長	let7-アンチセンス	ループ	let7-センス	3' 延長	
NT_011523.4 Hs22_11680 ヒト染色体 22	TTTGGGG. <u>TGAGGTAGTAGGTT</u> GTATAGT	TTGGGGCTCTGCGCTGC TATGGGATA	ACTATACAATCTAC TGTCTTT	CCTGAA	
NT_009215.3 Hs11_9372 ヒト染色体 11	TCCACGGT. <u>TGAGGTAGTAGGTT</u> GTATAGT	TTAGAATTACATCAAGG GAGATA	ACTGTACAGCCTCC TAGCTTT	CCTTGGG	
NT_025808.2 Hs9_25964 ヒト染色体 9	GTGGGA. <u>TGAGGTAGTAGGTT</u> GTATAGT	TTTAGGGTCAACCCAC CACTGGGAGATA	ACTATACAATCTAC TGTCTTT	CCTAAC	
NT_025808.2 Hs9_25964 sapiens ヒト染色体 9, A	TTGCTCTATCA GAG.	TGTGGGTAGTGATTT ACCGTGTTCAGGAGATA	ACTATACAATCTAT TGCCTT	CCCTGAGGA GTAG	
NT_011512.3 Hs21_11669 ヒト染色体 21 : 21 D	GTGTGCATCC GGGT.	TGAGGTAGTAGGTT GTATAGT	TTAGAGTTACACCCCTGG GAGTAA	ACTGTACACCTTC TAGCTT	TCCTTGAGG CACAG
NT_011799.5 HsX_11956 ヒト染色体 X :	GTGCTCTGTGG GA	TGAGGTAGTAGGTT GTATAGT	TTTAGGGTCAATACCCCA TCTTGGAGATA	ACTATACAGTCTAC TGTCTT	TCCACGGT GGTAC
NT_011091.5 Hs19_11248 ヒト染色体 19 : 19 C	CCTGCCGCGCC CCCCGGGC	<u>TGAGGTAGGAGTT</u> GTATAGT	TGAGGAGGACACCCAAG GAGATC	ACTATACGGCCTCC TAGCTT	TCCCCAGGC TGGCCCTGC CACGGGACG GGGCCGGGC GGG

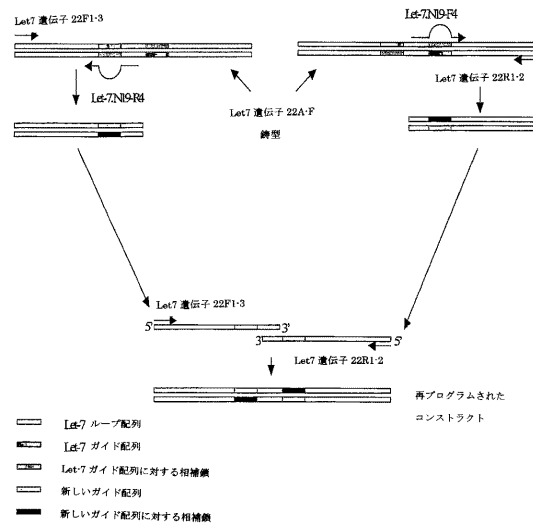
【 図 3 】

Figure 3



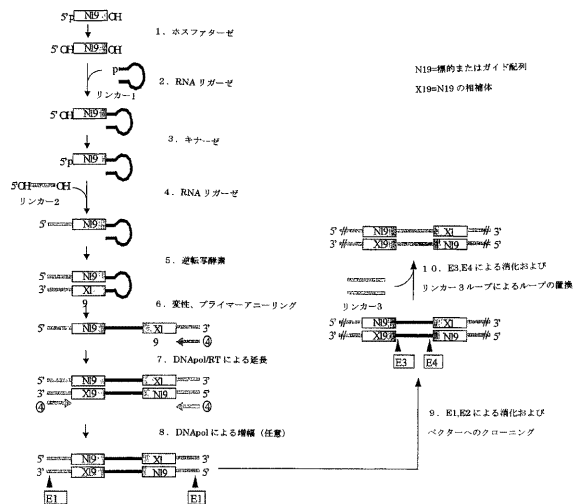
【 図 4 】

Figure 4



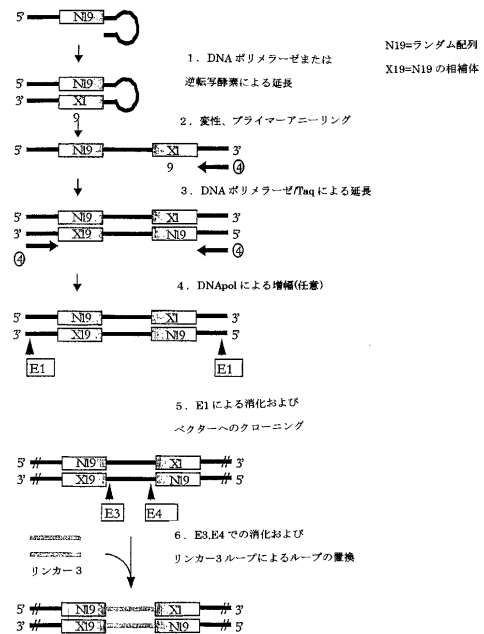
【 図 5 】

Figure 5



【 図 6 】

Figure 6



【 図 7 】

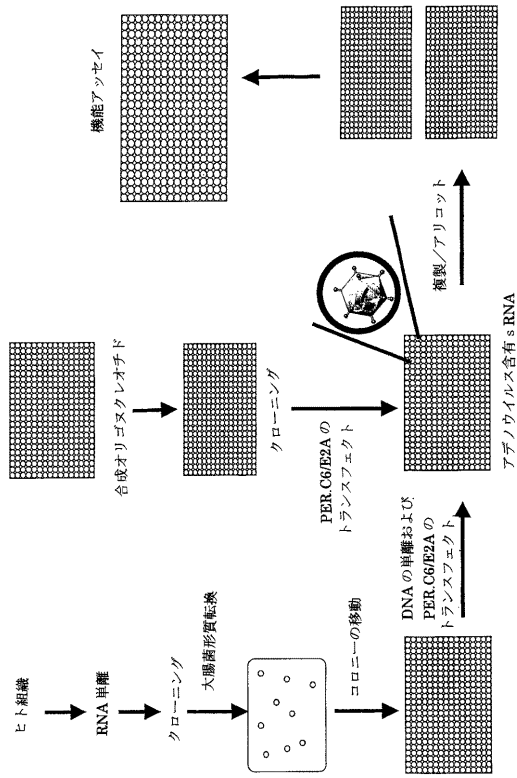


Figure 7

【 図 8 】

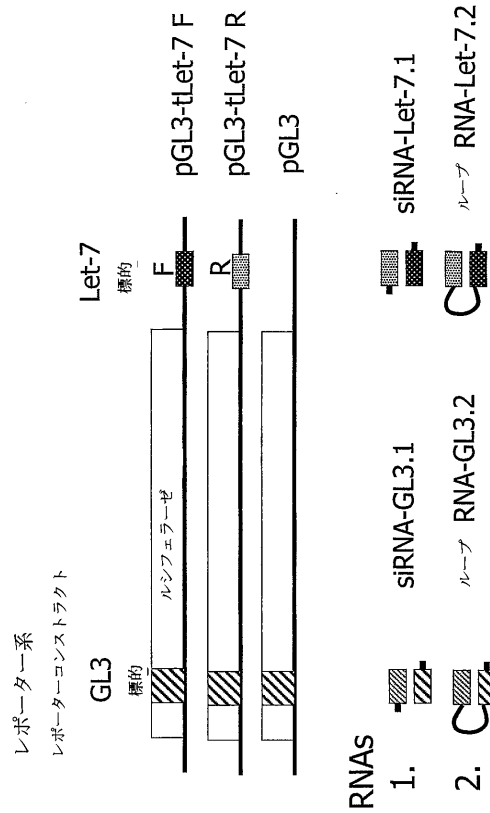


Figure 8

【 図 9 】

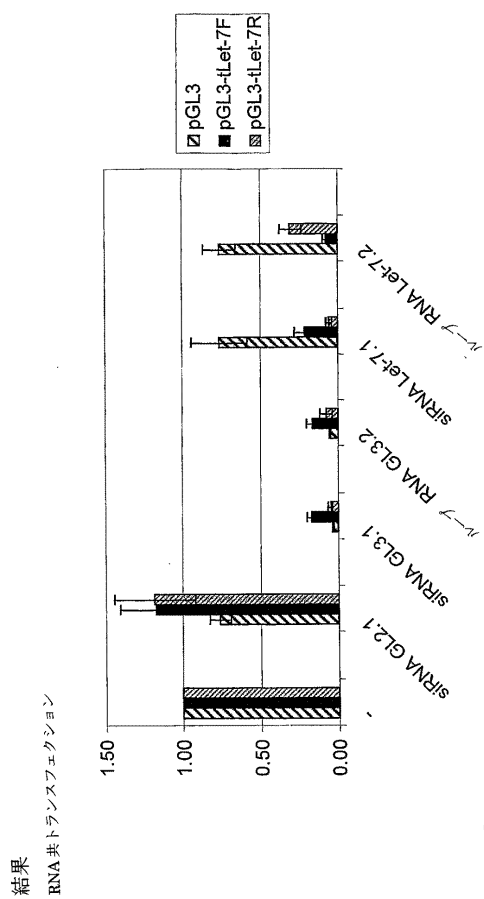


Figure 9

【 図 10 】

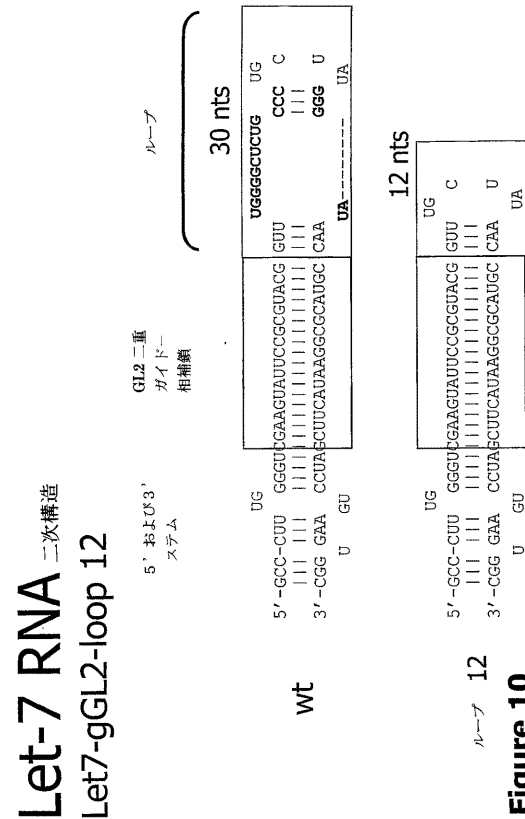


Figure 10

【図 1 1】

アダノウイルスベクター開発
ループサイズの低下; miR および Let-7 由来

名前	由来ループ配列	ループサイズ(nt)
Let-7 L1:	mir-26b GT- GTGTGCTGTCC- AC-	15
Let-7 L2:	mir-26b - GTGTGCTGTCC- -	11
Let-7 L3:	mir-28 GT- TTACCTTTCTGA- AC-	16
Let-7 L4:	mir-28 - TTACCTTTCTGA- -	12
Let-7 L5:	mir-31 GT- TTGAACCTGGGAA- AC-	16
Let-7 L6:	mir-31 - TTGAACCTGGGAA- -	12
Let-7 L11:	Let7L GT- TGCTCTGCTA - AC-	14
Let-7 L12:	Let7L GT- TTGCTATA - AC-	12

Figure 11

【図 1 3 - A】

ヒト Let-7 ゲノムコンストラクト

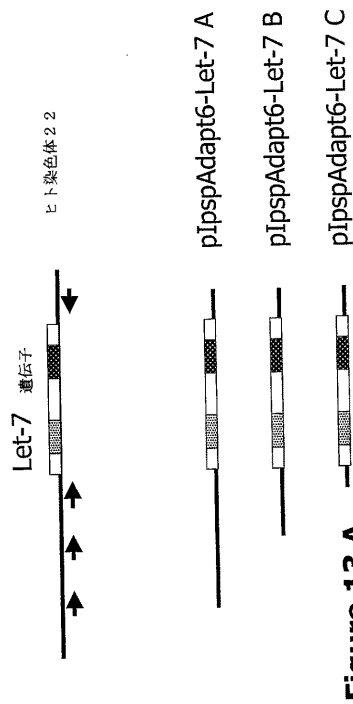


Figure 13 A

【図 1 2】

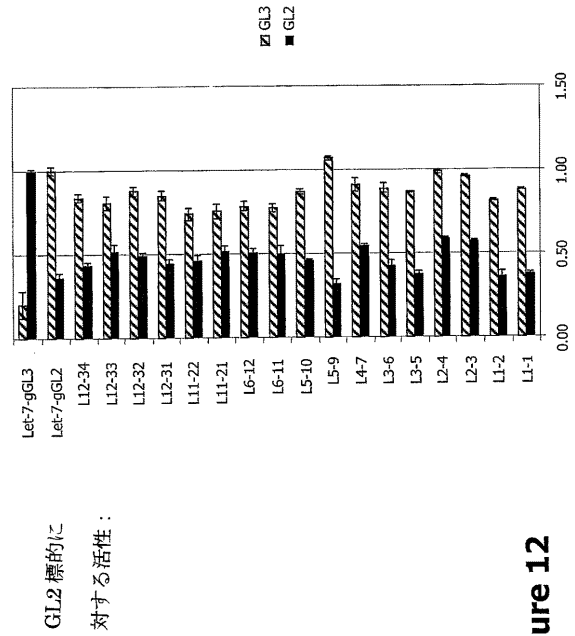


Figure 12

【図 1 3 - B】

Let-7 遺伝子発現コンストラクト
レポーターコンストラクトおよび Let-7 プラスミド

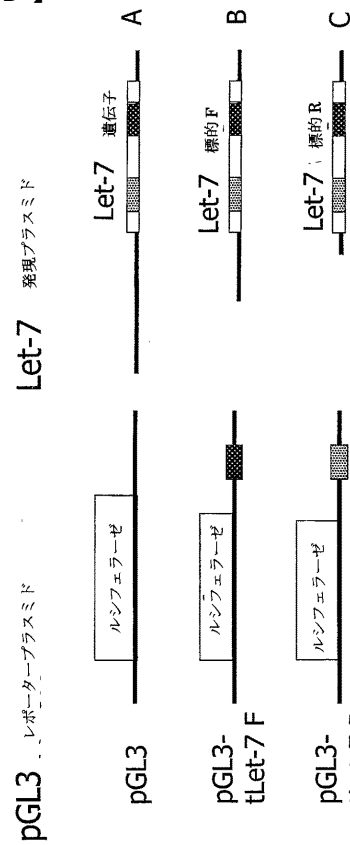


Figure 13 B

【 図 1 4 】

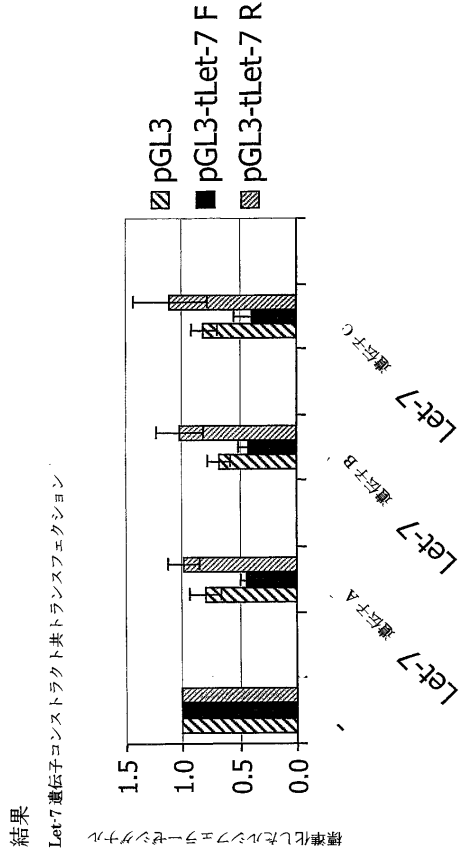


Figure 14

【 図 1 6 】

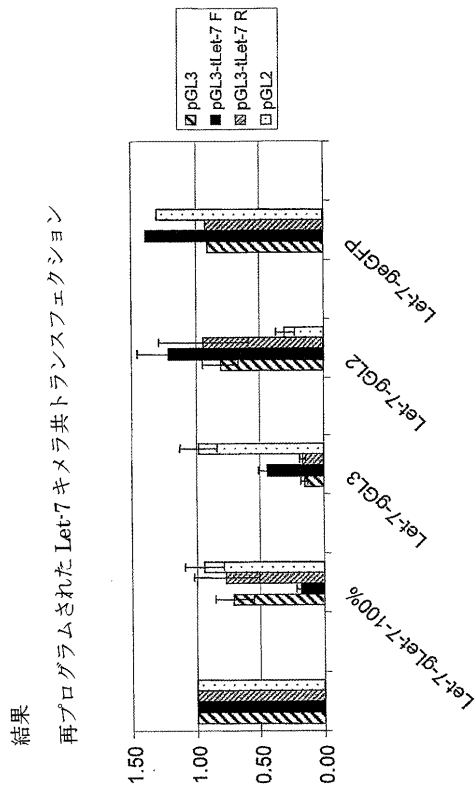


Figure 16

【 図 1 5 】

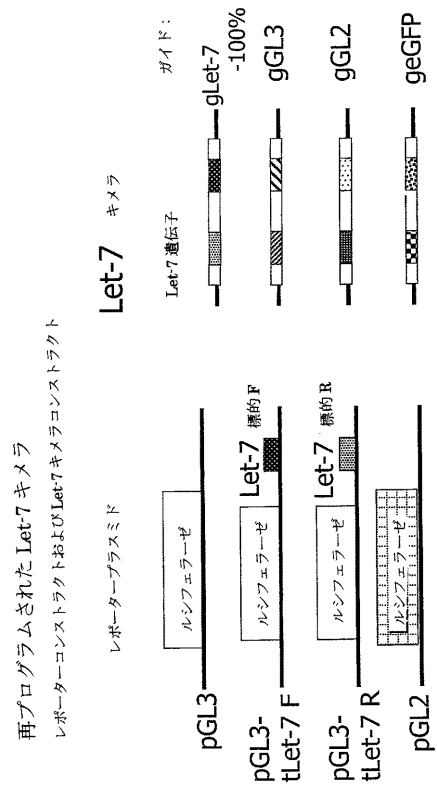


Figure 15

【 図 1 7 】

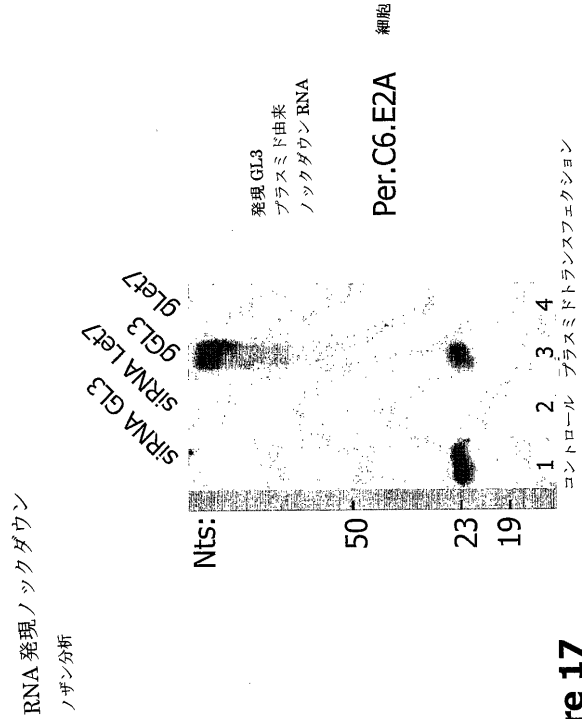


Figure 17

【 図 1 8 】

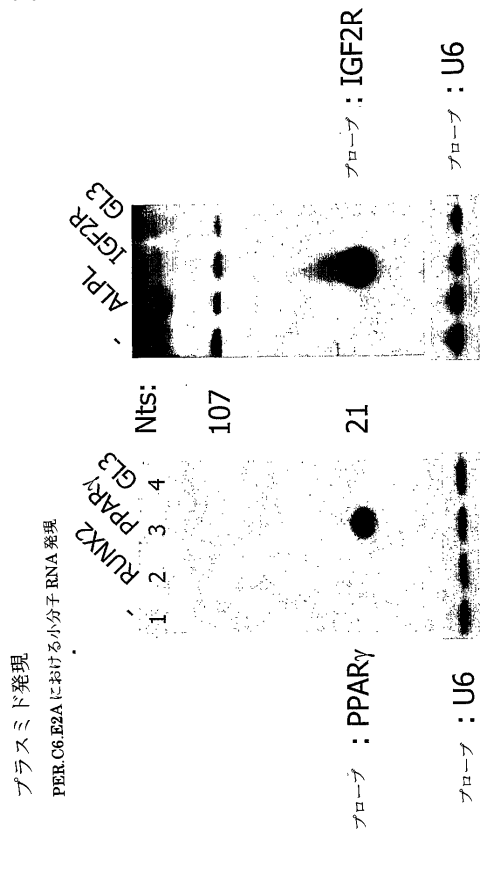


Figure 18

【 図 2 0 】

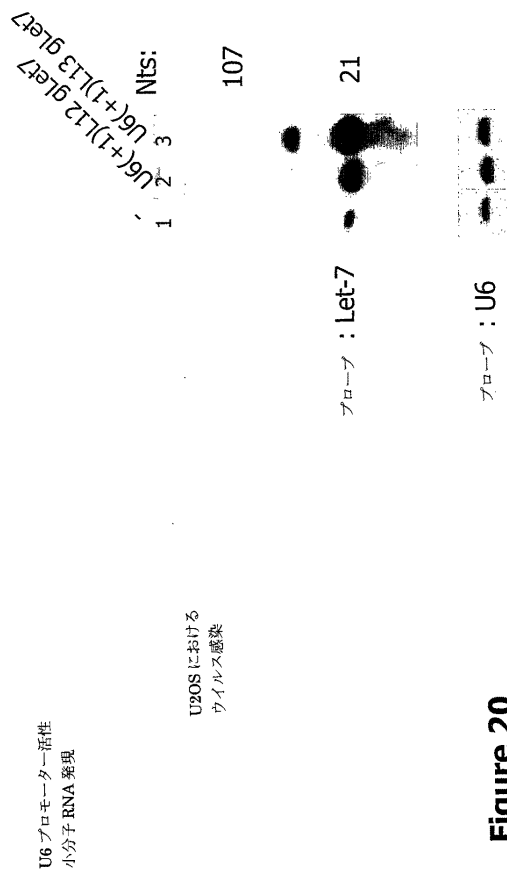


Figure 20

【 図 1 9 】

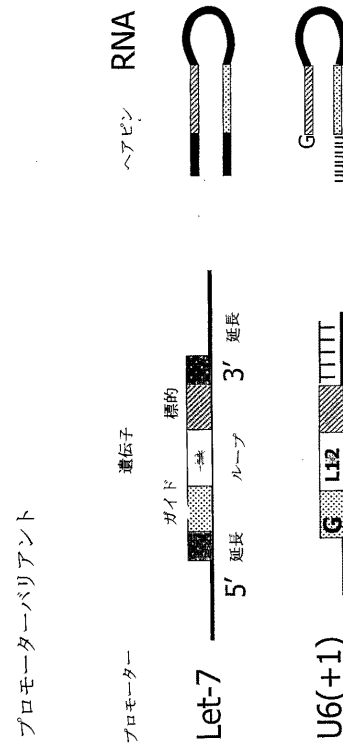


Figure 19

【 図 2 1 】

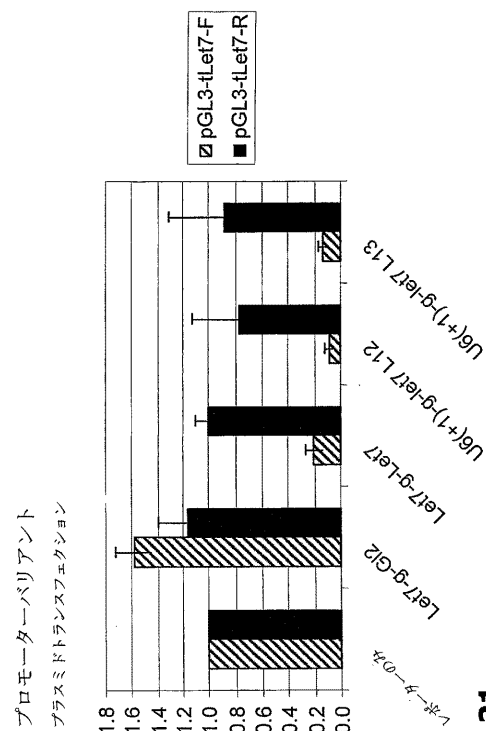


Figure 21

【図 2 2】

Ad-EGFP のトランスフェクション
アデノウイルスによる重複感染

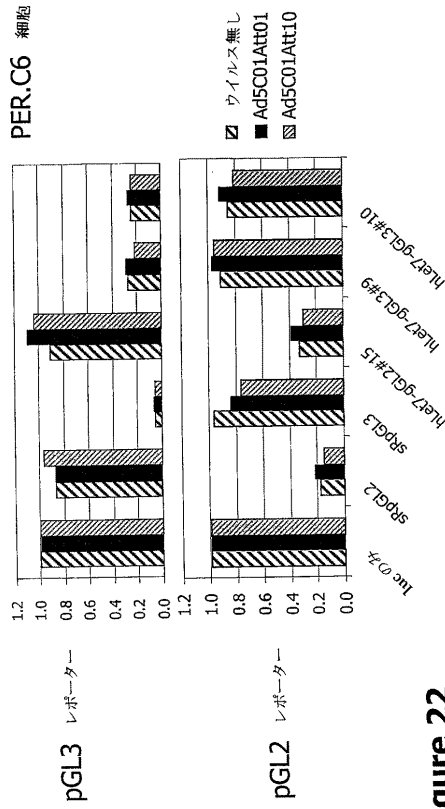


Figure 22

【図 2 4】

ウイルスノックダウン
アデノウイルスレポーターコンストラクトの共感染

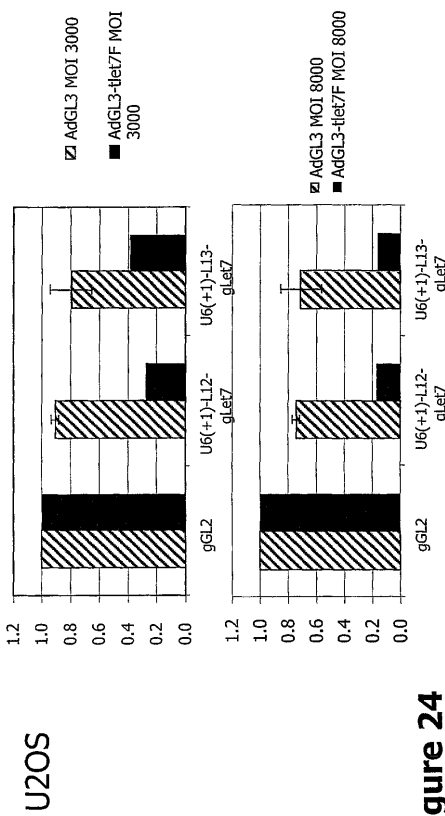


Figure 24

【図 2 3】

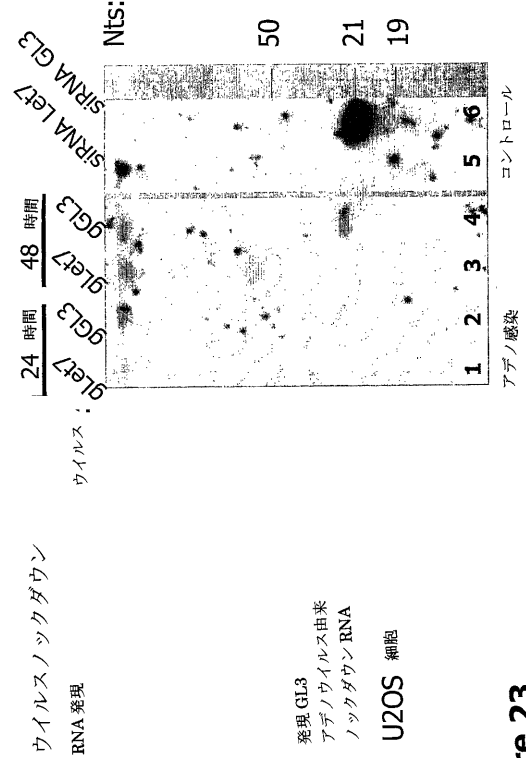


Figure 23

【図 2 5 - A】

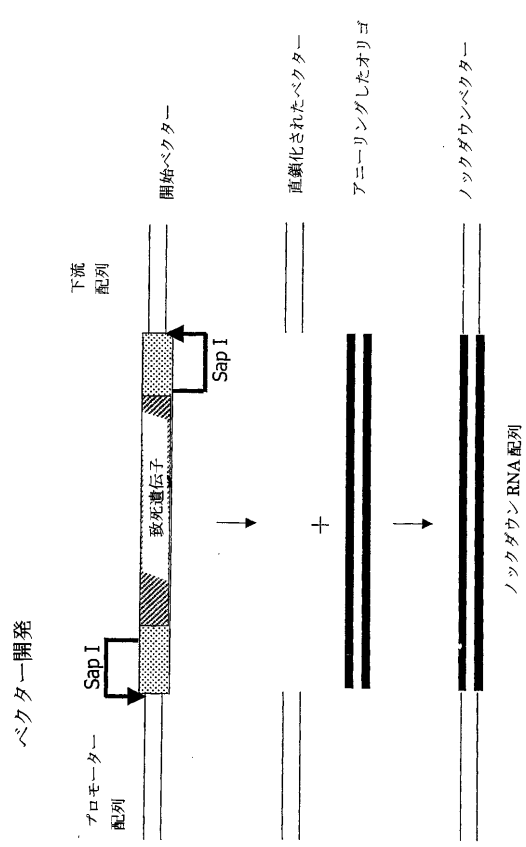


Figure 25 A

【図 29 - A】

U2OSwt における相対発現
感染 24 時間後

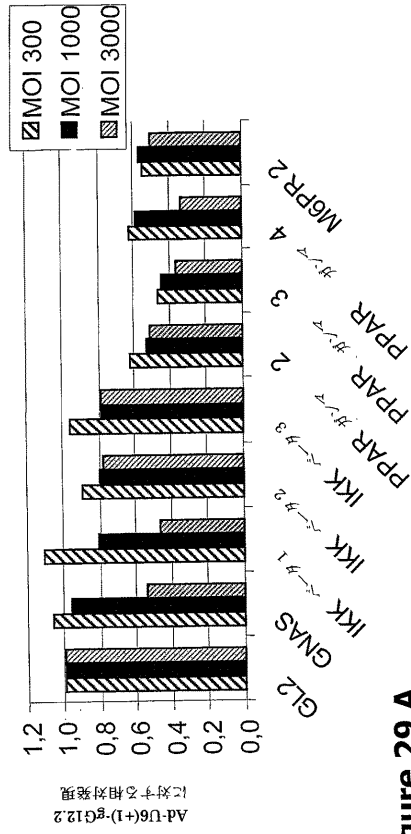


Figure 29 A

【図 29 - B】

U2OSwt における相対発現
感染 48 時間後

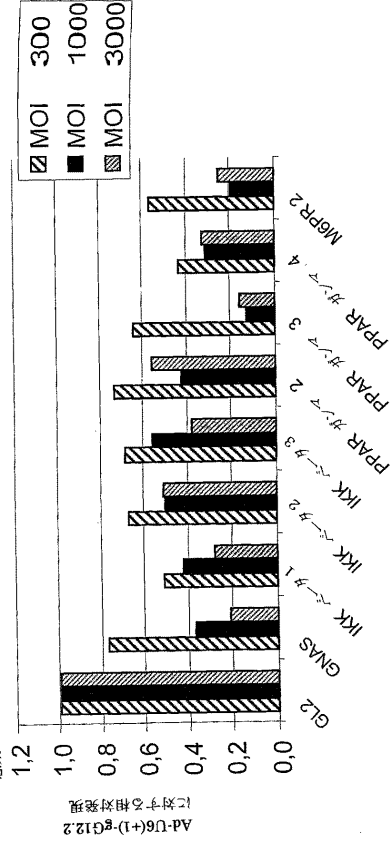


Figure 29 B

【図 29 - C】

U2OSwt における相対発現
感染 144 時間後

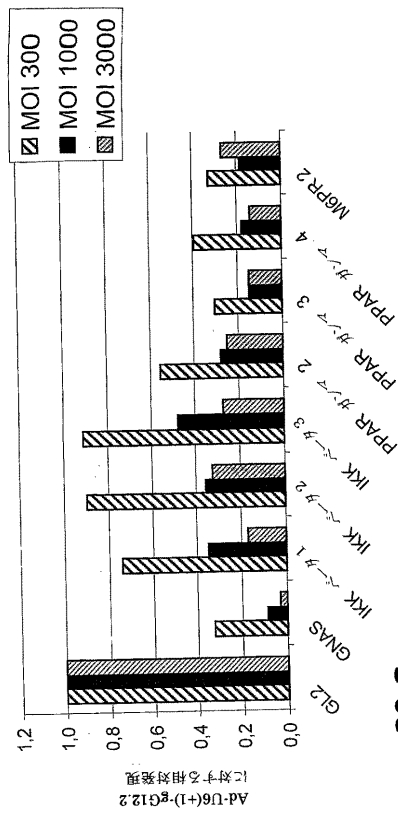


Figure 29 C

【図 30】

GNAS の機能ノックダウン

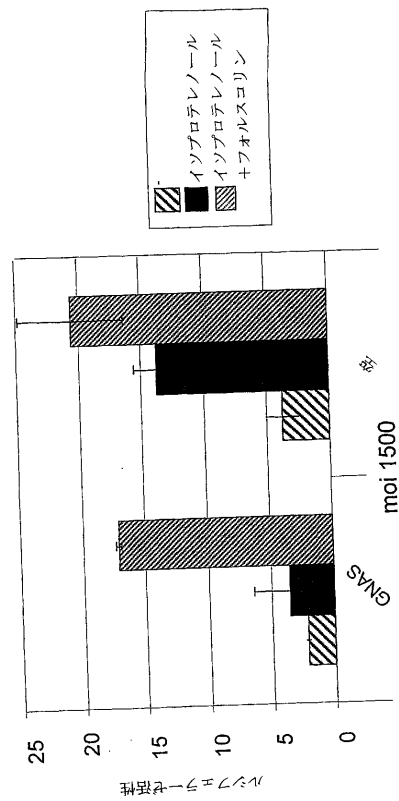


Figure 30

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 March 2003 (13.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/020931 A2(51) International Patent Classification: C12N 15/11,
A01K 67/027, C12N 15/861, C12Q 1/68, C12N 15/10,
5/10Waverbancken 16, NL-3645 VS Vinkerveen (NL); VAN ES,
Helmoth, Hendrikus, Gerardus [NL/NL]; Broestraat 18,
NL-2011 ZZ Haarlem (NL); MICHELS, Godefridus,
Augustinus, Maria [NL/NL]; Vronkenlaan 12, NL-2352
EP Leiderdorp (NL).

(21) International Application Number: PCT/EP02/09670

(22) International Filing Date: 29 August 2002 (29.08.2002)

(74) Agent: HOOVELD, Arjen, J. W.; Arnold & Siedsma,
Sweelinckplein 1, NL-2517 GK The Hague (NL).

(25) Filing Language: English

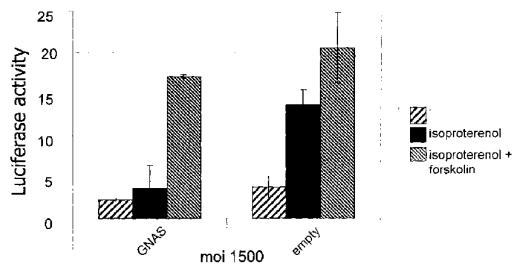
(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/317,229 1 September 2001 (01.09.2001) US
60/385,733 4 June 2002 (04.06.2002) US(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, 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, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(71) Applicant (for all designated States except US): GALA-
PAGOS GENOMICS N.V. [BE/BE]; Generaal de Witte-
laan 11 A3, B-2800 Meechelen (BE).(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LI, MC, NL, PT, SE, SK,
TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: SIRNA KNOCKOUT ASSAY METHOD AND CONSTRUCTS

Functional knock-down of GNAS



(57) Abstract: The present invention relates to polynucleotide constructs, methods for their preparation, and preparations for their use in methods that lower the amount of RNA and/or protein production in cells based on the intracellular expression of small interfering polynucleotide acid molecules.

WO 03/020931 A2

WO 03/020931 A2 

Published:
— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

siRNA Knockout Assay Method and Constructs

Field of the Invention

- 5 The present invention relates to polynucleotide constructs, methods for their preparation, and preparations for their use in methods that lower the amount of RNA and/or protein production in cells based on the intracellular expression of small interfering polyribonucleic acid molecules.
- 10 Genomics research over the last decades has resulted in a nearly complete map of all human genes and opened-up new directions in medical research. In this post-genomics era new disciplines of science have emerged such as proteomics and functional genomics. Traditional pharmaceutical companies
- 15 with substantial R&D budgets are interested in getting access to new functional genomics and proteomics platform technologies. What is needed is better screening technologies for identification of new therapeutic targets as well as better target validation approaches. With applications in all
- 20 disciplines of modern medicine, functional genomics has the potential to make a significant difference for the treatment of all human diseases.

- Pharmaceutical companies are interested in reliable knockdown based technologies since their drug screens with small
- 25 molecules are based on inhibiting the activity and effect of an expressed protein. Therefore, blocking expression or function of a potential target, either through screening in a cellular assay or through single gene validation will provide an important data set regarding drug-ability of the target

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

early on in the drug development process. This data set forms a strong basis for the start of a drug development program, based on a compound, antibody or biological, with the aim to develop an effective therapy.

- 5 The study of gene function in vertebrates is hampered by the complexity of the genome, the multicellular nature and the lack of extensive genetic tools. The techniques to generate stable transgenic cell-lines or transgenic mice are powerful but very time- and labor-intensive approaches that cannot be
10 easily performed at high throughput.

- Various knockdown or knockout approaches are used to study gene function in mammalian cells (e.g. antisense, antibodies, ribozymes, aptamers, zinc finger proteins, chimeric RNA-DNA oligos, etc.). However, these technologies are not robust and
15 efficient nor they can be generically applied to all genes and all cell types.

- RNA interference (RNAi) is the post-transcriptional process of gene silencing mediated by double stranded RNA (dsRNA) that is homologous in sequence to the silenced RNA and is observed in
20 animals and plants. The dsRNA is processed into 21-23 nucleotides (nts) molecules, called small interfering RNAs (siRNAs), which guide the sequence-specific degradation of the target RNA (Sharp, 2001).

- The initial discovery of RNA interference in *C. elegans* (Fire et al., 1998) has been followed by numerous examples of
25 organisms where introduction of dsRNA can induce the sequence specific silencing effect.

- The development of an in vitro system using extracts of embryos or cultured cells of *drosophila* has accelerated the
30 insight into the mechanism behind the sequence specific silencing effect (Elbashir et al., 2001b; Hammond et al.,

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

2000; Zamore et al., 2000). The dsRNA that is introduced into these extracts are processed into 21-23 nts fragments. The extracts are now "programmed" to degrade target RNAs with sequences overlapping to the dsRNA fragments. The target RNA
5 is cleaved in both strands, sense and antisense, at 21-23 nts intervals. These smaller species are referred to as short interfering RNAs (siRNAs). Although longer dsRNA species appear to be more potent than shorter RNAs, the specific silencing effect is obtained by transfecting the 21-23 nts
10 siRNA directly into the cells (Elbashir et al., 2001b).

Mature siRNA duplexes are precisely processed to form a duplexed RNA of 21-23 nts long with 3' overhangs of 2- or 3- nts; they do not contain modified nucleotides and have a 5' phosphate (not essential for its function) and a 3' hydroxyl
15 group. A siRNA duplex with 2- or 3-nts overhangs is more active than duplexes with blunt ends or 4-nts overhangs. Extensions at the 3' terminus of 17 or-up nts at either the sense strand or the antisense strand results in a loss of activity to cleave the complementary target strand. This
20 indicates that the correct 3' terminus of the antisense strand is essential for the maintaining the activity of the siRNA duplex to degrade the sense target RNA (Elbashir et al., 2001b).

Genetic studies have linked RNAi to transposon silencing in *C. elegans*. Co-suppression by posttranslational gene silencing (PGTS) in plants seems to function by a related mechanism mediated by small guide RNAs of approximately 22 nts.
25

Several protein factors have been associated with RNAi, based on genetic and biochemical studies (Sharp, 2001). The RDE-1
30 gene family consists of a large number of members (24 in *C. elegans*) that is well conserved. Members of the RDE-1 family contain conserved PIWI- and PAZ-domains of unknown functions.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

RDE-1 homologues are found in various species and RDE-1 family members have been implicated to act in various processes; RNAi, PTGS in plants, embryogenesis in *Drosophila*, expression and regulation of small temporal RNAs.

- 5 The Dicer protein is a member of the RNase III family that is conserved in several species. Dicer contains a helicase domain, 1-2 dsRNA binding domains, 2 RNase III type domains and a PAZ domain. Dicer is required for the generation of the functional 21 nucleotides long siRNAs from longer dsRNA
- 10 complexes (Bernstein et al., 2001).

- In *C. elegans* *let-7* and *lin-4*, small temporal RNAs (stRNAs) of 21-22 nts, play a regulatory role during development. They do so by recognizing sequences in the 3' untranslated regions of their target transcripts resulting in strong repression of
- 15 expression (Reinhart et al., 2000). The stRNAs are processed from longer precursor transcripts. Mature *let-7* RNA has also been detected in humans and precursors with conserved secondary structures have been predicted (Pasquinelli et al., 2000).

- 20 For the correct processing of the stRNA *let-7*, Dicer is required (Grishok et al., 2001; Hutvagner et al., 2001). Therefore, Dicer has a dual function: processing of dsRNA into siRNA as well as processing of *let-7* precursors into mature *let-7* stRNA. The products, the stRNA and the siRNA, have some
- 25 characteristics that are different and some characteristics that are shared.

- The differences between stRNA and siRNA include (1) both sense and antisense strands of mature siRNAs are present in the cell; only the antisense strand of mature stRNAs is
- 30 detectable, (2) the duplexed region of stRNAs contains some G-U base pairs and mismatches in contrast to siRNAs that have

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

100% complementary duplexes, and (3) the mode of action for siRNA is RNA degradation, while let-7 stRNA is believed to result in a translational block.

5 stRNAs and siRNAs share the characteristics that (1) both RNA species are involved in repression of gene expression, (2) both, mature siRNAs and mature stRNAs are 21-22 nts long, (3) both are produced from duplexed, longer precursor RNAs, and (4) the processing into active forms of both stRNA and siRNA is mediated by the same enzyme, Dicer.

10 Reported Developments

RNAi provides researchers with an additional genetic tool to study gene functions. In *C. elegans*, chromosomes I and III have now systematically been analyzed for phenotypic effects. The RNAi approach creates extra possibilities in developmental studies. Classical knockouts with lethal effects during development could never be analyzed in later developmental stages. With RNAi, the onset of the effect may be varied and roles in later stages of development may be studied.

20 The use of RNAi in mammalian cells has been problematic since introduction of long (>30 base pairs) dsRNA results in two major intracellular responses: activation of the double stranded RNA dependent protein kinase PKR, which results in a general block of protein synthesis, and activation via 2'-5'-oligoadenylate synthetase of RNase L, which attacks all mRNAs.

25 In mammals, the appearance of dsRNA in the cell, often generated during viral infections, results in strong cellular responses. A major activity is mediated by the interferon-inducible dsRNA-dependent protein kinase (PKR) that binds to dsRNA. This results in autophosphorylation and activation of PKR. The activated PKR phosphorylates the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2-alpha) at

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

position serine-51. eIF2 bound to GTP delivers the initiator tRNA methionine to the small ribosomal subunit and eIF2 is released as the GDP-bound form. In order to get continuous ongoing translation, eIF2 has to be recycled from the GDP- to the GTP-bound state. Phosphorylation of eIF2-alpha by PKR prevents this recycling and thereby blocks the initiation of translation. As a consequence, dsRNA leads to a general translational block in mammalian cells.

dsRNA is also known to activate the interferon-induced (2'-5') oligoadenylate synthetase. Upon activation, this enzyme polymerizes ATP into 2'-5'-linked nucleotide oligomers (also indicated by 2-5A). The 2-5A oligomers activate the ribonuclease RNase L that results in RNA degradation.

Further, in mammals some mRNAs are edited by the nuclear dsRNA-specific adenosine deaminase (ADAR). Although ADAR acts selectively on particular substrates, like mRNAs for brain glutamate receptors (gluR), its activity shows very little sequence specificity and can act on any dsRNA molecule above a certain minimum length. This generic modifying activity results in deamination of adenosine- into inosine-residues resulting in unwinding of the dsRNA helix.

Indeed, transfection approaches of dsRNA that worked for *drosophila*-cultured cells failed for various cultured cells from mammalian origin. However, microinjection experiments in mouse embryos and oocytes showed that under these conditions RNAi effects could be observed. This suggested that RNAi in mammalian systems is possible.

Recently, it has been demonstrated that RNAi can be used in a panel of mammalian cell lines (Elbashir et al., 2001a). The approach is based on direct transfection of the 21-23 nts siRNA duplexes into the cells. This circumvents the

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

intracellular responses mentioned above and results in sequence-specific silencing of endogenous and heterologous genes.

5 An important bottleneck in the siRNA transfection approach is its limited applicability to target different cell types, especially primary cells. Primary cells are closest to the in vivo situation and often have the highest physiological relevance. Non-viral DNA or siRNA transfection technologies have severe limitations with regard to these cells and are not
10 efficient and reliable. Practical use of these approaches needs significant optimisation of conditions, and in general lack the robustness necessary for large-scale applications. The gene transfer reagents used are often toxic, yielding lower levels of viable transduced cells. In essence, they do
15 not allow a generic siRNA application for a wide variety of cell types, including primary cell types such as T cells, B cells, mast cells, endothelial cells, synoviocytes and lung epithelial cells. Furthermore, transfection of the siRNA gives a short knock-down effect. For a prolonged knock-down effect
20 in cells several additional transfections are necessary.

Therefore, a broad application of the siRNA technology will require further research and development to overcome these limitations. Genomics scale implementation of knocking down genes in mammalian cells has been hampered by the lack of a
25 reliable, robust and efficient gene transfer technology (see above) applicable in a wide range of cell lines and primary cell types.

The present invention overcomes the limitations recognized by the prior art, and finds applications in numerous fields, such
30 as genomics studies, viral production and protein production.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

The production of recombinant viruses is sometimes complicated by the expression of exogenous sequences that encode lethal or toxic proteins that interfere with viral production. The prior art discloses systems for the temporary shut-down of protein
5 production including the Tet-repression system and the Ecdyson system. These systems are however time-consuming and involve difficult cloning steps to introduce the constructs into the vectors. Another disadvantage of the prior art repression systems is that to express the exogenous gene, one often must
10 add a compound that suppresses the suppressor system itself to turn on gene expression. The present invention may be applied to every viral packaging and protein production system to improve production by the selective knock-down of lethal or recombinant proteins during the viral or producing cell
15 production phases respectively.

Summary of the Invention

The present invention relates to isolated polynucleotides, and vectors including the same, useful for the down regulation or degradation of a specific RNA molecule in a host cell,
20 consisting essentially of a first polynucleotide sequence consisting of about 17 to about 23 nucleotides and complementary to about 17 to about 23 nucleotides of said RNA sequence in said host cell, said first sequence covalently linked to a second sequence capable of forming a loop
25 structure when said second sequence is RNA, wherein said first sequence consists essentially of a RNA sequence, or a single stranded DNA equivalent thereof.

Another embodiment of the present invention relates to a self-complementing single stranded polynucleotide, and vectors
30 including the same, comprising a first nucleotide sequence and a third nucleotide sequence covalently linked by a second nucleotide sequence capable of forming a stem-loop structure,

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

- when said second sequence is RNA, such that all nucleotides in said first sequence and said third sequences are capable of base pairing with each other, wherein said second nucleotide sequence comprises a stem-loop forming region having a
- 5 sequence derived from naturally occurring RNA sequences found in RNA molecules and that does not functionally target a specific RNA molecule in a host cell. Most preferably the second sequences are derived from RNA molecules other than mRNA.
- 10 Another aspect of the present invention relates to a method for reducing the amount of at least one RNA molecule having a unique sequence present in a host cell comprising transfecting said cell with a vector that encodes a self-complementing single stranded polynucleotide described herein, wherein said
- 15 polynucleotide comprises a first sequence which is complementary to said RNA sequence.

- Another aspect of the present invention relates to a method for preparing a self-complementing single stranded polynucleotide including complementary sequences covalently
- 20 linked by a polynucleotide sequence forming a stem loop structure, comprising treating a single stranded polynucleotide consisting essentially of a first polynucleotide sequence covalently linked to a second polynucleotide sequence that includes two nucleotide sequences
- 25 capable of complementary base pairing and thereby forming a stem-loop structure that has a 3' OH terminus, under conditions such that said first sequence serves as a template starting at the 3' OH terminus for the synthesis of a complementary sequence thereto.
- 30 Another aspect of the present invention relates to a method of preparing a vector including the sequence of a polynucleotide according to the invention, wherein said self-complementing

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

polynucleotide is a DNA sequence and further comprises a fourth sequence linked to the free end of said first sequence, and wherein said polynucleotide is denatured, converted into a double stranded polynucleotide, and ligated into a vector
5 capable of transfecting a host cell and transcribing said polynucleotide.

Another aspect of the present invention relates to a method of determining the function of a naturally occurring polynucleotide sequence comprising transfecting a host cell
10 with a vector according to the invention, said vector including a polynucleotide sequence complementary to said naturally occurring polynucleotide and detecting a change in cellular phenotype.

Other aspects of the invention relate to libraries of vectors, and vectors, consisting essentially of polynucleotide
15 according to the invention. Further aspects of the invention relate to methods of lowering the amounts of RNA or protein translated from RNA in a subject, comprising the administration of a vector according to the present invention,
20 and transfecting cells in said subject, in an amount effective to lower the amounts of said RNA in said transfected cells.

The present invention provides for the temporary knock-down of proteins, such as lethal proteins, during virus or recombinant protein production, thereby allowing (1) the replication and
25 packaging of virus that include sequences encoding for lethal proteins, or (2) the optimal production of recombinant protein. Knock-down constructs described herein below are transfected into any selected packaging cell and such transfected cells are used directly. The knock-down system
30 uses virus constructs that are used directly to infect cells and no further compound is required by the method to induce virus or protein production

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

Brief Description of the Drawings

- Figure 1 shows the repression of luciferase activity of pGL3-fusion constructs containing let-7 target sequences by let-7 siRNAs in PER.C6/E2A cells. PER.C6/E2A cells are transiently transfected with the pGL3-fusion constructs containing let-7 target sequences in either orientation (pGL3-tLet-7F, pGL3-tLet-7R) or pGL3-control lacking let-7 sequences, in combination with each of the siRNA duplexes siRNA GL3.1, siRNA let-7.1, siRNA GL2.1, or no siRNA. Co-transfection of siRNA let-7.1 specifically represses luciferase activity of the reporters pGL3-tLet7F and pGL3-tLet7R, but not the pGL3-control. Co-transfection of the positive control siRNA GL3.1 shows repression of all the reporter constructs (pGL3-tLet-7F, pGL3-tLet-7R, pGL3-control).
- Figure 2 is a table presenting the results of a DNA database search using the *C. elegans* let-7 guide sequence as a probe. Three perfect matches were found on the human genome, in chromosomes 9, 11, 19, 21, 22 and X.
- Figure 3 describes plasmid pIPspAdapt Let-7 gene D formed by the insertion of the Xba I/Hind III fragment of Let-7 gene D into the Avr II/Hind III sites of pIPspAdapt6-deltaPolyA.
- Figure 4 depicts the reprogramming of Let-7 RNA to another target sequence. Plasmid constructs containing Let7gene22A-F are used as templates for two separate PCR reactions. Primer Let-7.N19-R4 is used in combination with a forward primer, for instance, Let7gene22 F1-3. Primer Let-7.N19-F4 is used in combination with a reverse primer, for instance, Let7gene22 R1-2. The products of these two separate PCR reactions are used as template for a final PCR reaction. Only the outside primers Let7gene22 F1-3 and Let7gene22 R1-2 are used in this final PCR reaction. The PCR products obtained from this final

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

reaction are cloned into pIPspAdapt6-deltaPolyA using the same strategy as described for the Let7gene22A-F fragments.

Figure 5 shows the process generating a library from randomly produced/isolated sRNAs.

- 5 Figure 6 shows the process for the preparation of constructs that code for individual chimera sRNA that may include RNA associated with unknown function and that is automatable and useful in the construction of a library of chimera sRNA.

- 10 Figure 7 is a schematic representation of the construction and use of an adenoviral chimeric sRNA library.

Figure 8 is a schematic representation of the luciferase-based reporter constructs and siRNA constructs used in example 2

- 15 Figure 9 depicts down-regulation of the reporters containing the target sequences that corresponds to the sequences of the co-transfected RNAs.

- 20 Figure 10 is a comparison of the wild-type let-7 loop, which is 30 nucleotides in length, and a shorter, 12-nucleotide loop based on the wild type let-7 loop. The bolded nucleotides represent those nucleotides deleted from the wild-type let-7 loop to generate the 12 nucleotide Loop 12 (L12).

Figure 11 depicts additional loop sequences tested for knock-down efficiency. These loops (L1, L2, L3, L4, L5, L6, L11, and L12) vary in size from 11 to 16 nucleotides.

- 25 Figure 12 shows the knock-down efficiencies of constructs comprising loop sequences varying in length from 11 to 30 nucleotides. These constructs are synthesized in the context of a GL2 target/guide. The knock-down efficiencies were measured in a transient transfection experiment as described in Example 3.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

Figure 13A is a schematic illustration of human Let-7 genomic constructs.

Figure 13B is a schematic illustration of Let-7-based expression plasmids to replace the RNAs.

- 5 Figure 14 shows transient transfection of let-7 based expression plasmids on PER.C6/E2A cells, and a comparison of knock-down efficiency of different length loop sequences of let-7 based expression plasmids.

- 10 Figure 15 is a schematic representation of the reprogrammed let-7 chimeric clones and luciferase-based reporter constructs pGL3-control, or pGL3-tLet-7F, or pGL3-tLet-7R, or pGL2.

Figure 16 depicts luciferase reporter levels for the reprogrammed let-7 chimeric clones.

- 15 Figure 17 depicts northern blots showing the expression of the RNA species derived from the construct pIPspAdapt-Let-7-gGL3 in PER.C6.E2A cells.

Figure 18 depicts the expression plasmids containing sequences other than let-7 or GL3 that also express chimeric RNA molecules with the correct length and expected sequence.

- 20 Figure 19 depicts how the Let-7 promoter is replaced by elements of the human U6 snRNA promoter. For efficient promoter activity the first nucleotide of the transcript is a G and the transcription termination signal is a string of 5 or more Ts. The expressed RNA contains a guide sequence of 19-21
25 nts (directed against a target) and a sequence able to base pair with the guide sequence connected by a loop sequence.

Figure 20 shows northern blots of samples of cells transfected with the U6-based promoter expression adenoviral vectors. The blots show expression of the RNA species and processing into a

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

species of a size comparable to that of endogenous Let-7 RNA. Lane 1 contains uninfected cells, lane 2 contains cells infected with U6 (+1) L12 gLet7 lane 3 contains cells infected with U6 (+1) L13 gLet7.

- 5 Figure 21 is a comparison of knock-down efficiency of the reporter plasmids with the target Let-7 sequences with different promoters and different loops sequences. The loop L12 (SEQ ID NO: 30) is depicted in Figures 10 and 11. The loop L13 (SEQ ID NO: 66) is 14 nucleotides in length.
- 10 Figure 22 is a transfection experiment with adenoviral super-infection of Ad-EGFP. Infection of adenovirus had no effect on the knock-down activity obtained by the transiently transfected plasmids under the conditions used in this example.
- 15 Figure 23 depicts northern blots of samples of cells infected with the adenoviral Let-7 based promoter expression constructs showing expression of the RNA species and processing into a species of a size comparable to that of synthetic siRNAs.
- Figure 24 shows a knock-down efficiency comparison of two
- 20 viral U6-promoter based expression constructs with different loop sequences, and the successful knock-down by viral expression constructs.
- Figure 25A is a schematic representation of the cloning strategy for library construction showing utilization of SapI
- 25 sites and an e. coli. death gene.
- Figure 25B is a schematic representation of the cloning strategy for library construction. Adenoviral vector development for 56 nt inserts.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

Figure 26 is a schematic representation of the cloning strategy for library construction. Adenoviral vector development for 51 nt inserts.

5 Figure 27 shows the successful knock-down of endogenous GNAS by adenoviral knock-down constructs as measured by real time PCR. The results show that the knock-down effect is dependent on MOI.

Figure 28 shows the specificity of the adenoviral knock-down constructs targeted against endogenous GNAS.

10 Figure 29 A-C show the successful knock-down of several endogenous mRNA by adenoviral knock-down constructs as measured by real time PCR. The knock-down effect is dependent on MOI and time.

15 Figure 30 shows the functional knock-down of GNAS. Adenoviral constructs encoding sRNA targeted against GNAS give a specific knock-down of GNAS on the functional level.

Detailed Description

20 The following definitions are used in the description and examples to assist in understanding the scope of the present invention.

25 "Chimeric RNA" as used herein means an RNA molecule constructed from at least two polynucleotide sequences that covalently linked together and that derived from at least two different RNA molecules that may or may not be in the same or different species.

"Guide sequence" as used herein means a polynucleotide sequence that is complementary to a target sequence.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

"Lethal protein" means proteins that may kill the cell in which the protein is produced, if produced in a lethal amount. Lethal proteins include proteins that induce apoptosis, such as Bax, Bcl-Xs, Bad and Bak, Fas, and Casp1, and proteins that inhibit viral replication, inhibit proliferation or inhibit protein synthesis both at the level of transcription or translation. Further specific examples of toxic proteins are full length Tiam, Rac, Rho, and Ras.

"siRNA" as used herein means a double stranded short interfering RNA molecule of no larger than about 23 nucleotides in length. The scientific literature describes siRNA as mediating the sequence specific degradation of a target mRNA.

"sRNA" as used herein means a single or double stranded RNA molecule of less than about 25 nucleotides. sRNA comprises both stRNA and siRNA molecules.

"stRNA" as used herein means a single stranded small temporal RNA molecule that is complementary to a 3' untranslated region in RNA in a host cell.

"Stem-loop" as used herein means a single stranded polynucleotide including two sequences of base pairs that complement each other and that permit the formation of a complementing duplex structure in the single-stranded polyribonucleotide, and a non-complementing loop sequence linking said two sequences of base pairs. The complementing base pairs making up the stem portion of the loop consist of at least two, and more preferably at least three base pairs in length. In certain special embodiments, where the stem base pair(s) correspond to the complementing sequence of the first and third sequences, one or more of the second sequence complementing stem base pairs can double as a first and third

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

sequence complementing base pair. Under these special circumstances, the stem portion of the second sequence would be considered to contain only one complementing base pair, or no complementing base pairs.

- 5 "Target sequence" as used herein means a polyribonucleotide sequence present in RNA in a host cell.

- "Transfecting" as used herein means any way of introducing a nucleic acid into a cell as is known by a person skilled in the art. It includes but is not limited to transduction by
10 e.g. calcium phosphate or liposomes based reagents, infection by e.g. viral vectors, phages, electroporation, via a soaking process, or introduction of the nucleic acid using a physical method like micro-injection or DNA coated particle bombardment.

- 15 The self-complementing single stranded polynucleotide according to the present invention comprises a first guide sequence and a second sequence capable of forming a stem-loop structure within said second sequence when said second sequence is RNA. A preferred embodiment of the polynucleotide
20 includes a third sequence, which complements the first guide sequence and is covalently linked to the distal end of the second sequence. In the most preferred self-complementary polynucleotide of the present invention, all nucleotides in said first and third sequences base pair. The preferred self-
25 complementing polynucleotides comprise a second nucleotide sequence that comprises a stem-loop forming region derived from RNA molecules other than mRNA.

- The present invention provides for either the first or third sequences to be a guide sequence that functions to direct the
30 strRNA, siRNA, sRNA or chimeric RNA encoded by the single stranded polynucleotide to an RNA having a complementary

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

sequence in the host cell system. The first and third polynucleotide sequences have a length consisting of about 17 to about 23 nucleotides, and preferably from about 19 to about 22 nucleotides, and most preferably about 19 or about 21 nucleotides, all of which correspond to a sequence found in a specific RNA. The RNA in the host cell may be a RNA molecule such as mRNA, tRNA, snRNA, rRNA, mtRNA, or structural RNA, or an RNA found in the host cell, which RNA is present as a result of a viral, bacterial or parasitic infection.

Preferred RNA molecules are mRNA molecules. The RNA in the host cell may be a known RNA coding for a known RNA molecule or a protein of known function, or may not be known to be associated with any particular protein or cellular function.

Preferred stem-loop sequences are based on stem-loop regions known to those persons skilled in the art to be present in RNA molecules such as, tRNA, snRNA, rRNA, mtRNA, or structural RNA sequences. Persons skilled in the art can readily identify stem-loop RNA structures using predictive computer modeling programs such as Mfold (M. Zuker, D.H. Mathews & D.H. Turner Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide In *RNA Biochemistry and Biotechnology*, 11-43, J. Barciszewski & B.F.C. Clark, eds, NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, (1999)), RNAstructure (Mathews, D.H.; Sabina, J.; Zuker, M.; and Turner, D.H., "expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structures", *Journal of Molecular Biology*, 1999, 288, 911-940), RNAfold in the Vienna RNA Package (Ivo Hofacker, Institut für theoretische Chemie, Währingerstr. 17,A-1090 Wien, Austria), Tinoco plot (Tinoco, I.Jr., Uhlenbeck, O.C. & Levine, M.D. (1971) *Nature* **230**, 363-367), ConStruct, which seeks conserved secondary structures (Lück, R., Steger, G. & Riesner, D. (1996), Thermodynamic prediction of conserved secondary

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

- structure: Application to RRE-element of HIV, tRNA-like element of CMV, and mRNA of prion protein. *J. Mol. Biol.* **258**, 813-826; and Lück, R., Gräf, S. & Steger, G. (1999), *ConStruct*: A tool for thermodynamic controlled prediction of conserved secondary structure. *Nucleic Acids Res.* **21**, 4208-4217.), FOLDALIGN, (J. Gorodkin, L. J. Heyer and G. D. Stormo. *Nucleic Acids Research*, Vol. 25, no. 18 pp 3724-3732, 1997a; and J. Gorodkin, L. J. Heyer, and G. D. Stormo. *ISMB* 5; 120-123, 1997b), and RNAdraw (Ole Matzura and Anders Wennborg Computer Applications in the Biosciences (CABIOS), Vol. 12 no. 3 1996, 247-249).

- RNA stem-loop structures are also found in databases such as the Small RNA Database (Karthika Perumal, Jian Gu, Yahua Chen and Ram Reddy Department of Pharmacology, Baylor College of Medicine, USA), Database of non-coding RNAs (Erdman VA, Barciszewska MZ, Szymanski M, Hochberg A. the non-coding RNAs as riboregulators (2001) *Nucleic Acids Res.* 29: 189-193), large subunit rRNA database (Wuyts J., De Rijk P., Van de Peer Y., Winkelmans T., De Wachter R. (2001) The European Large Subunit Ribosomal RNA database. *Nucleic Acids Res.* 29(1): 175-177), the small subunit rRNA database (Wuyts, J., Van de Peer, Y., Winkelmans, T., De Wachter R. (2002) The European database on small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* **30**, 183-185), snoRNA Database for budding yeast (Lowe and Eddy, Science 283: 1168-1171, 1999) for Archaea (Omer, Lowe, Russel, Ebhardt, Eddy and Dennis Science 288: 517-522, 2000), for Arabidopsis thaliana: (Brown, Clark, Leader, Simpson and Lowe RNA 7:1817-1832, 2001), tRNA sequences and sequences of tRNA genes (Mathias Sprinzl, Konstantin S. Vassilenko, <http://www.uni-bayreuth.de/departments/biochemie/trna/>), the 5S ribosomal RNA database (Szymanski M, Barciszewska MZ, Erdman VA, Barciszewski J, "5S ribosomal RNA database" (2002) *Nucleic Acid Res.* 30: 176-178), The Nucleic Acid Database Project

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

(NDB) at Rutgers University
(<http://ndbserver.rutgers.edu/NDB/>), The RNA Structure
Database (www.RNABase.org)

Using these programs, one can identify an RNA stem-loop
5 sequence, which can then be modified to eliminate multiple
loop regions to result in a shorter, more easily synthesized
stem-loop sequence. More preferred stem loop sequences are
derived from the let-7 nucleotide sequence, or some portion
thereof, or an artificially generated polynucleotide sequence
10 based thereon

Most preferred stem-loop regions consist essentially of a let-
7 sequence found in the host cell or some portion thereof,
some other naturally occurring RNA sequence or some portion
thereof, or an artificial polynucleotide sequence capable of
15 forming a loop structure when such polynucleotide is RNA. By
eliminating the multiple loop segments of these sequences that
are predicted by the aforesaid computer programs, stem loop
sequences that are more easily synthesized and handled are
prepared. Most preferred stem loop sequences are derived from
20 the let-7 nucleotide sequences.

The loop structure is preferably about 4 to about 30
nucleotides in length, a more preferred length is about 4 to
about 13 nucleotides, and a most preferred length is about 6
to about 12 nucleotides in length. A special embodiment of
25 loop sequences comprise those artificial sequences based on
known RNA loop sequences consisting of about 11 to about 16
nucleotides. Examples of preferred loop sequences are listed
in Figures 10 and 11.

A particularly preferred polynucleotide of the present
30 invention further comprises a fourth nucleotide sequence
consisting essentially of an RNA sequence, a single stranded

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

DNA equivalent thereof, wherein said fourth sequence is covalently linked to a free end of either the first or third sequence, and wherein said RNA sequence is capable of being cleaved enzymatically in the host cell thereby resulting in the *in situ* preparation of a RNA polynucleotide that has first or third sequences with a free 3' and 5'-end.

A further embodiment of the present polynucleotide invention further comprises a fifth nucleotide sequence consisting essentially of an RNA sequence, or a single stranded DNA equivalent thereof, which is covalently linked to a free end of said first or third sequence. The fifth RNA sequence is capable of being cleaved enzymatically in the host cell thereby resulting in the *in situ* preparation of a RNA polynucleotide that has first and third sequences with a free 3' and 5'-end.

Said fourth and fifth nucleotide sequence can be preferably derived from precursor RNAs, such as ribozymes, precursor tRNA, precursor rRNA, precursor microRNAs, RNAs recognized by ribozymes, or RNAs recognized by RNase P. Ribozymes cleave themselves such that a free 3'-or 5'-end at the said first or third nucleotide sequence is produced. Alternatively, ribozymes cleave the RNA sequences recognized by them, thereby producing free 3'-or 5'-end at the said first or third nucleotide sequence. Enzymes present in the host cell process precursor RNAs. Such fourth and fifth nucleotide sequences are preferably designed such that they are cleaved by enzymes present in the host cell.

The aforesaid fourth and fifth sequences may also be derived from "overhang" sequences found naturally, such as sequence that extend beyond the complementing portion of RNAs in the "microRNA" family. MicroRNAs (miRNAs) belong to an expanding class of non-coding RNAs of 21-24 nucleotides with let-7 RNA

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

and lin-4 RNA as founding members. MicroRNA molecules are found in the genomes of a variety of species, including worms, flies, humans and plants, and are typically expressed from approximately 70 nts long hairpin-structured RNA precursors.

- 5 These hairpin-structured precursors can also exist in a cluster of several precursors. Normally, after processing, only one strand of the duplexed region of the precursor accumulates in the cell as 21-24 nucleotides RNA. Examples of identified miRNAs are described in Lagos-Quintana, M et al. *Science* (2001) 294: 853, Lau, et al. *Science* (2001) 294: 858, Lee and Ambros *Science* (2001) 294: 862.

- A most preferred dsDNA polynucleotide according to present invention comprises a fourth sequence that functions to permit the directional cloning thereof into a DNA vector, as described in more detail below. The dsDNA polynucleotide sequences may contain restriction sites at either end that are susceptible for cleavage by one restriction enzyme or two different restriction enzymes to enable efficient cloning. The resulting termini of the dsDNA oligonucleotides preferably have overhanging nucleotide sequences (either 5' or 3' overhanging) that match the vector insertion sites. The dsDNA polynucleotide containing the cleavable restriction sites at the termini can be generated by standard molecular biological techniques, for example, by annealing two complementary ssDNA oligonucleotides. Alternatively, two annealed DNA oligonucleotides, with only restriction sites at their 5' termini, can be enzymatically extended at their complementary 3' termini to make the fully complementary double stranded DNA. Furthermore, the person skilled in the art is able to utilize blunt end cloning techniques and PCR to develop alternative routes of synthesis to achieve the directional cloning described herein.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

The aforesaid fourth and fifth sequences may or may not be transcribed from the DNA sequence present in a DNA vector of the present invention, but may function as part of the upstream promoter or downstream termination signal.

5 Consequently the fourth sequence may incorporate the start signal for RNA polymerase to transcribe, and the fifth sequence comprise a stop signal, such as a multiple "T" sequence, that transcribes into an RNA fifth sequence of multiple "U" nucleotides. Upon transcription the fourth

10 sequence may not be transcribed into RNA except for one to about five, and more preferably one to about three "G" nucleotides.

In a particular aspect of the present invention, the process of preparing the self-complementing polynucleotide uses an

15 intermediate polynucleotide consisting essentially of a first sequence consisting of about 17 to about 23 nucleotides, said first sequence covalently linked to a second sequence capable of forming a loop structure, wherein said first sequence consists essentially of a RNA sequence, a single stranded DNA

20 equivalent thereof, or a RNA or DNA sequence complementary to said RNA sequence. mRNA sequences, that are sequences that code for protein, are a special embodiment of the methods and compositions according to the present invention.

The self-complementing single-stranded polynucleotides may be

25 prepared by chemically synthesis. The process of synthesis requires that the target sequence of the RNA be known, an 17 to 23 nt sequence corresponding thereto prepared, and the synthesis continued to add the stem-loop sequence of about 4 to about 30 nucleotides, more preferably, from 6 to about 13

30 nucleotides. The isolated synthetic polynucleotide may be used to prepare a vector for use as an intermediate in the practice of the present invention, or further lengthened to include the complementing third sequence.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

In practice, from about two to about five sequences are chosen from a single RNA sequence for the preparation of a corresponding number of self-complementing polynucleotides and vectors containing the same. The present method, described in
5 more detail below, uses this "redundant" set of self-complementing single stranded polynucleotides and vectors including the same, to determine the optimum choice of RNA sequence that targets only one unique RNA that may exist among a family of RNA having homologous sequence regions.
10 Alternatively, one sequence targeted against multiple RNA targets can be designed when knock-down of more than one RNA target, e.g. RNAs belonging to a family, is desired.

Another method of preparing the self-complementing polynucleotide including said third sequence involves treating
15 a single stranded polynucleotide consisting essentially of a first polynucleotide sequence covalently linked to a second polynucleotide sequence that includes two nucleotide sequences capable of complementary base pairing and thereby forming a stem-loop structure and that has a 3' OH terminus, under
20 conditions such that said first sequence serves as a template starting at the 3' OH terminus for the synthesis of a complementary sequence thereto.

The polynucleotide produced as a result of the extension reaction using the template or by chemical synthesis comprises
25 a first nucleotide sequence and a third nucleotide sequence covalently linked by a second nucleotide sequence capable of forming a stem-loop structure such that all nucleotides in said first sequence and said third sequences are capable of base pairing with each other. The third sequence complementary
30 to said first sequence is covalently linked to the distal end of said second sequence.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

In a special embodiment of the intermediate polynucleotide of the present invention, said second nucleotide sequence contains at least one nucleotide sequence capable of being cleaved enzymatically. A more preferred embodiment comprises
5 a second sequence have at least two enzymatic cleavage sites. A particularly preferred intermediate polynucleotide comprises a second polynucleotide sequence encoding the stem portion of said stem-loop structure including at least one of said enzymatic cleavage sites.

10 Another special embodiment comprises a polynucleotide intermediate wherein at least one enzymatic cleavage site is at the 5' and/or 3' ends of said second sequence. Enzymatic cleavage sites consist of nucleotide sequences containing at least four to about eight base pairs and are known to persons
15 skilled in the art. Such sequences may add from about two to about twenty additional nucleotides to the length of the second sequence and be substituted for the complementing nucleotides defining the 5' and 3' ends of the loop sequences. Such elongated sequences may consist of from about twelve to
20 about 50 nucleotides. Preferred elongated artificial loop sequences consist of from about ten to about 36 nucleotides.

The present invention also relates to vector constructs comprising the self-complementing polynucleotide and a promoter sequence positioned upstream of the first sequence of
25 said polynucleotide. The self-complementing DNA polynucleotide sequence of the present invention may be inserted preferably into a plasmid DNA vector, an adenovirus DNA viral vector, an adeno-associated virus vector, or a herpes vector, and the RNA self-complementing polynucleotide
30 may be inserted into preferably into a retrovirus vector. The DNA plasmid vector may be delivered alone or complexed with various vehicles. The DNA, DNA/vehicle complexes, or the recombinant virus particles are locally administered to the

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

site of treatment, as discussed below. Preferably, recombinant vectors capable of expressing the present polynucleotides are locally delivered as described below, and persist in target cells. Once expressed, the self-complementing RNA molecule is processed and is guided to the endogenous target RNA, where it functions to degrade the target RNA.

Preferred promoter sequences include the microRNA promoters such as the let-7 promoter sequences, and the promoters including the pol III promoters and the pol II promoters. The pol III promoters include those promoters selected from the group consisting of 5S rRNA, tRNAs, VA RNAs, Alu RNAs, H1, and U6 small nuclear RNA promoters. The pol II promoters include those such as CMV, RSV, MMLV, tet-inducible, and IPTG-inducible promoters.

Promoters that may also be used in the expression vectors of the present invention include both constitutive promoters and regulated (inducible) promoters. The promoters may be prokaryotic or eukaryotic depending on the host. Among the prokaryotic (including bacteriophage) promoters useful for practice of this invention are lacI, lacZ, T3, T7, lambda P_r, P_L, and trp promoters. Among the eukaryotic (including viral) promoters useful for practice of this invention are ubiquitous promoters (e.g. HPRT, vimentin, actin, tubulin), intermediate filament promoters (e.g. desmin, neurofilaments, keratin, GFAP), therapeutic gene promoters (e.g. MDR type, CFTR, factor VIII), tissue-specific promoters (e.g. actin promoter in smooth muscle cells, or Flt and Flk promoters active in endothelial cells), including animal transcriptional control regions, which exhibit tissue specificity and have been utilized in transgenic animals: elastase I gene control region which is active in pancreatic acinar cells (Swift, et al. (1984) Cell 38:639-46; Ornitz, et al. (1986) Cold Spring

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

- Harbor *Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonald, (1987) *Hepatology* 7:425-515); insulin gene control region which is active in pancreatic beta cells (Hanahan, (1985) *Nature* 315:115-22), immunoglobulin gene control region which is
- 5 active in lymphoid cells (Grosschedl, et al. (1984) *Cell* 38:647-58; Adames, et al. (1985) *Nature* 318:533-8; Alexander, et al. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-44), mouse mammary tumor virus control region which is active in testicular, breast, lymphoid and mast cells (Leder, et al. (1986) *Cell* 45:485-95),
- 10 albumin gene control region which is active in liver (Pinkert, et al. (1987) *Genes and Devel.* 1:268-76), alpha-fetoprotein gene control region which is active in liver (Krumlauf, et al. (1985) *Mol. Cell. Biol.*, 5:1639-48; Hammer, et al. (1987) *Science* 235:53-8), alpha 1-antitrypsin gene control region
- 15 which is active in the liver (Kelsey, et al. (1987) *Genes and Devel.*, 1:161-71), beta-globin gene control region which is active in myeloid cells (Mogam, et al. (1985) *Nature* 315:338-40; Kollias, et al. (1986) *Cell* 46:89-94), myelin basic protein gene control region which is active in oligodendrocyte
- 20 cells in the brain (Readhead, et al. (1987) *Cell* 48:703-12), myosin light chain-2 gene control region which is active in skeletal muscle (Sani, (1985) *Nature* 314:283-6), and gonadotropic releasing hormone gene control region which is active in the hypothalamus (Mason, et al. (1986) *Science*
- 25 234:1372-8).

- Other promoters which may be used in the practice of the invention include promoters which are preferentially activated in dividing cells, promoters which respond to a stimulus (e.g. steroid hormone receptor, retinoic acid receptor),
- 30 tetracycline-regulated transcriptional modulators, cytomegalovirus immediate-early, retroviral LTR, metallothionein, SV-40, Ela, and MLP promoters.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

In the vector construction, the polynucleotides of the present invention may be linked to one or more regulatory regions in addition to a promoter. Selection of the appropriate regulatory region or regions is a routine matter, within the
5 level of ordinary skill in the art. Regulatory regions other than promoters include enhancers, suppressors, etc.

In addition to recombinant retrovirus (ssRNA virus) and adenovirus (dsDNA), systems, other viral packaging systems such as ssDNA viruses, for example, adenovirus-associated
10 virus (AAV), are suitable as for use as vector backbone in the present invention. Furthermore, other ssRNA viruses such as, for example, Sindbis virus, HIV, and Semliki Forest viruses, and other dsDNA viruses, such as for example, Epstein Barr virus, herpes simplex virus, baculovirus or vaccinia viruses
15 are useful as vector backbone constructs in the present invention. Each of these systems has a different host range. In the Sindbis virus, of the Alphavirus genus, (Invitrogen, San Diego, CA), the polynucleotide is ligated into the multiple cloning site of a Sindbis virus DNA vector, i.e.,
20 pSinRepS, operatively linked to the Sindbis subgenomic promoter and polyadenylation site; the polynucleotide replaces the Sindbis virus structural protein genes. For the production of Sindbis virus particles, the recombinant Sindbis vector encoding the oligonucleotide DNA is linearized, transcribed
25 into RNA and co-transfected into vertebrate (BHK-21, Vero) or invertebrate cells (Drosophila) with RNA transcribed from the helper vector, pDH-BB, that encodes the viral structural proteins. Following transfection, the recombinant Sindbis genomic RNA acts as an mRNA, is translated into the Sindbis
30 virus polymerase, and expresses the sRNA from the subgenomic promoter and the structural proteins from the helper RNA. Because of Sindbis virus' host range, the recombinant Sindbis virus can be packaged and used to express the encoded sRNA in

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

mammalian, avian, reptilian, mosquito and *Drosophila* cells (see for example, Xong, C. et al. (1989) *Science* 243:1188-1191; Hahn C.S. et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 89:2679-2683; Huang, H.V. et al. (1993) *US. Patent* 5,217,879; 5 Huang, M. and Sommers, J. (1991) *J. Virol.* 65:5435-5439). Also Herpes Simplex virus type 1 (HSV-1) can be used. Wild type HSV-1 is a human neurotropic virus, making them especially suitable as a vector for gene transfer to the nervous system. However, non-lytic recombinant HSV-1 has a 10 broad host range. Recombinant HSV-1 viruses can be made replication deficient by deletion of one the immediate-early genes.

Retroviruses, like murine leukemia virus, are single stranded RNA viruses that are commonly used in the clinical and 15 research area. The major advantage of retroviral gene delivery is their stable integration into target cells. Lentiviruses, like human immunodeficiency virus (HIV), belong to the retrovirus family and have been used as an alternative since lentiviral vectors can infect non-dividing cells as well as 20 dividing cells and integrate with high efficiency (Chang LJ, Gay EE, The molecular genetics of lentiviral vectors--current and future perspectives, *Curr Gene Ther.* 2001 Sep; 1(3): 237-51). Retroviruses can also be used to transduce sRNA.

For expression in AAV, the polynucleotide is cloned into an 25 AAV expression vector. To produce recombinant AAV particles, 293 cells are infected with adenovirus type 5; 4 hours later the infected cells are co-transfected with the AAV expression plasmid-oligonucleotide DNA construct and an AAV helper plasmid, pAAV/Ad (Samulski et al., (1989) *J. Virol.* 63:3822-30 3828). As recombinant AAV is produced, the 293 cells undergo cytopathology, becoming spherical and lose their ability to adhere to a tissue culture surface. Following development of maximal cytopathology the supernatant is harvested and, if

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

necessary, concentrated (Halbert et al. 1997. J. Virol. 71:5932-5941).

For vaccinia virus expression, a replication competent vaccinia virus can be used. The polynucleotide is operatively
5 linked to a vaccinia virus promoter, for example, P 11. Preferably, vaccinia virus strain MVA is used because it expresses recombinant genes but contains a deletion that renders it replication incompetent in many mammalian cells. Therefore, the polynucleotide can be expressed in target host
10 mammalian cells without the development of vaccinia virus induced cytopathology. The recombinant vaccinia virus is produced by infecting chicken embryo fibroblasts (CEF) with vaccinia and co-transfecting a transfer vector into which has been ligated the polynucleotide of the invention and a marker
15 gene (beta galactosidase) functionally linked to a vaccinia promoter, such as P11, and flanked by genomic sequences. The construct is inserted into the vaccinia genome by homologous recombination. Recombinant viruses can be identified by in situ staining for beta-galactosidase expression with X-gal
20 (Wyatt et al. (1995) Virology 210:202-205).

Additional vector systems include the non-viral systems that facilitate introduction of DNA encoding the self-complementing single-stranded RNA, or the RNA itself into a patient. For example, a DNA vector encoding a desired sequence can be
25 introduced *in vivo* by lipofection. Synthetic cationic lipids designed to limit the difficulties encountered with liposome mediated transfection can be used to prepare liposomes for *in vivo* transfection of a gene encoding a marker (Felgner, et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7); see Mackey, et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8027-31; Ulmer, et al. (1993) *Science* 259:1745-8). The use of cationic lipids may promote encapsulation of negatively charged nucleic acids, and also promote fusion with negatively charged cell membranes
30

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

(Felgner and Ringold, (1989) *Nature* 337:387-8). Particularly useful lipid compounds and compositions for transfer of nucleic acids are described in International Patent Publications WO 95/18863 and WO 96/17823, and in U.S. Patent

5 No. 5,459,127. The use of lipofection to introduce exogenous genes into the specific organs *in vivo* has certain practical advantages and directing transfection to particular cell types would be particularly advantageous in a tissue with cellular heterogeneity, for example, pancreas, liver, kidney, and the

10 brain. Lipids may be chemically coupled to other molecules for the purpose of targeting. Targeted peptides, e.g., hormones or neurotransmitters, and proteins for example, antibodies, or non-peptide molecules could be coupled to liposomes chemically. Other molecules are also useful for

15 facilitating transfection of a nucleic acid *in vivo*, for example, a cationic oligopeptide (e.g., International Patent Publication WO 95/21931), peptides derived from DNA binding proteins (e.g., International Patent Publication WO 96/25508), or a cationic polymer (e.g., International Patent Publication

20 WO 95/21931).

The more preferred viral vectors useful in the practice of the present invention are the E1-deleted adenoviral vectors, with the E1, E2A deleted vectors being most preferred. The more preferred adenoviral vectors include the E1-deleted adenoviral

25 serotype 5 vectors, with the E1, E2A deleted vectors being most preferred. Vectors may also be prepared from other adenoviral serotypes and corresponding packaging cells that include sequences for viral proteins deleted from such vector backbones. The most preferred adenoviral vector/packaging

30 cell combinations are those combinations where the packaging cell and vector do not include any overlapping adenoviral sequences, which overlap would provide the statistical possibility of the production of replication competent

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

adenoviral particles. Preferred packaging cells useful in the production of such vectors include the 293 and 911 cells, with the most preferred cells being the PER.C6 cell line. The modified PER.C6/E2A cell line is a special embodiment
5 complementing the E1, E2A deleted adenoviral vector constructs, with non-overlapping adenoviral E1, E2A sequences, and is most preferred in the practice of the present invention.

The vectors of the present invention as described herein are
10 also useful in methods of lowering the amounts of RNA or protein translated from RNA in a host cell, or subject, comprising transfecting said cell or subject with a vector that encodes a polynucleotide comprising a promoter operably linked to a first sequence consisting of about 17 to about 23
15 nucleotides and complementary to about 17 to about 23 nucleotides of said mRNA sequence in said host cell or subject, said first sequence covalently linked to a second sequence capable of forming a loop structure. Preferred vectors according to the present invention comprise the
20 aforesaid first nucleotide sequence and a third nucleotide sequence covalently linked by a second nucleotide sequence capable of forming a stem-loop structure such that all nucleotides in said first sequence and said third sequences are capable of base pairing with each other, and wherein said
25 second nucleotide sequence comprises a stem-loop forming region derived from naturally occurring RNA sequences found in RNA molecules other than mRNA, such as for example, tRNA, snRNA, rRNA, mtRNA, or structural RNA sequences. Preferred stem loop sequences are derived from the let-7 nucleotide
30 sequence, or some portion thereof, or an artificially generated polynucleotide sequence based thereon. The administration of the aforesaid vector to a subject comprises the administration of an amount of vector effective to lower

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

the amounts of said RNA in said transfected cells of said subject.

The preferred vector of the present invention including a polynucleotide comprising a promoter operably linked to a sequence of a self-complementing polynucleotide, may be prepared by denaturing the self-complementing polynucleotide, converting the resulting denatured polynucleotide into a double stranded polynucleotide, and ligating the double stranded polynucleotide into a vector capable of transfecting a host cell and transcribing said polynucleotide. Alternatively the self-complementing polynucleotide may be chemically synthesized as two single stranded polynucleotides, which are capable of being annealed to each other followed by ligation into the vector. The ligation may be accomplished preferably into an adapter plasmid that may be used to form a transfectable viral vector particle by co-transfection with a helper molecule in a packaging cell line.

A further embodiment of the vector construct encoding the self-complementing polynucleotide is wherein said second nucleotide sequence contains at least one nucleotide sequence capable of being cleaved enzymatically. A more preferred embodiment comprises a second sequence have at least two enzymatic cleavage sites. In this embodiment, said second sequence, which can be any length, can be removed by enzymatic cleavage and replaced by a stem-loop sequence. In a further embodiment the second nucleotide sequence encodes for a gene useful for the facilitation of cloning stem-loop sequences into the vector. In a further special embodiment the gene useful for the facilitation of cloning stem-loop sequences into the vector is the E. coli ccdB death gene.

The present vectors may be administered to a patient by a variety of methods. They may be added directly to target

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

tissues, complexed with cationic lipids, packaged within liposomes, or delivered to target cells by other methods known in the art. Localized administration to the desired tissues may be done by catheter, infusion pump or stent, with or
5 without incorporation of the self-complementing polynucleotide in biopolymers. Alternative routes of delivery include, but are not limited to, intravenous injection, intramuscular injection, subcutaneous injection, aerosol inhalation, oral (tablet or pill form), topical, systemic, ocular,
10 intraperitoneal and/or intrathecal delivery.

Preferably, the viral vectors used in the gene therapy methods of the present invention are replication defective. Such replication defective vectors will usually lack at least one region that is necessary for the replication of the virus in
15 the infected cell. These regions can either be eliminated (in whole or in part), or be rendered non-functional by any technique known to a person skilled in the art. These techniques include the total removal, substitution, partial deletion or addition of one or more bases to an essential (for
20 replication) region. Such techniques may be performed *in vitro* (on the isolated DNA) or *in situ*, using the techniques of genetic manipulation or by treatment with mutagenic agents. Preferably, the replication defective virus retains the sequences of its genome that are necessary for encapsidating
25 the viral particles.

Certain embodiments of the present invention use retroviral vector systems. Retroviruses are integrating viruses that infect dividing cells, and their construction is known in the art. Retroviral vectors can be constructed from different
30 types of retrovirus, such as, MoMuLV ("murine Moloney leukemia virus" MSV ("murine Moloney sarcoma virus"), HaSV ("Harvey sarcoma virus"); SNV ("spleen necrosis virus"); RSV ("Rous sarcoma virus") and Friend virus. Lentivirus vector systems

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

such as human immunodeficiency virus (HIV) or equine lentivirus may also be used in the practice of the present invention.

5 In other embodiments of the present invention, adeno-associated viruses ("AAV") are utilized. The AAV viruses are DNA viruses of relatively small size that integrate, in a stable and site-specific manner, into the genome of the infected cells. They are able to infect a wide spectrum of cells without inducing any effects on cellular growth, morphology or differentiation, and they do not appear to be
10 involved in human pathologies.

It is also possible to introduce a DNA vector *in vivo* as a naked DNA plasmid (see U.S. Patents 5,693,622, 5,589,466 and 5,580,859). Naked DNA vectors for gene therapy can be
15 introduced into the desired host cells by methods known in the art, e.g., transfection, electroporation, microinjection, transduction, cell fusion, DEAE dextran, calcium phosphate precipitation, use of a gene gun, or use of a DNA vector transporter (see, e.g., Wilson, et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267:963-7; Wu and Wu, (1988) *J. Biol. Chem.* 263:14621-4; Hartmut, et al. Canadian Patent Application No. 2,012,311, filed March 15, 1990; Williams, et al (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2726-30). Receptor-mediated DNA delivery approaches can also be used (Curiel, et al. (1992) *Hum. Gene*
20 *Ther.* 3:147-54; Wu and Wu, (1987) *J. Biol. Chem.* 262:4429-32).
25

The present invention, in a particular embodiment, relates to a composition comprising a self-complementing polynucleotide that is used to down-regulate or block the expression of specific polypeptides or specific non-coding RNA molecules.
30 In one preferred embodiment, the nucleic acid encodes a self-complementing sRNA molecule covalently linked by a stem-loop RNA sequence. In this embodiment, the nucleic acid is

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

operably linked to signals enabling expression of the nucleic acid sequence and is introduced into a cell utilizing, preferably, recombinant vector constructs, which will express the polynucleic acid once the vector is introduced into the cell. Examples of suitable vectors include plasmids, adenoviruses, adeno-associated viruses, retroviruses, and herpes viruses.

The present invention provides biologically compatible compositions comprising the polynucleotides and/or vectors of the present invention. A biologically compatible composition is a composition, that may be solid, liquid, gel, or other form, in which the polypeptide, polynucleotides, vector, or antibody of the invention is maintained in an active form, e.g., in a form able to effect a biological activity. For example, a nucleic acid would be able to replicate, transcribe, translate a message, or hybridize to a complementary nucleic acid; and a vector would be able to transfect a target cell. A preferred biologically compatible composition is an aqueous solution that is buffered using, e.g., Tris, phosphate, or HEPES buffer, containing salt ions. Usually the concentration of salt ions will be similar to physiological levels. Biologically compatible solutions may include stabilizing agents and preservatives. In a more preferred embodiment, the biocompatible composition is a pharmaceutically acceptable composition.

Such compositions can be formulated for administration by topical, oral, parenteral, intranasal, subcutaneous, and intraocular, routes. Parenteral administration is meant to include intravenous injection, intramuscular injection, and intraarterial injection or infusion techniques. The composition may be administered parenterally in dosage unit formulations containing standard, well-known nontoxic

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

physiologically acceptable carriers, adjuvants, and vehicles as desired.

Pharmaceutical compositions for oral administration can be formulated using pharmaceutically acceptable carriers well known in the art in dosages suitable for oral administration. Such carriers enable the pharmaceutical compositions to be formulated as tablets, pills, dragees, capsules, liquids, gels, syrups, slurries, suspensions, and the like, for ingestion by the patient. Pharmaceutical compositions for oral use can be prepared by combining active compounds with solid excipient, optionally grinding a resulting mixture, and processing the mixture of granules, after adding suitable auxiliaries, if desired, to obtain tablets or dragee cores. Suitable excipients are carbohydrate or protein fillers, such as sugars, including lactose, sucrose, mannitol, or sorbitol; starch from corn, wheat, rice, potato, or other plants; cellulose, such as methyl cellulose, hydroxypropylmethylcellulose, or sodium carboxymethyl-cellulose; gums including arabic and tragacanth; and proteins such as gelatin and collagen. If desired, disintegrating or solubilizing agents may be added, such as the cross-linked polyvinyl pyrrolidone, agar, alginic acid, or a salt thereof, such as sodium alginate. Dragee cores may be used in conjunction with suitable coatings, such as concentrated sugar solutions, which may also contain gum arabic, talc, polyvinyl-pyrrolidone, carbopol gel, polyethylene glycol, and/or titanium dioxide, lacquer solutions, and suitable organic solvents or solvent mixtures. Dyestuffs or pigments may be added to the tablets or dragee coatings for product identification or to characterize the quantity of active compound, *i.e.*, dosage.

Pharmaceutical preparations that can be used orally include push-fit capsules made of gelatin, as well as soft, sealed capsules made of gelatin and a coating, such as glycerol or

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

sorbitol. Push-fit capsules can contain active ingredients mixed with filler or binders, such as lactose or starches, lubricants, such as talc or magnesium stearate, and, optionally, stabilizers. In soft capsules, the active compounds may be dissolved or suspended in suitable liquids, such as fatty oils, liquid, or liquid polyethylene glycol with or without stabilizers.

Preferred sterile injectable preparations can be a solution or suspension in a nontoxic parenterally acceptable solvent or diluent. Examples of pharmaceutically acceptable carriers are saline, buffered saline, isotonic saline (e.g. monosodium or disodium phosphate, sodium, potassium, calcium or magnesium chloride, or mixtures of such salts), Ringer's solution, dextrose, water, sterile water, glycerol, ethanol, and combinations thereof. 1,3-butanediol and sterile fixed oils are conveniently employed as solvents or suspending media. Any bland fixed oil can be employed including synthetic mono- or di-glycerides. Fatty acids such as oleic acid also find use in the preparation of injectables.

The composition medium can also be a hydrogel, which is prepared from any biocompatible or non-cytotoxic homo- or hetero-polymer, such as a hydrophilic polyacrylic acid polymer that can act as a drug absorbing sponge. Certain of them, such as, in particular, those obtained from ethylene and/or propylene oxide are commercially available. A hydrogel can be deposited directly onto the surface of the tissue to be treated, for example during surgical intervention.

Preferred pharmaceutical compositions of the present invention comprise a replication defective recombinant viral vector and the polynucleotide identified by the present invention. A special embodiment of the composition invention includes also a transfection enhancer, such as poloxamer. An example of a

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

poloxamer is Poloxamer 407, which is commercially available (BASF, Parsippany, NJ) and is a non-toxic, biocompatible polyol. A poloxamer impregnated with recombinant viruses may be deposited directly on the surface of the tissue to be treated, for example during a surgical intervention. Poloxamer possesses essentially the same advantages as hydrogel while having a lower viscosity.

The formulation herein may also contain more than one active compound as necessary for the particular indication being treated, preferably those with complementary activities that do not adversely affect each other. Alternatively, or in addition, the composition may comprise a cytotoxic agent, cytokine or growth inhibitory agent. Such molecules are suitably present in combination in amounts that are effective for the purpose intended. The formulations to be used for in vivo administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes.

The active ingredients of the present invention may also be entrapped in microcapsules prepared, for example, by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacrylate) microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles and nanocapsules) or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 16th edition, Osol, A. Ed.

Sustained-release preparations may be prepared. Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the antibody, which matrices are in the form of

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

shaped articles, e.g. films, or microcapsules. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate), or poly(vinylalcohol)), polylactides (U.S. Patent No. 3,773,919),
5 copolymers of L-glutamic acid and gamma-ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the LUPRON DEPOTTM (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid.
10 While polymers such as ethylene-vinyl acetate and lactic acid-glycolic acid enable release of molecules for over 100 days, certain hydrogels release proteins for shorter time periods.

The present invention provides methods of treatment that comprise the administration to a human or other animal of an
15 effective amount of a composition of the invention. A therapeutically effective dose refers to that amount of the present polynucleotide that ameliorates the symptoms or condition. Therapeutic efficacy and toxicity of such compounds can be determined by standard pharmaceutical
20 procedures in cell cultures or experimental animals, e.g., ED50 (the dose therapeutically effective in 50% of the population) and LD50 (the dose lethal to 50% of the population). The dose ratio of toxic to therapeutic effects is the therapeutic index, and it can be expressed as the ratio,
25 LD50/ED50. Pharmaceutical compositions that exhibit large therapeutic indices are preferred. The data obtained from cell culture assays and animal studies is used in formulating a range of dosage for human use. The dosage of such compounds lies preferably within a range of circulating concentrations
30 that include the ED50 with little or no toxicity. The dosage varies within this range depending upon the dosage form employed, sensitivity of the patient, and the route of administration.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

For any polynucleotide of the present invention, the therapeutically effective dose can be estimated initially either in cell culture assays or in animal models, usually mice, rabbits, dogs, or pigs. The animal model is also used to achieve a desirable concentration range and route of administration. Such information can then be used to determine useful doses and routes for administration in humans. The exact dosage is chosen by the individual physician in view of the patient to be treated. Dosage and administration are adjusted to provide sufficient levels of the active moiety or to maintain the desired effect. Additional factors which may be taken into account include the severity of the disease state, age, weight and gender of the patient; diet, desired duration of treatment, method of administration, time and frequency of administration, drug combination(s), reaction sensitivities, and tolerance/response to therapy. Long acting pharmaceutical compositions might be administered every 3 to 4 days, every week, or once every two weeks depending on half-life and clearance rate of the particular formulation.

As discussed hereinabove, recombinant viruses may be used to introduce DNA encoding the self-complementing single stranded polynucleotides, as well as the self-complementing single stranded RNA. Recombinant viruses according to the invention are generally formulated and administered in the form of doses of between about 10^4 and about 10^{14} pfu. In the case of AAVs and adenoviruses, doses of from about 10^6 to about 10^{11} pfu are preferably used. The term pfu ("plaque-forming unit") corresponds to the infective power of a suspension of virions and is determined by infecting an appropriate cell culture and measuring the number of plaques formed. The techniques for determining the pfu titre of a viral solution are well documented in the prior art.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

Self-complementing polynucleotides according to the present invention may be administered in a pharmaceutically acceptable carrier. Dosage levels may be adjusted based on the measured therapeutic efficacy.

- 5 In another embodiment, the self-complementing polynucleotide is synthesized and may be chemically modified to resist degradation by intracellular nucleases. Synthetic oligonucleotides can be introduced to a cell using liposomes. Cellular uptake occurs when an oligonucleotide is encapsulated
- 10 within a liposome. With an effective delivery system, low, non-toxic concentrations of the polynucleotide molecule can be used to degrade the target RNA. Moreover, liposomes that are conjugated with cell-specific binding sites may direct a polynucleotide to a particular tissue.
- 15 In another aspect of the present invention, the polynucleotide vector is transferred into the target tissue using one of the vector delivery systems herein. This transfer is carried out either *ex vivo* in a procedure in which the nucleic acid is transferred to cells in the laboratory and the modified cells
- 20 are then administered to the human or other animal, or *in vivo* in a procedure in which the nucleic acid is transferred directly to cells within the human or other animal. In preferred embodiments, an adenoviral vector system is used to deliver the expression vector. If desired, a tissue specific
- 25 promoter is utilized in the expression vector as described above.

- Non-viral vectors may be transferred into cells using any of the methods known in the art, including calcium phosphate co-precipitation, lipofection (synthetic anionic and cationic
- 30 liposomes), receptor-mediated gene delivery, naked DNA injection, electroporation and bio-ballistic or particle acceleration.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

The present invention may be used in *in vitro* validation of drug targets, screening for novel drug targets by knocking down genes in cellular assays, and in animal studies for *in vivo* target validation development of therapeutics.

- 5 The subject invention relates also to methods and compositions for the high throughput delivery and expression in a host of guide nucleic acid(s) targeting RNA of known or unknown function. Methods are described for infecting a host with the adenoviral vectors that express the self-complementing RNA
- 10 molecules including the guide nucleic acid(s) in the host, identifying an altered phenotype induced in the host by the knockdown of the target RNA nucleic acids, and thereby assigning a function to the product(s) encoded by the target nucleic acids. The methods can be fully automated and
- 15 performed in a multiwell format to allow for convenient high throughput analysis of sample nucleic acid libraries, which samples code for the guide sequences for use in this method.

- The present invention may be used to prepare libraries of vectors, consisting essentially of the polynucleotide
- 20 constructs as described herein. These libraries may be prepared as single element, compartmentalized, or discrete elements, wherein each element consists essentially of a vector coding for a unique nucleotide sequence. Alternatively, a library comprising pools of vectors may be
- 25 prepared.

- The libraries may be used to assist in the elucidation of the functions of host cell RNA molecules including the unique polynucleotide residing in each compartment of said library, or in other words, determining the function of a naturally
- 30 occurring polynucleotide sequence comprising transfecting a host cell with a vector according to the invention, said vector including a polynucleotide sequence complementary to a

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

portion of said naturally occurring polynucleotide and detecting a change in cellular phenotype. Each vector in the library may be introduced into one or more cells and changes in protein expression, or phenotype observed. The vectors may
5 comprise plasmids, naked RNA, or included in a viral vector construct. Alternatively, more than one vector thereby introducing more than one guide sequence can be introduced into a single host cell. Preferred viral vectors include the adenoviral, retroviral and AAV-vectors. More preferred are
10 the adenoviral vectors, and most preferred are the adenoviral vectors that comprise a replication deficient construct that may be multiplied in a packaging cell having complementary sequences to the sequence contained in the vector itself.

The present invention provides for the temporary knock-down of
15 proteins, such as lethal proteins, during virus production, thereby allowing the replication and packaging of virus that include sequences encoding for lethal proteins. sRNA can be used to knock-down gene expression during viral production with any virus and in any viral packaging cell line.
20 Accordingly, the present invention relates to a method of producing viral vectors encoding a toxic protein comprising

- (a) introducing into a cell a polynucleotide sequence as described herein having a first sequence that is complementary to the mRNA coding for said toxic protein,
- 25 (b) introducing said viral vector into said cell,
- (c) culturing said cells under conditions allowing expression of said polynucleotide sequence and replication of said viral vector, and
- (d) recovering said viral vectors.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

A preferred method of the present invention uses viral packaging cells that are stably transfected with said polynucleotide.

Viral production using adenovirus retrovirus or alphavirus benefit from such knock down methods, and examples of packaging cells include adenoviral packaging cells, such as PER.C6 cells, and derivatives thereof, HEK293 cells, 293 and 911 cells, among others. Furthermore, sRNA knock-down methodology is useful for improving recombinant protein production. Such protein production methods benefit from the down-modulation of heterologous protein expression prior to achieving the optimal production cell titre for protein production.

The present invention may be applied to every viral packaging and protein production system without a need for optimization. Knock-down constructs described herein may be transfected into any selected packaging cell and such transfected cells are used directly. The present invention uses virus constructs that are used directly to infect cells and no further compound is required by the system to induce virus or protein production.

The sequences between transcription start and the 5' end of the expression cassette that is used to express exogenous genes can be used to knock down the expression of those exogenous genes during virus production. Polynucleotides of the present invention, which polynucleotides includes guiding sequences targeted against the sequence between transcription start and the 5' end of the expression cassette, are co-transfected with the viral plasmid(s) carrying the sequence for the toxic protein, into the packaging cells. Alternatively, a vector according to the invention, encoding polynucleotides that down-modulate expression of target

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

sequences, either by inhibiting translation or by break down of the mRNA, are used. The vector can be used transiently or used to generate a stable derivative of the packaging cell line.

- 5 The various aspects of the present invention are further described in the following non-limiting examples.

EXAMPLES

Example 1: A reporter assay system based on let-7 target sequence to monitor repression

- 10 Example 1 describes development of a reporter assay system that provides a method for measuring knockdown of a readily assayed gene. This system is used to determine if siRNAs and chimeric RNAs can decrease expression of the readily assayed luciferase gene. The system consists of two components.
- 15 The first component is a reporter DNA molecule based on the pGL3 luciferase reporter vector (available from Promega), which has been modified to include a let-7 target sequence derived from the human let-7 sequence found on chromosome 22. These reporter constructs are designated as follows: The names start
- 20 with a 'p' indicating that the construct is in a plasmid, then the name of the reporter gene follows (e.g. GL3 or GL2), after that the target sequence is mentioned starting with a 't' to indicate that it is the target sequence. For example: pGL3-tLet7 describes a plasmid containing the GL3 gene as reporter
- 25 and Let7 sequences as target for the knockdown RNA. The second component is a siRNA or a plasmid expressing siRNA or chimeric RNAs. siRNAs are double stranded short interfering RNA molecules no larger than about 23 nucleotides in length. Chimeric RNAs as used herein refer to an RNA molecule
- 30 constructed from at least two polynucleotide sequences that are covalently linked together and derived from at least two

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

different RNA molecules that may be from the same or different species. The scientific literature describes siRNA as mediating the sequence specific degradation of a target mRNA. In the present application these siRNAs are designated as follows: siRNA followed by the name of the target gene, e.g. siRNA GL3.1 is a duplex siRNA targeted against the GL3 gene. In this example a reporter construct, a siRNA, and an internal control used to normalize luciferase activity (Renilla: pRL-TK) are combined together and used to transfect host cells and the luciferase activity measured. If the siRNA knocks down expression of luciferase mRNA, a reduction of luciferase activity is seen relative to controls. The reporter system is described below. The description is meant only as an example and is in no way limiting to the invention.

The reporter system is based on the pGL3 luciferase reporter vector (Promega). The let-7 target DNA sequence (5'-ACTATACAACCTACTACCTCA-3' SEQ ID NO: 1) is introduced just outside of the GL3 coding region in a pGL3-reporter vector, such that it expresses a GL3 mRNA that contains the let-7 target sequence.

A. Construction pGL3-tLet-7 reporter constructs.

The pGL3-control vector (GenBank Accession Number U47296) is linearized at its unique Xba I site, which is immediately 3' of the GL3 coding sequence. The double stranded let-7 target DNA sequence is generated using complementary DNA oligonucleotides (Oligo 1 and Oligo 2). In order to facilitate cloning into the Xba I site of pGL3, Oligo 1 and Oligo 2 are designed such that upon annealing, the double stranded let-7 target DNA thus generated has 5' overhangs on each end that are compatible with an Xba I restriction site. Annealing of Oligo 1 and Oligo 2 is accomplished by mixing the oligos in equimolar amounts to a final concentration of 0.5 nmole/μl each in annealing buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

mM MgCl₂, 50 mM NaCl], followed by incubation of the mixture for 1 minute at 90°C and 60 minutes at 37°C. The annealed oligos are then ligated into the Xba I site of the linearized pGL3 vector using common techniques as described in Sambrook et al.

The Let-7 target DNA sequence is SEQ ID NO: SEQ ID NO: 1:

5'-ACTATACAACCTACTACCTCA-3'

Sequences DNA Oligos (5' to 3'):

OLIGO 1 5'-CTAGTACTATACAACCTACTACCTCA-3' (SEQ ID NO: SEQ ID NO: 2)

OLIGO 2 5'-CTAGTGAGGTAGTAGGTGTATAGTA-3' (SEQ ID NO: SEQ ID NO: 3)

The annealed Oligos 1 and 2 give the following double stranded structure:

ScaI site: (AGTACT)

OLIGO 1 5'-CTAGTACTATACAACCTACTACCTCA-3'

|||||

OLIGO 2 3'-ATGATATGTTGGATGATGGAGTGATC-5'

Underlined nucleotides denote the Xba I compatible ends. The cloning of the oligos into the vector results in an extra Sca I site (bolded nucleotides), which facilitates the selection of clones with the insert and enables the discrimination between clones with an insert in the forward (F) orientation or clones with an insert in the reverse (R) orientation. The original Xba I site from the starting pGL3-control vector is destroyed by the cloning process and thus is absent in the clones with inserts. The clones are tested for presence of the insert by performing PCR on the transformed bacteria directly, using the following primers:

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

OLIGO 3 5'-CATCTTCGACGCAGGTGTCGCA-3' (SEQ ID NO: SEQ ID NO: 4) (position 1668-1689 according to Promega catalog and U47296 sequence)

OLIGO 4 5'-CCATCGTTCAGATCCTTATCGA-3' (SEQ ID NO: SEQ ID NO: 5) (position 2210-2189 according to Promega catalog and U47296 sequence)

The given positions are based on the pGL3-control vector (Accession number U47296).

Using Oligo 3 (SEQ ID NO: SEQ ID NO: 4) and Oligo 4 (SEQ ID NO: SEQ ID NO: 5) as primers and colony DNA as template, PCR products generated from clones without an insert are 543 base pairs; with an insert in either forward (F) or reverse (R) orientation PCR products are 569 base pairs.

The orientation of the insert is analyzed further by a second round of PCR using two primer combinations:

- 1) Oligo 1 (SEQ ID NO: SEQ ID NO: 2) and Oligo 3 (SEQ ID NO: SEQ ID NO: 4): PCR with let-7 target sequence in R orientation produces a DNA fragment of 297 bp; F orientation will produce no DNA product.
- 2) Oligo 1 (SEQ ID NO: SEQ ID NO: 2) and Oligo 4 (SEQ ID NO: SEQ ID NO: 5): PCR with let-7 target sequence in F orientation gives a DNA fragment of 302 bp; R orientation will produce no DNA product.

The plasmid generated by successful cloning of let-7 target DNA sequences in the forward orientation into the Xba I site of pGL3 will be known as pGL3-tlet-7F. Similarly, the plasmid generated by successful cloning of let-7 target DNA sequences in the reverse orientation into the Xba I site of pGL3 will be known as pGL3-tlet-7R. Both clones pGL3-tlet-7F and pGL3-tlet-7R are used in further experiments.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

B. siRNAs

The siRNAs that target pGL3 and pGL2 (used as a negative control; Accession Number X65324) are as described in Elbashir et al. (2001) *Nature* 411:494-498. siRNAs are double stranded

- 5 RNAs that include the target sequence and its complement. Two uridine residues are added to the 3' end of the RNAs.

siRNA-GL2.1:

GL2 Target DNA Sequence

5'..CGTACGCGGAATACTTCGA..3' (SEQ ID NO: 6)

- 10 siRNA-GL2.1-

sense 5'-CGUACGCGGAUACUUCGAUU-3' (SEQ ID NO: 7)

|||||

-antisense 3'-UUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU-5' (SEQ ID NO: 8)

siRNA-GL3.1:

- 15 GL3 Target DNA Sequence

5'..CTTACGCTGAGTACTTCGA..3' (SEQ ID NO: 9)

siRNA-GL3.1-

sense 5'-CUUACGCGAGUACUUCGAUU-3' (SEQ ID NO: 10)

|||||

- 20 antisense 3'-UUGAAUGCGACUCAUGAAGCU-5' (SEQ ID NO: 11)

The siRNA that targets the let-7 target sequence is:

siRNA-let7.1:

Let-7 Target DNA Sequence

5'..TATACAACCTACTACCTCA..3' (SEQ ID NO: 12)

- 25 siRNA-let7.1-

sense 5'-UUAUACAACCUACUACCUCAUU-3' (SEQ ID NO: 13)

|||||

antisense 3'-UUAUAUGUUGGAUGAUGGAGU-5' (SEQ ID NO: 14)

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

Each RNA oligo pair is annealed as described in Elbashir et al. (2001) *Nature* 411:494-498 in order to obtain the duplexed siRNA.

C. *Co-transfection of pGL3-reporter constructs and siRNAs*

- 5 The let-7 targeting system is tested by transfecting a DNA/RNA mixture consisting of three components into host cells (for example HeLa or PER.C6/E2A cells):

1. Luciferase-based reporter construct
 - a. pGL3-control (Promega), or
 - 10 b. pGL3-tLet-7F, or
 - c. pGL3-tLet-7R
2. Internal control for normalization
 - a. pRL-TK (Promega; Acc. Number AF025846)
3. Duplexed siRNA
 - 15 a. siRNA-GL3.1, or
 - b. siRNA-let-7.1, or
 - c. siRNA-GL2.1

Day 1:

- HeLa or PER.C6/E2A cells are seeded 20 hrs prior to
- 20 transfection in 96-well format at 4.5×10^4 cells/100 μ l medium (DMEM +10% heat inactivated Fetal Bovine Serum for HeLa cells; DMEM +10% non-heat inactivated Fetal Bovine Serum for PER.C6/E2A cells)/well.

Day 2:

- 25 Per well DNA/RNA mixtures are prepared in 25 μ l (total volume) OptiMEM containing:
1. 0.25 μ g pGL3-control, or
 - 0.25 μ g pGL3-tLet-7F, or
 - 0.25 μ g pGL3-tLet-7R

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

- 2.25 ng pRL-TK
- 3.66.5 ng siRNA-GL3.1, or
- 66.5 ng siRNA-let-7.1, or
- 66.5 ng siRNA-GL2.1, or
- 5 no siRNA

LipofectAMINE2000 (0.8 μ l) and OptiMEM (24.2 μ l) are incubated for 7-10 minutes at room temperature and added to each DNA/RNA mixture. This mixture (final volume 50 μ l) is incubated for 15-25 minutes at room temperature and subsequently added to the cells from which the medium has been removed. The cells are incubated for 48 hrs in a 37°C incubator under 10% CO₂.

Day 4:

The cells are harvested, lysed, and firefly luciferase and renilla luciferase activities measured using the Dual Luciferase kit (Promega) according to the manufacturer's instructions. The absolute firefly luciferase value (luc) of each sample is divided by its internal absolute renilla luciferase value (ren) to obtain the relative luc/ren-value. These relative luc/ren-values are compared to the control sample where no siRNA is included.

The results of transient transfection on PER.C6/E2A are shown in Figure 1. It shows the repression of luciferase activity of pGL3-fusion constructs containing let-7 target sequences by let-7 siRNAs in PER.C6/E2A cells. PER.C6/E2A cells are transiently transfected with the pGL3-fusion constructs containing let-7 target sequences in either orientation (pGL3-tLet-7F, pGL3-tLet-7R) or pGL3-control lacking let-7 sequences, in combination with each of the siRNA duplexes siRNA GL3.1, siRNA let-7.1, siRNA GL2.1, or no siRNA. Co-transfection of siRNA let-7.1 specifically represses luciferase activity of the reporters pGL3-tLet7F and pGL3-

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

tlet7R, but not the pGL3-control. Co-transfection of the positive control siRNA GL3.1 shows repression of all the reporter constructs (pGL3-tlet-7F, pGL3-tlet-7R, pGL3-control).

5 Example 2: Testing chimeric let-7 RNAs

This example describes preparation of let-7-based chimeric RNAs, which are tested for the ability to knock down gene expression in the system described in Example 1.

- The two complementary RNA strands of the siRNA-duplexes of Example 1 are covalently linked using an RNA loop structure, making a single RNA molecule containing both siRNA strands. This results in a molecule folding into an RNA-duplex with a loop structure on one side of the duplex and a 3' overhang of 2 uridine residues on the other side of the duplex. Molecules containing this loop structure and the sequences are referred to as chimeric RNAs. The constructs are referred to as follows: loop RNA followed by the gene they are targeted against, e.g. loop RNA GL2.2 is a chimeric RNA molecule containing a loop directed against GL2. The extension '.2' is to indicate that the RNA contains a loop in contrast to the extension '.1' used in Example 1 indicating a duplex RNA without a loop structure. The loop structure used here is the let-7 loop and meant as an example and in no way intended to limit to the invention.
- Such a chimeric RNA molecule is shown below (see also sR-hlet7.2-as below). The complementary RNA regions are shown in uppercase, while the loop region and 3' uridines are shown in lowercase. The loop region is also underlined.

Linear representation of a chimeric RNA (SEQ ID NO: 15):

PCT/EP02/09670

During an annealing reaction, the complementary regions of the above chimeric RNA molecule anneal and form a stem-loop as shown below. A siRNA molecule is shown for comparison.

5' -UGAGGUAGUAGGUUGUAUAguuuuggggcucugc
 |||||
 C

siRNA:

15 Additionally, chimeric RNAs having 5' and 3' extensions can be generated. The sequence of the 5' and 3' extensions are based upon adjacent let-7L RNA sequence:

3' terminus: ..CCGUGAAGUCCU-3' (SEQ ID NO: 17)

A chimeric RNA molecule with 5' and 3' extensions is shown below. The 5' and 3' extensions are bolded.

-54-

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

5'-ggc cuuuggggUGAGGUAGUAGGUUAUAguuuggggcucugc
 |||||
 3'-cggugaaguccuACUCCAUCAUCCAACAUAUcaauaggguaucguc

Synthesis of chimeric let-7 siRNAs can be accomplished by in
 5 vitro transcription of the chimeric RNA using T7 RNA
 Polymerase, as described below. The template for the
 polymerase is DNA cloned into pUC19.

A. Co-transfection of the pGL3 reporter constructs with
 siRNA, or chimeric RNAs

- 10 Similarly, as described in the previous example, here in
 Example 2 cells are transfected by a mixture of DNA and RNA.
 The RNA component also contains samples with Loop-RNA
 versions. The DNA/RNA mixture consists of the following
 components:
- 15 1. Luciferase-based DNA reporter construct
- a. pGL3-control, or
 - b. pGL3-tLet-7F, or
 - c. pGL3-tLet-7R
2. Internal control for normalization
- 20 a. pRL-TK
3. Annealed RNA
- a. Duplexed siRNA-GL2.1, siRNA (small RNA duplex with
 overhangs) targeted against GL2, or
 - b. Duplexed siRNA-GL3.1, siRNA (small RNA duplex with
 overhangs) targeted against GL3, or
 - 25 c. Annealed Loop RNA-GL3.2, siRNA with a connecting
 loop targeted against GL3 or
 - d. Duplexed siRNA Let 7.1, siRNA (small RNA duplex with
 overhangs) targeted against Let-7 sequences, or
 - 30 e. Annealed Loop RNA-Let-7.2, siRNA with a connecting
 loop targeted against Let-7 sequences

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

The luciferase-based reporter constructs and the RNAs are schematically represented in Figure 8. Figure 9 shows down-regulation of the reporters containing the target sequences that corresponds to the sequences of the co-transfected RNAs.

- 5 Again, as shown in Example 1, the siRNA GL3.1 causes a specific reduction of the expression levels of all reporters since they all carry the target sequence. The siRNA Let-7.1 shows only repression of the reporters pGL3-tLet7F and pGL3-tLet7R, but not of the pGL3-control. The control siRNA GL2.1
- 10 shows no significant repression of any reporter construct. The chimeric RNA versions with the connecting loop between the duplexed regions, Loop RNA GL3.2 and Loop RNA Let7.2, show the same sequence specific reduction of the reporters as the corresponding siRNAs consisting of the independent RNA
- 15 strands, siRNAs GL3.1 and Let-7.1, respectively. In conclusion, the RNAs with both strands connected with a loop work as well as the siRNA consisting of two independent strands.

B. Generation of DNA Fragments Encoding Chimeric RNA

20 Molecules

The template for RNA Polymerase is double stranded DNA. The DNA template is generated by PCR using overlapping oligos that are complementary at their 3' ends. The oligos are shown below.

25 Oligonucleotides:

T7-pre-hLet7L.3-F (SEQ ID NO: 19):

5'-CCGAAGCTTA ATACGACTCA CTATAGCCCT TTGGGGTGAG GTAGTAGGTT
GTATAGTTTG GGGCTCTGCC CTGCTATG-3'

Pre-hLet7L.3-R (SEQ ID NO: 20):

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

5'-CGCATGAATT CGCCGGCACT TCAGGTGAG GTAGTAGGTI STATAGTTAT
CCCATAGCAG GGCAGAG-3'

T7-pre-GL3.3-F (SEQ ID NO: 21):

5'-CCGAAGCTTA ATACGACTCA CTATAGGCCT TTGGGGTCGA AGTACTCAGC
5 GTAAGGTTTG GGGCTCTGCC CTGCTATG-3'

Pre-GL3.3-R (SEQ ID NO: 22):

5'-CGCATGAATT CGCCGGCACT TCAGGTGGA AGTACTCAGC GTAAGGTTAT
CCCATAGCAG GGCAGAG-3'

- 10 The oligonucleotide pairs (T7-pre-hLet7L.3-F with Pre-
hLet7L.3-R; T7-pre-GL3.3-F with Pre-GL3.3-R) are mixed in a
1:1 molar ratio to 40 μ M in 50 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM
MgCl₂, 100 mM NaCl buffer. The mixture is incubated for 5 min
at 95 °C, three min at 65 °C and the 3' ends are allowed to
anneal by slowly (30 min.) decreasing the temperature to 20°C.
15 In the diagram below, forward (F) oligos are shown in
uppercase and reverse (R) oligos are shown in lowercase.

Annealed Pre-hLet7L.3 Oligos:

5'--..GTATAGTTTG GGGCTCTGCC CTGCTATG-3' (SEQ ID NO: 76)

||||||| |||||||

- 20 (SEQ ID NO: 77) 3'-gagacgg gacgataccc tattgatatg...-5'

Annealed Pre-GL3.3 Oligos:

5'--..GTAAGGTTTG GGGCTCTGCC CTGCTATG-3' (SEQ ID NO: 78)

||||||| |||||||

SEQ ID NO: 79) 3'-gagacgg gacgataccc tattggaatg...-5'

- 25 Of the annealed oligos, 2 μ l are incubated in the extension
mixture (40 μ l final volume) consisting of 10 mM Tris-HCl pH
7.5, 5 mM MgCl₂, 7.5 mM dithiothreitol, 33 μ M of each dNTP, 20

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

U DNA Polymerase I, Large (Klenow) fragment for 15 minutes at room temperature.

Extension of Annealed Pre-hLet7L.3 Oligos:

5'-..GTATAGTTTG GGGCTCTGCC CTGCTATGGG ATAA-->
 5 ||||||| |||||||
 <--ac cccgagacgg gacgataccc tattgatatg..-5'

Extension of Annealed Pre-GL3.3 Oligos:

5'-..GTAAGGTTTG GGGCTCTGCC CTGCTATGGG ATAA-->
 10 ||||||| |||||||
 <--ac cccgagacgg gacgataccc tattggaatg..-5'

The DNA fragments generated by the extension of the oligos are shown in their entirety below. The sequences are given as double stranded DNA; upper strand (uppercase) 5' to 3'; lower strand (lowercase) 3' to 5'. T7 promoter (nts 9-26); cloning sites: Hind III site (nts 4-9); EcoR I site (nts 119-124); restriction site for linearization Cac8I or Nae I (nts 113-118).

Pre-hLet7L.3:

1 5'-CCGAAGCTTA ATACGACTCA CTATAGGCCT TTGGGGTGAG GTAGTAGGTT GTATAGTTTG
 20 3'-ggcttcgaat tatgctgagt gatatacggg aaccccactc catcatccaa catatcaaac

61 GGGCTCTGCC CTGCTATGGG ATAACTATAC AACCTACTAC CTCACCTGAA GTGCCGGCGA
 cccgagacgg gacgataccc tattgatatg ttggatgatg gaggaggactt caggcccgct

121 ATTCTATGCG-3' (SEQ ID NO: 23)

taagtacgc-5' (SEQ ID NO: 24)

25 Pre-GL3.3:

1 5'-CCGAAGCTTA ATACGACTCA CTATAGGCCT TTGGGGTCGA AGTACTCAGC GTAAGGTTTG
 3'-ggcttcgaat tatgctgagt gatatacggg aaccccagct tcatgagtcg cattccaaac

61 GGGCTCTGCC CTGCTATGGG ATAACTTAC GCTGAGTACT TCGACCTGAA GTGCCGGCGA
 cccgagacgg gacgataccc tattggaatg gactcatga agctggactt caggcccgct

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

121 ATTCATGCG-3' (SEQ ID NO: 25)

taagtaacgc-5' (SEQ ID NO: 26)

C. Cloning of DNA Fragments into pUC19

The PCR products are digested with Hind III and EcoR I and
 5 cloned into pUC19 digested with the same enzymes using
 published methods (Sambrook et al.)

D. In vitro Transcription using T7 RNA Polymerase

The templates are linearized with Cac8I or Nae I and used for
 in vitro transcription with T7 RNA Polymerase (Promega)
 10 according to the manufacturer's instructions. Afterwards the
 template DNA is removed with DNase (Promega) according to the
 manufacturer's instructions.

The in vitro synthesized RNA is self-annealed using the same
 annealing protocol as for the siRNA oligo-mixtures in Example
 15 1. Transfections are performed as described in Example 1,
 except that the self-annealed RNA replaces the siRNA used in
 Example 1.

The linear sequences of the chimeric RNAs generated using this
 method are shown below along with a stem-loop representation
 20 of each chimeric RNA. The uppercase sequences are the regions
 that are able to basepair within the RNA, one of the sequences
 is able to anneal to the target sequence; in these cases, the
 first uppercase region.

In the next section the names for the RNA molecules are
 25 composed as follows: 's' stands for siRNA, 'R' stands for RNA,
 and 'h' indicates human sequence. Whenever Pre is present in
 the name it indicates that the molecules contains 5'- and 3'-
 extensions.

sR-hLet7.2-as (Loop RNA Let7.2)

PCT/EP02/09670

5'-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAAguuuaggggcucugcccugcuaugggaaacUAUACAACC
UACUACCUCAuu-3' (SEQ ID NO: 27)

sR-GL3.2-as (Loop RNA GL3.2)

5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGguuuggggcucugccugcuaugggaaacCUUACGCUGA
GUACUUCGAuu-3' (SEQ ID NO: 28)

Pre-hLet7L.3

(SEO ID NO: 18):

5' -ggccuuuggggUGAGGUAGUAGGUUGUAUAguuuqgggcucgc
 |||||
 3' -ccgugaaguccuACUCCAUCAUCCAUAUAUcaauaggguaucgu

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

Pre-GL3.3

GL3 siRNAs connected by the let-7 loop and containing 5' and 3' extensions:

(SEQ ID NO: 29)

- 5 5'-ggccuuuggggUCGAAGUACUCAGCGUAAGguuuuggggcucugccugcuaugggauaa
 cCUUACGCGUGAGUACUUCGAuccugaagugcc-3'

5'-ggc cuuuggggUCGAAGUACUCAGCGUAAGguuuuggggcucugc

||||| c

- 10 3'-cogugaaguccuAGCUUCAUGAGUGCGAUUCcaauaggguaucguc

The uppercase sequences are the regions of complementarity within the RNA molecule, one of the sequences is able to base pair with the target sequence; in these cases, the first uppercase region.

- 15 The RNAs sR-hLet7.2-as and sR-GL3.2-as are chemically synthesized, and can also be generated using the above procedure.

E. Analysis of functional connecting loop sequences

The size of the wild type Let-7 connecting loop is 30 nts (5'-GUUUGGGGUCUGCCCGCUAUGGGAUAAC-3' (SEQ ID NO: 75).

- 25 Ideally one prefers to generate synthetic oligos and clone them into an expression vector (see below). However, the size of the oligo is preferably not too long to make efficient oligo synthesis possible. One cannot change dramatically the size of the guide sequences, however the loop sequence is 30 nt and can be shortened (see Figure 10 and Figure 11). Different loop sequences are selected, based on the wild type Let-7 loop sequence or other microRNA loop sequences (Lagos-Quintana, M et al. *Science* (2001) 294: 853, Lau, et al.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

Science (2001) 294: 858, Lee and Ambros Science (2001) 294: 862

The selected derivatives of the Let-7 loop are based on the predicted secondary folding of the Let-7 loop. Two stable
 5 structures of the Let-7 loop are predicted (see SEQ ID NOS: 35 to 41, and 45 below). The bulging 12 nucleotides and the predicted GGG/CCC stem in the loop are deleted in structure 2 resulting in loop L12, (SEQ ID NO: 30) (see also Figure 10 and Figure 11). Deleting the UGGG/CCUG part of the predicted stem
 10 and the bulged nucleotides in the loop in structure 1 results in loop L11 (SEQ ID NO: 31).

The selected loops of the micro RNAs are chosen since they are shorter and have the same organization of 5'-guide-loop-basepairing sequence-3' as the Let-7 RNA. Loops of microRNAs
 15 with the reverse organization, 5'- basepairing sequence-loop-guide-3', might also be functional. Constructs are synthesized in the context of a GL2 guide sequence using PCR as described above and their knock-down efficiencies on GL2 reporter are measured in a transient transfection experiment as described
 20 in Example 3 and compared to the wild type Let-7 loop (Figure 12). All loops show knock-down effects, which are specific for GL2 and do not effect GL3 reporter. Loop sequences as short as 12 nucleotides (e.g. L12) still specifically knock-down the GL2 reporter.

25 Example 3: Let-7 promoter for expression

This example describes a DNA expression construct producing siRNA, and the identification and cloning of the human let-7 promoter and human let-7 genomic sequence in a DNA vector. The let-7 promoter is used in the expression construct to produce
 30 siRNAs. However, as described below, other promoters can be used as well.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

Included in this Example are:

1. Results of a DNA database search using let-7 guide sequence as a probe;
2. Predicted secondary structures of RNAs transcribed from let-7 genomic clones;
3. Description of isolation of human let-7 promoter;
4. Description of isolation of human let-7 genomic clone; and
5. Methods for modifying let-7 genomic constructs.

10 A. Cloning of the Let-7 promoter

A DNA database search using let-7 guide sequence as a probe results in three perfect matches on the human genome, on chromosomes 9, 11, and 22, and five near perfect matches on chromosomes 9, 21, X, 19 and 5 (see also Pasquinelli et al.

15 (2000) *Nature* 408:86-89):

1) >ref|NT_011523.4|Hs22_11680 Homo sapiens chromosome 22

Query: 1 tgaggtagtaggttgtagt 21 (SEQ ID NO: 32)

|||||

Sbjct: 2667925 tgaggtagtaggttgtagt 2667905

20 2) >ref|NT_009215.3|Hs11_9372 Homo sapiens chromosome 11

Query: 1 tgaggtagtaggttgtagt 21 (SEQ ID NO: 32)

|||||

Sbjct: 1342370 tgaggtagtaggttgtagt 1342390

3) >ref|NT_025808.2|Hs9_25964 Homo sapiens chromosome 9

25 Query: 1 tgaggtagtaggttgtagt 21 (SEQ ID NO: 32)

|||||

Sbjct: 77615 tgaggtagtaggttgtagt 77595

4) >ref|NT_011512.3|Hs21_11669 Homo sapiens chromosome 21

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

Query: 1 tgaggtagtaggttgat 18 (SEQ ID NO: 33)
 |||||

Sbjct: 3576555 tgaggtagtaggttgat 3576572

5) >ref|NT_011799.5|HsX_11956 Homo sapiens chromosome X

5 Query: 1 tgaggtagtaggttgatagt 21 (SEQ ID NO: 32)
 |||||

Sbjct: 278879 tgaggtagtagattgtatagt 278899

6) >ref|NT_011091.5|Hs19_11248 Homo sapiens chromosome 19

Query: 1 tgaggtagtaggttgatagt 21 (SEQ ID NO: 32)
 |||||

10 Sbjct: 592412 tgaggtagtaggttgatagt 592432

7) >ref|NT_027021.1|Hs5_27181 Homo sapiens chromosome 5

Query: 1 tgaggtagtaggttgta 17 (SEQ ID NO: 34)
 |||||

15 Sbjct: 276711 tgaggtagtaggttgta 276695

All locations are potential candidates for the let-7 gene. From these locations RNA structures are predicted that fold into RNA duplex structures similar to let-7 RNA (schematically shown below). For comparison, in Figure 2 the potential structure is divided into the segments: 5' extension, let-7-antisense, loop, let7-sense, and 3' extension. The let-7-antisense sequence is underlined.

The following references provide computer programs to predict the secondary structure of the three predicted RNAs transcribed from the above human chromosomal DNA:

M. Zuker, D.H. Mathews & D.H. Turner, "Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

Practical Guide", In *RNA Biochemistry and Biotechnology* (1999) 11-43, J. Barciszewski & B.F.C. Clark, eds, NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, (*mfold* version 3.1)

- 5 D.H. Mathews, J. Sabina, M. Zuker & D.H. Turner, "Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure", *J. Mol. Biol.* (1999) 288:911-940.

- 10 The following prediction of secondary structure results from the use of the *mfold* version 3.1 program by Zuker and Turner (the let7-antisense sequence is underlined):

1) NT_011523.4|Hs22_11680 Homo sapiens chromosome 22

Structure 1

Folding bases 1 to 81

Initial dG = -36.1

- 15 SEQ ID NO: 35

```

      10      20      30
U|UG  U  GU      -----  U
U  GGG GAG AGUAGGUUGUAUAGUU      UGGGGC \
A  CCU UUC  UCAUCUAACAUUCAAA      GUCCCG C
20  A^GU  -   UG      UAGGGUAUC      U
      80      70      60      50      40

```

Structure 2

Folding bases 1 to 81

Initial dG = -34.4

- 25 SEQ ID NO: 35

```

      10      20      30      40
U  UG  U  GU      UGGGGCUCUG | UG
U  GGG GAG AGUAGGUUGUAUAGUU      CCC  C
A  CCU UUC  UCAUCUAACAUUCAAA      GGG  U
30  A  GU  -   UG      UA----- ^ UA
      80      70      60      50

```

-65-

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

In Hutvagner et al. (2001) *Science* 293:834-838, predictions and experimental data for longer precursors (4 extra base pairs at the termini) derived from this genomic location are reported.

5 2) NT_009215.3|Hs11_9372 Homo sapiens chromosome 11

Structure 1

Folding bases 1 to 80

Initial dG = -33.7

10 SEQ ID NO: 36

```

      10      20      30      40
U|  UU  G  U          UAGAAUAC  AA
CCCAGG  GAG  UAG  AGGUUGUAUAGUU      AUC  G
GGGUUC  UUC  AUC  UCCGACAUGUCA      UAG  G
15  -^    CU  G  C          -----  AG
      80      70      60      50

```

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

3) NT_025808.2|Hs9_25964 Homo sapiens chromosome 9

Structure 1

Folding bases 1 to 83

Initial dG = -36.6

5 SEQ ID NO: 37

```

          10      20      30
G-|   U   GU   .-UUA   UC
      UGGGA GAG AGUAGGUUGUAUAGUU   GGG \
      AUCCU UUC UCAUCUAACAUAUCAA   CCC A
10 CA^   -   UG   \ ---   AC
      80      70      60      40
                      A--- A
                      CC C
                      GG U
15                      UAGA G
                      50

```

Structure 2

Folding bases 1 to 83

20 Initial dG = -35.8

SEQ ID NO: 37

```

          10      20      30      40
G-   U   GU   UUAGG   ACA|   C
      UGGGA GAG AGUAGGUUGUAUAGUU   GUC   CCCA C
25 AUCCU UUC UCAUCUAACAUAUCAA   UAG   GGGU A
CA   -   UG   -----   A--^   C
      80      70      60      50

```

30 4) NT_025808.2|Hs9_25964 Homo sapiens chromosome 9, A (302576-302677)

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

Structure 1

Folding bases 1 to 102

Initial dG = -49.1

SEQ ID NO: 38

```

5          10          20          30          40
U|      A      AGU      -----      UG
UGCUCU UCAG  GAGGUAGUAGAUUGUAUAGUUGU      GGGGUAG \
AUGAGG AGUC  UUCCGUUAUCUAACAUUCAUA      UCCCAUU A
G^      -      CC-      GAGGACUUG      UU
10 100      90      80      70      60      50

```

5) NT_011512.3|Hs21_11669 Homo sapiens chromosome 21:21 D

Structure 1

Folding bases 1 to 92

15 Initial dG = -42.1

SEQ ID NO: 39

```

          10          20          30          40
|      A      UU      G      U      UA      G      UA      AC
GUGUGC UCCGGG  GAG  UAG  AGGUUGUAUGGUU  GA  U  C  \
20 CACACG AGGUUC  UUC  AUC  UCCAACAUGUCA  UU  A  G  C
^      -      CU      G      U      --      G  GG  UC
          90          80          70          60          50

```

Structure 2

25 Folding bases 1 to 92

Initial dG = -40.8

SEQ ID NO: 39

```

          10          20          30          40
A      UU      G      U      -----|  A  UU
30 GUGUGC UCCGGG  GAG  UAG  AGGUUGUAUGGUU  UAG  G  \
CACACG AGGUUC  UUC  AUC  UCCAACAUGUCA  GUC  C  A
      -      CU      G      U      UUGAGG^  C  AC
          90          80          70          60          50

```

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

6) NT_011799.5|HsX_11956 Homo sapiens chromosome X working
draft sequence segment: X B

Structure 1

5 Folding bases 1 to 96
Initial dG = -48.0
SEQ ID NO: 40

```

      10      20      30      40
|  -      U  GU      .-UUA  UC
10 GUGCU CUGUGGGA GAG AGUAGAUUGUAUAGUU GGG \
   CAUGG GGCACCCU UUC UCAUCUGACAUAAUCAA CCC A
   ^  U      -  UG      \ ---  AU
      90      80      70

                        50
15                        C  UU
                        AUC \
                        UAG  G
                        -  AG
                        60

```

20

Structure 2

Folding bases 1 to 96
Initial dG = -47.5
SEQ ID NO: 40

```

25      10      20      30      40
   -      U  GU      ---- |  UCAU
   GUGCU CUGUGGGA GAG AGUAGAUUGUAUAGU  UUUAGGG  A
   CAUGG GGCACCCU UUC UCAUCUGACAUAAUCAA AGGUUCU  C
      U      -  UG      AUAG ^  ACCC
30      90      80      70      60      50

```

7) NT_011091.5|Hs19_11248 Homo sapiens chromosome 19; 19 C
Structure 1

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

Folding bases 1 to 122

Initial dG = -65.8

SEQ ID NO: 41

```

      10      20      30      40      50
5 |   C   .-CC  CU  G           U  GGA---- A
   CCUGCCG GCCCC   GGG  GAG  UAGGAGGUGUUAUAGU GA   GG C
   GGGCGGC CGGGG   CCC  UUC AUCCUCCGGCAUAUCA CU   CC A
   ^   C   \  --  CU  G           -  AGAGGAA  C
120      110      80      70      60

10      90      100
      AGGCUGCG  UG
              CCC \
              GGG  C
      CA-----  CA

```

15

SEQ ID NO: 41

Structure 2

Folding bases 1 to 122

Initial dG = -62.8

```

20      10      20      30      40      50
      .-CGCCCCC  CU  G           U  GGA---- A
   CCUGCCG      GGG  GAG  UAGGAGGUGUUAUAGU GA   GG C
   GGGCGGC      CCC  UUC AUCCUCCGGCAUAUCA CU   CC A
      \  -----  CU  G           -  AGAGGAA  C
25 120      80      70      60

      90      100
      A|  G  -  UG
      GGCU CG CCC \
      CCGG GC GGG  C
30      -^  G  A  CA
      110

```


WO 03/020931

PCT/EP02/09670

- By limiting the length of the sequences discovered in chromosome 19 to about 80 nucleotides, a predicted stem-loop structure similar to those shown for the sequences found on the other chromosomes is produced by starting from the 5' direction with the first of the base-pairing nucleotides.
- The endogenous promoter for let-7 is cloned using PCR on human genomic DNA. Primers are designed for all three genomic locations flanking the let-7 sequences (e.g., 5'-TGAGGTTAGTAGGTTGTATAGT-3' SEQ ID NO: 32). Two different reverse primers, which anneal 3' of the 3' let-7 extension sequence, are utilized. In addition, three different forward primers, which anneal 5' of the 5' let-7 extension, are used. In order to ensure that a fully functional, but yet minimal let-7 promoter is identified, the three forward primers anneal at different distances upstream from the let-7 transcription initiation site. The following examples use the sequences derived from chromosome 22. Similarly, the sequences from the other chromosomes can be used. The primers for chromosome 22 are listed below.
- Oligonucleotides (5' to 3') for location NT_011523.4|Hs22_11680 Homo sapiens chromosome 22:
- Let7gene22 F1 5'-GCACGTTCTAGAGAATCCCTGTGCCCTTGGTG (SEQ ID NO: 42)
- Let7gene22 F2 5'-GCACGTTCTAGACCGTGAAGCCGCTACTCAGC (SEQ ID NO: 43)
- Let7gene22 F3 5'-GCACGTTCTAGAGGGTTGACAGTCGTATCTGC (SEQ ID NO: 44)
- Let7gene22 R1 5'-CCGTGCAAGCTTTGTGTCAGACTTCTCAGTGTAG (SEQ ID NO: 45)
- Let7gene22 R2 5'-CCGTGCAAGCTTCCTGCCACTGAGCTGGCCAG (SEQ ID NO: 46)

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

The sequences matching genomic regions are underlined. The other 5' sequences are added to facilitate cloning (Xba I site in primers Let7gene22 F1-3, Hind III in primers Let7gene22 R1-2).

- 5 Different primer combinations are utilized to obtain genomic fragments:

Name fragment Forward primer Reverse primer

	Let7gene22A	Let7gene22 F3	Let7gene22 R1
	Let7gene22B	Let7gene22 F2	Let7gene22 R1
10	Let7gene22C	Let7gene22 F1	Let7gene22 R1
	Let7gene22D	Let7gene22 F3	Let7gene22 R2
	Let7gene22E	Let7gene22 F2	Let7gene22 R2
	Let7gene22F	Let7gene22 F1	Let7gene22 R2

- 15 The PCR fragments are digested with the enzymes Xba I and Hind III and cloned into the Avr II site and the Hind III site of pIPspAdapt6-deltaPolyA, thereby replacing the CMV promoter sequence (see Figure 3). pIPspAdapt6-deltaPolyA was constructed from pIPspAdapt6 as follows. pIPspAdapt6 was grown in the methylase negative E. coli strain DM1 to prevent
- 20 methylation of the second Xba-site. The DNA was isolated and digested with Xba I, thereby excising a 142 bp fragment containing the poly A signal. The religated vector is called pIPspAdapt6-deltaPolyA.

- 25 These constructs with the genomic fragments Let7gene22A-F are transfected into mammalian cells (as described in Example 1) and tested for expression of let-7 RNA and its effect on repressing pGL3-tlet7. This is done by different means:

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

Repression of luciferase activity from pGL3-tLet7-F, or pGL3-tLet7-R reporter.

The fragments Let7gene22A, Let7gene22B, and Let7gene22C represent different lengths of the genomic sequences of the Let7 gene on chromosome 22. These fragments are cloned into pIPspAdapt6-deltaPolyA plasmids. Reporter constructs are used to test the Let-7 expression plasmids Let7gene22A, Let7gene22B, Let7gene22C in an experiment similar to Example 1, but with the following deviation:

The Let-7-based expression plasmids replace the RNAs, as schematically illustrated in Figure 13A-B.

The DNA mixture consisting of the following three components is transfected into host cells (for example HeLa or PER.C6/E2A cells):

4. Luciferase-based reporter construct
 - a. pGL3-control (Promega), or
 - b. pGL3-tLet-7F, or
 - c. pGL3-tLet-7R
5. Internal control for normalization
 - a. pRL-TK (Promega; Acc. Number AF025846)
6. Let-7 based expression constructs
 - a. pIPspAdapt-Let-7gene A (containing fragment Let7gene22A), or
 - b. pIPspAdapt-Let-7gene B (containing fragment Let7gene22B), or
 - c. pIPspAdapt-Let-7gene C (containing fragment Let7gene22C)

Day 1:

HeLa or PER.C6/E2A cells are seeded 20 hrs prior to transfection in 96-well format at 4.5×10^4 cells/100 μ l

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

medium (DMEM +10% heat inactivated Fetal Bovine Serum for HeLa cells; DMEM +10% non-heat inactivated Fetal Bovine Serum for PER.C6/E2A cells)/well.

Day 2:

- 5 The treatment per well is: DNA mixtures are prepared in 25 μ l (total volume) OptiMEM containing:
1. 200 ng pGL3-control, or
 - 200 ng pGL3-tLet-7F, or
 - 200 ng pGL3-tLet-7R
 - 10 2. 20 ng PRL-TK
 3. 100 ng Let-7 based expression construct, pIPspAdapt-Let-7geneA, or pIPspAdapt-Let-7geneB, or pIPspAdapt-Let-7geneC.

- 15 LipofectAMINE2000 (0.8 μ l) and OptiMEM (24.2 μ l) are incubated for 7-10 minutes at room temperature and added to each DNA mixture. This mixture (final volume 50 μ l) is incubated for 15-25 minutes at room temperature and subsequently added to the cells from which the medium has been removed. The cells are incubated for 48 hrs in a 37°C (HeLa) or 39°C (Per.C6/E2A)
- 20 incubator under 10% CO₂.

Day 4:

- The cells are harvested, lysed, and firefly luciferase and renilla luciferase activities measured using the Dual Luciferase kit (Promega) according to the manufacturer's
- 25 instructions. The absolute firefly luciferase value of each sample is divided by its internal absolute renilla luciferase value to obtain the relative luc/ren-value. These relative luc/ren-values are compared to the control sample where no or non-related plasmid is used.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

The results of the transient transfection on PER.C6/E2A cells are shown in Figure 14.

- Cotransfection of reporter constructs and Let-7 expression constructs (pIPspAdapt-Let-7gene A-C) show the activity of the
- 5 Let-7 expression constructs on the reporter construct containing the let-7 target sequence in the F-orientation; pGL3-tLet-7-F. The pGL3-tLet-7-R does not show a knock-down, probably due to asymmetric processing of the Let-7 RNA. The pGL3 reporter, lacking Let-7 target sequence, is not affected.
- 10 The smallest region (338 bps), Let-7 gene-C, is sufficient to have knock down activity as shown in this experiment.

Reduction of the luciferase levels.

- The procedure is the same as described in Example 1, with the major difference being that the siRNA-Let7.1 is replaced by
- 15 the plasmid constructs containing Let7gene22A-F. The mRNA levels of GL3 luciferase are measured for sequence specific degradation using Taqman PCR (PE Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. RNA is isolated using TRIzol Reagent (Life Technologies), according to the
- 20 manufacturer's protocol, followed by DNase treatment using 0.1 U/ μ l RQ1 RNase (DNase free; Promega) for 20 min at 37 °C. A single tube reaction is performed for the cDNA synthesis and the subsequent Taqman PCR reaction containing 100 ng total RNA in a total volume of 25 μ l consisting of 1x TaqMan buffer A
- 25 (PE Applied Biosystems), 5 mM MgCl₂, 300 μ M total dNTPs, 300 nM luc-1-For, 300 nM luc-1-Rev, 150 nM luc-1-probe, 0.025 U/ μ l AmpliTaq Gold, 0.1 U/ μ l RNase Inhibitor, and 0.25 U/ μ l MultiScribe Reverse Transcriptase. The Taqman analysis is performed on an ABI Prism 7700 Sequence Detector apparatus.
- 30 The primers and probe combination used in this analysis are as follows:

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

Primers:

luc-1-For 5' AAGCGACCAACGCCTTGAT 3' (SEQ ID NO: 47)

luc-1-Rev 5' TTCGTCTTCGTCCCAGTAAGC 3' (SEQ ID NO: 48)

TaqMan probe (5' FAM Reporter Dye; 3' TAMRA):

- 5 luc-1-probe 5' ATGTCTCCAGAATGTAGCCATCCATCCTTG 3' (SEQ ID NO: 49)

The reaction is performed using the following program:

30 min at 48°C, 10 min at 95°C followed by 40 cycles of [15 sec 95°C, 1 min 60°C].

- 10 1) Expression of let-7 RNA.

The plasmid constructs containing Let7gene22A-F are transfected into mammalian cells and harvested for RNA isolation. The RNA is analyzed by Northern blotting for let-7 RNA expression as described in Pasquinelli et al. (2000)

- 15 Nature 408:86-89.

B. Reprogramming Let-7 RNA to another target sequence.

The term "reprogramming" refers to the replacement of let-7 guide sequences with guide sequences based upon some other RNA sequence. The GL3 sequence is used in this example. The reprogrammed constructs are made by removing the let-7 guide sequence and its complement and replacing them with GL3 guide sequence and its complement. Such a reprogrammed chimeric RNA would target RNA containing the GL3 target sequence as opposed to RNAs containing the let-7 target sequence. These

- 20 constructs are based on the plasmids having the Let7gene22A-F fragments.

The new guide sequence and a sequence able to basepair with the guide sequence are introduced into the constructs using PCR. For example, for the let-7 genomic location on chromosome

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

22, a GL3 sequence is introduced; two primers consisting of a forward (Let-7.N19-F4) and reverse primer (Let-7.N19-R4) are designed anti-parallel and pointing away from each other, each containing let-7 sequences at their 3' end, the new target
 5 sequence internally (N19), and let-7 loop sequences at their 5' end. The 5' sequences of the primers are complementary for 14 bases.

Let-7.N19-F4:

5'-TCTGCCCTGC TATGGGATAA C nnnnnnnnnnnnnnnnnnn TCCTGAAGTG
 10 GCTGTA-3' (SEQ ID NO: 50)

Let-7.N19-R4:

5'-CATAGCAGGG CAGAGCCCCA AAC nnnnnnnnnnnnnnnnnnn CCCCAAAGGG
 CAGT-3' (SEQ ID NO: 51)

N19 is the target sequence of interest; for GL3 the N19 is:

15 5'-CTTACGCTGAGTACTTCGA-3'. (SEQ ID NO: 9)

The process for replacing guide sequences of let-7 genomic clones is shown in Figure 4. These primers are used in separate PCR reactions on the plasmid constructs containing Let7gene22A-F DNA. Primer Let-7.N19-R4 is used in combination
 20 with a forward primer, for instance, Let7gene22 F1-3. Primer Let-7.N19-F4 is used in combination with a reverse primer, for instance, Let7gene22 R1-2. The mixture of the two PCR products thus obtained is used as template in a subsequent PCR reaction using the outside primers Let7gene22 F1-3 and Let7gene22 R1-2.
 25 The PCR products obtained from this step are cloned into pIPspAdapt6-deltaPolyA using the same strategy as described for the Let7gene22A-F fragments.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

The expression of this chimeric let-7 RNA with new guide sequence is analysed by the three methods described above for the let-7 RNA itself:

1. Repression of luciferase activity from pGL3-control, or
5 pGL3-tLet7-F, or pGL3-tLet7-R reporter constructs.
2. Reduction of luciferase mRNA levels.
3. Expression of chimeric let-7 RNA with new target sequence.

- 10 In this example, new guide sequences and sequences that can base pair with the guide sequences are introduced into the construct pIPspAdapt-Let-7gene C using PCR with a similar strategy as described in Example 3A.

The new N19 guide sequences are:

- Let-7-100%, 5'-TATACACCTACTACCTCA-3'; (SEQ ID NO: 52)
15 GL3, 5'-CTTACGCTGAGTACTTCGA-3'; (SEQ ID NO: 9)
GL2, 5'-CGTACGCGGAATACTTCGA-3'; (SEQ ID NO: 6) and
EGFP, 5'-GCTGACCCTGAAGTTCATC-3'; (SEQ ID NO: 53)

- The clones generated have the names: plasmid_name-promoter_name-guide sequence, e.g., pIPspAdapt-Let-7-gLet7-
20 100%, pIPspAdapt-Let-7-gGL3, pIPspAdapt-Let-7-gGL2, and pIPspAdapt-Let-7-gEGFP, respectively. The 'g' before the guide sequence is introduced to differentiate promoter sequences (e.g. let-7) from guide sequences (e.g. gLet-7)

- The Let-7 target and guide sequences are made 100%
25 complementary in the clone pIPspAdapt-Let-7-gLet7-100% to enable complete base pairing in this region within the RNA. The natural let-7 RNA is not 100% complementary in this region; it contains 2 non-canonical base pairs (G-U base pairs) and a bulged-out U.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

The activity of the clones is tested as described above in the luciferase reporter assay, using luciferase-based reporter constructs (pGL3-control, or pGL3-tLet-7F, or pGL3-tLet-7R, or pGL2). A schematic representation of the components used in this experiment is given in Figure 15. The results are shown in Figure 16. Reduction of the luciferase reporter levels are only observed in the reporters that contain the cognate target sequences, i.e.: plasmid pIPspAdapt-Let-7-gLet-7-100% shows reduction of pGL3-tLet-7-F, plasmid pIPspAdapt-Let-7-gGL3 shows reduction of all three reporters containing the GL3 target sequence (pGL3-control, pGL3-tLet-7F, pGL3-tLet-7R), plasmid pIPspAdapt-Let-7-gGL2 shows reduction of only the pGL2 reporter. No non-specific effects are observed, also confirmed by the plasmid pIPspAdapt-Let-7-gEGFP, which did not repress expression of any of the reporters.

C. RNA expression of the expression constructs by Northern analysis

In order to show that RNA is transcribed from the DNA expression constructs, expression analysis is performed using Northern blotting.

Cells are transfected with the chimeric expression DNA constructs and analyzed by Northern blotting, exemplified as follows:

Day 1:

HeLa, U2OS, PER.C6/E2A cells are seeded 24 hrs prior to transfection in 6-well format at 30×10^4 cells in 2 ml medium per well. For infection experiments 15×10^4 cells in 2 ml medium per well is used. (DMEM +10% heat inactivated Fetal Bovine Serum for HeLa cells and U2OS cells; DMEM +10% non-heat inactivated Fetal Bovine Serum +10 mM MgCl₂ for PER.C6/E2A cells)/well.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

Day 2:

Per well DNA mixtures are prepared in 250 μ l (total volume) OptiMEM containing:

- 3 μ g per well in a 6-well plate of the Let-7 based expression
5 construct

- LipofectAMINE2000 (4 μ l) and OptiMEM (246 μ l) are incubated for 7-10 minutes at room temperature and added to each DNA mixture. This mixture (final volume 500 μ l/well) is incubated for 15-25 minutes at room temperature and subsequently added
10 to the cells. The cells are incubated for 24, 48, or 72 hrs in a 37°C incubator under 10% CO₂.

Day 3 and/or 4 and/or 5:

- The cells are harvested using TriZol (Invitrogen) according to the manufacturer's descriptions. Briefly, cells are washed
15 with 1-2 ml PBS, and lysed in 1 ml TriZol. Samples of 6 wells are pooled and glycogen is added to 50 μ g/ml. Chloroform is added (0.2 ml per ml TriZol used). The samples are vortexed, incubated for 5 min., spun at 9300 g for 15 min. The aqueous phase is transferred to a fresh tube. Isopropanol (0.5 ml per
20 ml TriZol) is added and spun at 7500 g for 5 min. Pellet is washed with 80% ethanol, and dissolved in RNase-free water. The concentration of the RNA samples is determined by UV absorption (A260) or by RiboGreen (Molecular Probes) measurement using the manufacturer's descriptions.

- 25 Of each sample 0.5-15 μ g RNA is prepared for gel analysis. The RNAs are mixed with the denaturing loading dye (TBE Urea sample buffer; Biorad) and denatured by heating for 3 minutes at 90°C just before loading onto the 15% polyacrylamide 1xTBE-gel (Biorad). The gel is run for 50 min at 200 V. The gel is
30 blotted onto Hybond N+ filter (Amersham) using the Transblot

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

semi-dry Electrobloetter (Biorad) for 30 min. at 0.2 A/blot with a maximum of 25 V. The blotted filter is hybridized with a probe using the Rapid Hyb solution (Amersham) according to the manufacturer's descriptions. The probes are made by 5' end labeling using standard procedures with [³²P]-ATP of the oligonucleotides complementary to the guide sequences.

In Figure 17 the expression of the RNA species derived from the construct pIPspAdapt-Let-7-gGL3 is shown. Northern blots of RNA preparations of PER.C6.E2A cells transfected with Let-7-based expression constructs are hybridized with a ³²P-end labelled probe recognizing the GL3 guiding sequences (GL3 probe sequence: 5'-CTTACGCTGAGTACTTCA-3' SEQ ID NO: 9). The processed RNA species co-migrates with the synthetic GL3 siRNA duplex (21 nts) that has been loaded as a size marker. No signal is detectable in control samples with unrelated sequences.

Similar expression studies have been performed for a number of other Let-7 based constructs with different guiding sequences and their base pairing sequences. The target sequences of these constructs are designed against various targets and are identical to the sequences of the oligonucleotide used in the hybridizations. The target sequences are listed:

PPAR gamma (acc. Number NM_005037; nts 173-191;

5'-CAGATCCAGTGGTGCAGA-3', SEQ ID NO: 54)

25 IGF2R (acc. Number NM_000876; nts 510-528;

5'-GGAGGTGCCATGCTATGTG-3' SEQ ID NO: 55)

Figure 18 shows that expression plasmids containing sequences other than let-7 or GL3 also express chimeric RNA molecules with the correct length and expected sequence.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

Example 4: RNA polymerase III promoter-based expression

In the examples discussed so far, the expression of the chimeric RNAs are dependent upon the activity of the let-7 promoter. In this example, the let-7 promoter is replaced with a heterologous promoter to be used for chimeric RNA expression. The preferred promoter is ubiquitously active. This example describes the cloning of the constructs from Example 3 into a vector containing a ubiquitously active promoter, in particular, a promoter recognized by RNA polymerase III (pol III promoter).

In eukaryotes, pol III promoters endogenously produce various small, structured RNAs, e.g.: 5S rRNA, tRNAs, VA RNAs, Alu RNAs, H1, and U6 small nuclear RNA. Other suitable promoters that also can be used include CMV, RSV, MMLV, tet-inducible, and IPTG-inducible promoters. Pol III promoters are frequently chosen for expression of therapeutic antisense RNAs or ribozyme RNAs (Medina and Joshi (1999)). The pol III promoters from Medina and Joshi are used to determine the appropriate promoter for transcription of siRNAs, stRNAs and chimeric RNAs.

This approach is used for expression of siRNA, stRNAs and chimeric RNAs using expression constructs based on pol III promoters. An example of this approach is a fusion of a siRNA to the 3' end of a tRNA transcribed from a pol III promoter. The siRNA consists of either an stRNA sequence or a chimeric RNA, which consists of a guide sequence connected via a loop structure to the complementary guide sequence. The relative order of guide sequence and complementary guide sequence can be reversed. Also, the loop structure may be derived from the let-7 loop derived from *C. elegans*, *drosophila*, or human origin, such as found on chromosomes 9, 11 and 22.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

The chimeric RNA molecule is processed by the endogenous cellular processing machinery; for example, an siRNA moiety fused to the 3' end of a tRNA would be processed by endogenous molecules including tRNA 3' processing endoribonuclease, thereby releasing the siRNA moiety. The site for cleavage can also artificially be introduced, e.g. a ribozyme target sequence in combination with introduction of the cognate ribozyme.

The activity of the promoter is artificially adapted to obtain an inducible pol III expression system. For example, as described in Meissner et al. (2001) *Nuc Acids Res* 29:1672-1682.

The Let-7 promoter is replaced by a RNA polymerase III promoter. As an example, the Let-7 promoter is replaced by elements of the human U6 snRNA promoter. (Figure 19). For efficient promoter activity the first nucleotide of the transcript is a G and the transcription termination signal is a string of 5 or more Ts. The expressed RNA contains a guide sequence of 19-21 nts (directed against a target) and a sequence able to basepair with the guide sequence connected by a loop sequence.

The genomic human U6 gene (Accession number M14486) is cloned by a PCR based strategy using human genomic DNA. The region to be cloned starts at nucleotide -265 upstream of the transcription start site until nucleotide +198 downstream of the transcription start site. The primers used are:

hU6 (-265)-F1-XbaI

5'-GcacgTTCTAGAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCT-3' (SEQ ID NO: 56)

hU6 (+198)-R1-HindIII

5'-ccgtgcAAGCTTTGGTAAACCGTGCACCGCGTA-3' (SEQ ID NO: 57)

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

The PCR product is cloned into the Xba I and Hind III sites of pIPspAdapt6-deltaPolyA in a strategy similar to that described for the cloning of the Let-7 gene (see Example 3).

Starting from this clone, the transcribed U6 snRNA sequence is replaced from nt +2 to nt +102 by an RNA sequence capable of down-regulating target sequences. These RNA sequences preferably contain a guiding sequence, connecting loop, and sequence able to basepair with the guiding sequence, using an assembly PCR strategy, similar to the strategy for replacing the guide/target sequences of the Let-7 genes (see Example 3 above). The first 5' G-nucleotide and the 3' termination signal UUUUU are kept intact.

As an example, the target sequence directed against the pGL3-Let-7 reporters is used. The guide sequence described for the Let-7 based promoter (TGAGGTAGTAGGTTGTATA, SEQ ID NO: 58) is shifted 1 nucleotide compared to the guide sequence for the U6-based promoter (GAGGTAGTAGGTTGTATAG; SEQ ID NO: 59) in order to obtain a G-nucleotide at position 1 in the U6 context. Transcription is much more effective if the starting nucleotide is a G. The guide sequence used is completely complementary to the target sequence.

Expression plasmid:

pIPspAdapt-U6(+1) -L12-glet7 is a pIPspAdapt plasmid with a U6(+1) promoter followed by a let7 guiding sequence and containing the L12 loop sequence (SEQ ID NO: 30).

Primers used for cloning:

GJA 141 (SEQ ID NO: 60)

5' -GTTTGCTATAACTATACAACCTACTACTTTTACATCAGGTTG-3'

GJA 142 (SEQ ID NO: 61)

5' -GTTATAGCAAACCTATACAACCTACTACCTCGGTGTTTCGTCCTTC-3'

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

Resulting RNA sequence (guide underlined):

5'-GAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUGCUAUAAACUAUACAACCUACUACUUUUU-3' (SEQ
ID NO: 62)

The predicted RNA folding:

5 Structure 1

Initial dG = -29.8

SEQ ID NO: 62

```

      10      20
--|                UG
10  GAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU C
    UUUCAUCAUCCAACAUAUCAA U
    UU^                UA
    .      40      30

```

- 15 pIPspAdapt-U6(+1) -L13-glet7 is a pIPspAdapt plasmid with a
U6(+1) promoter followed by a let7 guiding sequence and
containing the L13 loop sequence (SEQ ID NO: 66).

Primers used for cloning:

GJA143 (SEQ ID NO: 63)

- 20 5'-GTTGTGCTATCAACTATACAACCTACTACTTTTACATCAGGTTG-3'

GJA144 (SEQ ID NO: 64)

5'-GTTGATAGCACAACTATACAACCTACTACCTCGGTGTTTCGTCCTTC-3'

RNA sequence (guide underlined):

5'-GAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUGCUAUAAACUAUACAACCUACUACUUUUU-3'

- 25 (SEQ ID NO: 65)

The predicted RNA folding:

Structure 1

Initial dG = -32.6

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

```

SEQ ID NO: 65
      10      20
--|          UG
  GAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUG  C
5  UUUCAUCAUCCAACAUAUCAAC  U
  UU^          UA
      50      40      30

```

- In the two examples given above, the RNA sequence starts with
 10 5'-G(G/A)(G/A) to enable base pairing with the 3' terminus of
 the RNA (UUUUU-3'). The underlined Us do basepair with the
 extreme 5' end of the RNA. This results in a 2 nts overhang
 at the 3' end. Constructs that do not have G(G/A)(G/A) as
 starting sequence are also possible; they have 5 nts overhang
 15 at the 3' end (see below).

- Briefly, two PCR reactions are performed on the human U6 clone
 to generate a 'left fragment' and a 'right fragment'. As an
 example, the cloning of pIPspAdapt-U6(+1) -L12-glet7 is given.
 However in principle any guiding sequence can be constructed
 20 following the instructions below:

The primers used are:

For the 'Left fragment':

- hU6(-265)-F1-XbaI (SEQ ID NO: 56)
 25 5'-GcaagTCTCTAGAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCT-3'
 U6-R2: GJA 142 (SEQ ID NO: 61)
 5'-GTTATAGCAAACTATACAACTACTACCTCGGTGTTTCGTCCTTTC-3'
 For the 'Right fragment':
 U6-F2: GJA 141: (SEQ ID NO: 60)
 30 5'-GTTTGCTATAACTATACAACTACTACTTTTACATCAGGTTG-3'
 hU6(+198)-R1-HindIII (SEQ ID NO: 57)
 5'-ccgtgcAAGCTTTGGTAAACCGTGCACCGGCGTA-3

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

Two primers consisting of a forward (U6 -F2/GJA141, SEQ ID NO: 60) and reverse primer (U6 -R2/GJA142, SEQ ID NO: 61) are designed anti-parallel and pointing away from each other, each containing U6 sequences at their 3' end, the new target sequence internally (N19), and connecting loop sequences at their 5' end. The 5' sequences of the primers are complementary for 12 bases.

The obtained 'left fragment' and 'right fragment' are gel isolated and combined in a one to one ratio to be the template in the subsequent assembly PCR reaction with the outside primers.

Assembly PCR:

hU6(-265)-F1-XbaI (SEQ ID NO: 56)

5'-GcagcTTCTAGAAGGTCGGGCAGGAAGAGGCCCT-3'

hU6(+198)-R1-HindIII (SEQ ID NO: 57)

5'-ccgtgcAAGCCTTGGTAAACCGTGCACCGGCGTA-3'

The PCR products obtained from this step are cloned into pIPspAdapt6-deltaPolyA using the same strategy as described for the Let7gene22A-F fragments (Example 3).

The obtained plasmids are tested in the reporter system described in Examples 1 to 3. The experiment is performed similarly as described in Example 3 for the Let-7 based plasmids, but in this example these plasmids are replaced by the U6-promoter based plasmids (pIPspAdapt-U6(+1) - glet7-L12 and pIPspAdapt-U6(+1) - glet7-L13)

Northern blots of samples of cells transfected with the U6-based promoter expression plasmids show expression of the RNA species and processing into a species of a size comparable to that of synthetic siRNAs.

The results given in Figure 21 clearly show repression of the reporter plasmids with the target Let-7 sequences (pGL3-tLet-

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

7F and to some extent pGL3-tLet-7R). In this experiment the U6 promoter-based expression plasmids show stronger knockdown effects than the let-7 promoter-based expression plasmids. Both loop sequences tested show similar activity.

5 Example 5: Co-infection with virus

The experiments described above are all transient transfection experiments, i.e. plasmid DNA is transfected into PER.C6/E2A cells. In order to test the activity of the knockdown in the presence of adenovirus in the cell, the following experiment is performed. PER.C6 cells, which do not complement E2A deleted adenovectors, are transfected with either siRNA or expression plasmids as described previously in Examples 2 and 3, but with one deviation: 20-24hrs prior to transfection the cells are infected with adenovirus. The viruses, which cannot replicate in these cells, express EGFP so it can be determined that the transduction efficiency is over 90% using an MOI of 3. Different viral backbones are tested. (See EP 1191105)

Infection of adenovirus per se has no effect on the knock-down activity obtained by the transiently transfected plasmids under the conditions used in this example. As Figure 22 shows, there is no difference in knockdown effects between cells infected with virus and cells not infected with virus.

Example 6: Viral knock-down

The reporter genes with the promoters of the plasmids pGL3-control, pGL3-tLet-7F, pGL3-tLet-7R, and pRL-TK have been recloned into the pIPspAdapt6-deltapolyA-construct in order to be able to generate adenoviral variants of the reporters. Standard recloning procedures are performed using the following restriction-sites: HindIII and BamHI for the fragments of pGL3-control, pGL3-tLet-7F, and pGL3-tLet-7R;

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

BglII(blunt) and BamHI for the fragment of pRL-TK cloned in AvrII(blunt)/BamHI of the vector pIPspAdapt6.

The pIPspAdapt versions of the constructs are tested for functionality in a transient transfection experiment and
5 appear to be active as a plasmid.

All the described pIPspAdapt-based reporter constructs are transiently transfected together with helper DNA into PER.C6/E2A. Adenoviruses are formed using the described procedure (US 6,340,595). Virus constructs are designated with
10 'Ad', e.g. AdGL3-tLet-7F is an adenovirus with the GL3 reporter gene and the Let-7 target sequence in forward orientation.

A co-infection experiment is performed with a combination of adenoviruses containing:

- 15 1) One of the luciferase reporter constructs (AdGL3-control, AdGL3-tLet-7F, AdGL3-tLet-7R), and
- 2) Internal control (AdRL-TK), and
- 3) U6 promoter-based expression construct (e.g. Ad-U6(+1)-L12-gLet-7)

20 In this experiment the infected cells are HeLa or U2OS.

The HeLa cells or U2OS cells are pre-infected at MOI 1500 for the luciferase reporter constructs together with the internal control (AdRL-TK) at MOI 500. After 4 hours the U6 promoter-based expression constructs are added at MOI 3000 or 8000.

25 These viruses are crude lysates (US 6,340,595). The cells are harvested at 24, 48 and 72 hours post-infection. Northern blots are made to measure the expression level of the knock-down RNA molecules

Northern blots of samples of cells infected with the
30 adenoviral U6-based promoter expression constructs show

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

expression of the RNA species and processing into a species of a size comparable to that of endogenous Let-7 RNA. (Figure 20).

The luciferase activity is measured using the Dual Luciferase Kit as described above. The results are shown in Figure 24. Two U6-promoter based expression constructs with different loop sequences are tested. Both U6 promoter-based expression constructs show a clear sequence specific knock-down of the reporter virus AdGL3-tLet-7F that contains the Let7 target sequence. No significant repression is seen for AdGL3-virus lacking the let-7 target sequence. This clearly shows that U6-based viral expression constructs have knock-down activity.

Preferably, the expression construct contains a pol III promoter (more preferably an U6-based promoter), preferably followed by the 19-21 nucleotides guiding sequence (e.g. gGL3 or gLet7), preferably followed by a connecting loop sequence (e.g. L12 or L13), preferably followed by a 19-21 nucleotides sequence that is able to base pair with the guiding sequence at the RNA level, followed by a pol III transcription termination signal consisting preferably of 5 or more T residues.

In order to obtain transcriptional activity of the U6 promoter the first nucleotide of the transcript is preferably a G nucleotide. This G nucleotide can be the first nucleotide of the guide sequence. Preferably an internal sequence of more than 5 T- or A residues should be avoided since this will cause premature transcription termination by pol III. The loop sequence can be L12: 5'-GUUUGCUAUAAAC-3' (SEQ ID NO: 30); or L13: 5'-GUUGUGCUAUCAAC-3' (SEQ ID NO: 66); or another connecting sequence (see for example the data described in Example 2).

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

Preferably the sequence downstream of the connecting loop can base pair with the guiding sequence. The termination signal consisting of 5 U-residues at the 3' terminus in the transcript can be made partially complementary to the 5' terminus of the guiding sequence in such a manner that the transcript is predicted to fold into a duplexed structure having at the 3' terminus an overhang of 2-4 nucleotides. For example to create a 3' overhang of 2 nucleotides, the starting nucleotides of the guiding sequence have to be at position 1 (G), at position 2 (G or A), at position 3 (G or A) (see also above).

Alternatively, the sequence downstream of the connecting loop is made complementary to the guiding sequence. In this case the stretch of 3' terminal Us form the overhang.

- 15 The 19-21 nt guiding sequence is a sequence able to base pair to the target sequence in the target gene. In the RNA molecules described above, the order of the RNA sections is, going from 5' to 3': guide sequence, connecting loop, sequence able to base pair with the guide sequence. However this order
- 20 can be reversed to produce (5' to 3'): sequence able to base pair with the guide sequence, connecting loop, guide sequence. Constructs based on GL2.2 guides in reverse order as described above show efficient expression and processing to RNAs of approx. 21 nts on Northern blots.
- 25 For knock-down of endogenous RNAs, a sequence of about 17 to about 22 nucleotides is selected corresponding to the target RNA. Multiple sequences from a target mRNA can be selected in order to identify a target sequence that is specific for a particular mRNA. Sequence alignments with other mRNA
- 30 sequences that have high homology to the target mRNA are utilized to identify those regions of the target mRNA that are unique. Alternatively, if the goal is to knock-down the

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

expression of more than one mRNA, a sequence alignment can be used to identify those regions of high homology to other genes. A target sequence selected from a region of high homology would knock-down all mRNAs comprising that sequence.

- 5 Here the GNAS gene (NM_000516) is taken as an example but is not limited to the invention as other RNAs can be knocked down using this method.

- An U6-promoter based construct is generated containing a GNAS target sequence (e.g. 5'-CGATGTGACTGCCATCATC-3' (SEQ ID NO: 10 80). The generation of the construct can be performed e.g. by using PCR-based methods as described in example 4 or using direct cloning of oligonucleotides as in example 11 or any technique known to someone skilled in the art. From the resulting vector adenoviruses, Ad-U6(+1)-gGNAS, are obtained 15 by methods as described previously (US 6,340,595, US 6,413,776). After introduction into vertebrate cells, RNA is transcribed from the vector with the following predicted sequence:

- 5'-GAUGAUGGCAGUCACAUCGGUUUGCUAUAACCGAUGUGACUGCCAUAUC(U)₂₋₅-3' 20 (SEQ ID NO: 81)

And the following predicted RNA folding:

- UG
5'-GAUGAUGGCAGUCACAUCGGUU C
CUACUACCGUCAGUGUAGCCAA U
25 3'-₂₋₅(U) UA

- In order to demonstrate reduction of expression levels of the target RNA, a similar experiment is performed as described above, however we do not use a reporter virus. Briefly, for 30 example HeLa cells or U2OS cells are infected with the Ad-U6(+1)-gGNAS virus or the control virus Ad-U6(+1)-gGL2.2 with

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

varying MOIs (MOI 300, 1000, 3000, 10000). After 72 hours post-infection, RNA was isolated from the infected cells. The expression levels of the GNAS mRNA are analyzed by real time PCR analysis as well as by Northern blotting (See figures 27 and 28).

For the real time PCR analysis, detection can performed e.g. by with SYBR Green or with Tagman probes. Here, SYBR Green detection is performed using standard techniques with the following primers:

- 10 HPA-03 For TCCCTCCCGAATTCTATGAGC (SEQ ID NO: 82)
 HPA-03 Rev GGCACAGTCAATCAGCTGGTAC (SEQ ID NO: 83)

The results of the real time analysis are shown in Figure 27. The values are normalized to the internal GAPDH values of the samples to correct for variations in concentrations of the samples. The values are plotted relative to the control samples with Ad-U6(+1)-gGL2.2.

The analysis by Northern blotting is performed using standard techniques with a GNAS cDNA probe obtained by RT-PCR. The results are shown in Figure 28. Equal loading is checked by a methylene blue staining of the blot prior to hybridization as shown at the bottom of the figure.

The above experiments exemplify that endogenous genes can be efficiently knocked down by adenoviral knock-down constructs of the invention as described herein.

25 In a more extensive analysis, additional endogenous genes are selected to demonstrate sequence-specific reduction of the mRNA after viral infection with knock-down viral constructs according to the present invention. The selected genes and the selected sequences that are targeted are identified below.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

More than one target sequence is selected for two of these genes.

Selected genes: IKK beta (AF080158), PPAR gamma (NM_005037), M6PR (NM_002355)

5 Selected target sequences:

IKK beta -1	CUUAAAGCUGGUUCAUAUC	(SEQ ID NO: 84)
IKK beta -2	AGAAUCAUCCAUCGGGAUC	(SEQ ID NO: 85)
IKK beta -3	CGUCGACUACUGGAGCUUC	(SEQ ID NO: 86)
PPAR gamma -2	UACUGUUGACUUCUCCAGC	(SEQ ID NO: 87)
10 PPAR gamma -3	UUGAACGACCAAGUAACUC	(SEQ ID NO: 88)
PPAR gamma -4	AUUCAGACAACCUGCUAC	(SEQ ID NO: 89)
M6PR-2	GGAAGUAAUUGGAUCAUGC	(SEQ ID NO: 90)

15 Adenoviruses are produced as described above. U2OS cells are infected with MOI 300, 1000 and 3000, and harvested after 24, 48 and 144 hrs post infection. The expression levels of the corresponding mRNAs are determined with real time PCR analysis as described above using the following primer combinations:

PPAR gamma (NM_005037):

20 HPA-01 Rev	GGAGCGGGTGAAGACTCATG	(SEQ ID NO: 91)
HPA-01 For	ATTGTCACGGAACAGTGCA	(SEQ ID NO: 92)

M6PR (NM_002355):

HPA-04 For	CAGTGGTGATGATCTCCTGCAA	(SEQ ID NO: 93)
25 HPA-04 Rev	TGCCACGCTCCTCAGACAC	(SEQ ID NO: 94)

IKK beta (AF080158):

HPA-07 For	GCAGACCGACATTGTGGACTTAC	(SEQ ID NO: 95)
HPA-07 Rev	CCGTACCATTTCTGACTGTCA	(SEQ ID NO: 96)

30

Figures 29 A-C show a specific reduction of the mRNA levels for the tested targets in a MOI and time dependent manner.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

GNAS:

GNAS encodes the $G\alpha$ subunit of G_s , a heterotrimeric G-protein (α , β , γ). G proteins interact with 7 transmembrane receptors, the so-called G-protein coupled receptor (GPCR). Binding of a
5 ligand to the GPCR induces a conformational change of the receptor that results in activation of the G-protein. The activated G protein will dissociate into its α subunit and the $\beta\gamma$ subunit. In the case of $G_{\alpha s}$ the α subunit will interact with adenylyl cyclase and in turn activate this enzyme.
10 Adenylyl cyclase converts ATP into cAMP. Activation of GPCRs that are coupled to G_s will therefore upon activation elevate the cellular cAMP levels. Variation in cAMP levels in the cell can be measured by cAMP responsive elements (CRE). cAMP responsive element activates transcription when bound by
15 activated cAMP responsive element binding protein (CREBP). CREBP is activated by Protein Kinase A (PKA) that in turn is activated by cAMP. When the CRE is coupled to a luciferase gene, variations in cAMP levels in a cell can be visualized. An increase in cellular cAMP will result in an increase in the
20 amount of luciferase and a decrease of cAMP results in a decrease of luciferase content.

The following assay is designed to measure the knock-down of GNAS at a functional level.

25 U2OS cells are infected with an adenoviral construct encoding a GPCR (β_2 adrenergic receptor) that couples to G_s (MOI 500) together with an adenoviral reporter construct carrying CRE elements upstream of a luciferase gene (MOI 750). The infected cells are co-infected with either an adenoviral construct
30 encoding siRNA (SEQ ID NO: 81) targeted against GNAS or an empty virus (MOI 1500).

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

Two days post infection, the $\beta 2$ adrenergic receptor is activated with isoproterenol, which is an agonist for the $\beta 2$ adrenergic receptor. Six hours later the luciferase activity is measured.

- 5 After activation of the receptor, successful knock-down of GNAS results in a much lower cAMP levels compared with cAMP levels observed in the control cells transfected with empty virus.

- 10 To ensure that the decreased cAMP levels are due to the knock-down of GNAS and not due to a non-specific effect on cAMP levels, forskolin is added to the triply infected cells. Forskolin increases intracellular cAMP levels by direct activation of adenylate cyclase and therefore is independent of G-protein (GNAS).

- 15 Figure 30 shows the results of the functional knock-down measurements of GNAS. The luciferase activity in cells infected with the adenoviral GNAS knock-down construct are much lower than the luciferase levels of the cells that are not infected with the GNAS knock-down construct. The
20 forskolin results show that the cAMP reduction is due to the knock-down of GNAS rather than a general down-stream effect on the signal transduction route leading to the activation of CREBP.

Example 7: Co-expression of human Dicer

- 25 This example describes the cloning and expression of human Dicer cDNA. Cloning of Dicer cDNA is accomplished using RT-PCR with mRNA as template. Dicer is co-expressed with the constructs of the previous examples thereby improving processing of RNA transcribed from the constructs. Co-
30 expression of human Dicer is beneficial to the system, since it allows the system to be independent of endogenous Dicer

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

activity that might be low or even absent in certain situations, tissues or developmental stages.

Biochemical and genetic data show the involvement of a member of the RNase III family of nucleases, Dicer, in the accurate processing of the double stranded RNA into the active siRNA species (Bernstein et al. (2001) *Nature* 409:363-366; Knight et al. (2001) *Science* 293:2269-71). The human homologue of Dicer functions to form approximately 22 nts RNAs from dsRNA substrates. Dicer is also required for the maturation of the let-7 sRNA in humans (Hutvagner et al. (2001) *Science* 293:834-838).

The human Dicer homologue is cloned using reverse transcriptase-PCR and primers based on the sequence Acc. Number NM_030621. Position relative to start of NM_030621 sequence.

Primer	Sequence 5' to 3'	Position	SEQ ID NO
hDicer F1	ccgAAGCTTGGGCATGCTGTGAT	42-61	SEQ ID NO: 67
hDicer F2	ccgaagcttATGAAAAGCCCTGCTTTGCAA	183-203	SEQ ID NO: 68
hDicer F3	ccgaagctTCCAGAGCTGGCTTATATCAG	1592-1612	SEQ ID NO: 69
hDicer F4	ccgaagcttACTGATTCTGCATATGAATGG	4611-4631	SEQ ID NO: 70
hDicer R1	ctgagctagcTTGTTAGAGCAACAGCCTAGA	6960-6940	SEQ ID NO: 71

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

hDicer R2	ctgagctagcTCAGCTATTGGGAACCTGAGGT	5957-5936	SEQ ID NO: 72
hDicer R3	ctgagctagcAATACACTGCTCAGTGTGCAA	4850-4830	SEQ ID NO: 73
hDicer R4	ctgagctagcGATTGAACATAGGATCGATAT	1834-1814	SEQ ID NO: 74

Due to the large size of the human Dicer cDNA, cloning can be accomplished by first isolating smaller regions of the cDNA. PCR fragments are subcloned and then ligated together in order to obtain the full-length human Dicer cDNA. Different primer combinations are used to generate different sized DNA fragments in order to facilitate cloning of the full-length cDNA. This avoids the problem of obtaining the long cDNA of Dicer. However, cloning in a single round using primers outside the coding region remains possible. The forward primers contain a Hind III site, and the reverse primers contain an Nhe I site for cloning purposes. The full-length cDNA is cloned into the Hind III and Nhe I sites of the pIPspAdapt6 vector. This vector is used for expression in mammalian cells by direct transfection or by making an adenoviral vector carrying the dicer cDNA and expressing it upon (co)infection.

The cloned Dicer cDNA expression plasmid is combined with constructs described in other examples and introduced into mammalian cells. The co-expression of constructs with Dicer cDNA or its homologues facilitates the processing of the transcribed sRNA.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

Example 8: Identification of 21-23 nts RNA sequences that are endogenously expressed and construction of a defined expression library of small RNAs

This example describes the identification and isolation of
5 sRNAs.

Let-7 RNAs of 21-23 nts are conserved in a variety of animal species, including *Drosophila* and humans (Pasquinelli et al. (2000) *Nature* 408:86-89). Let-7 RNA is derived from a longer precursor RNA (Hutvagner et al. (2001) *Science* 293:834-838).
10 It has been reported that upon incubation of long dsRNA in *Drosophila* extracts, 21-23 nts siRNAs are produced from the dsRNA. These 21-23 nts siRNAs have been isolated, cloned, and sequenced (Elbashir et al. (2001) *Genes Dev* 15:188-200). Novel endogenous 21-23 nts siRNAs have also been identified in
15 *Drosophila* using this approach (Elbashir et al. (2001) *Genes Dev* 15:188-200).

The sRNAs belonging to the let-7 RNA-family are identified as follows. Sequences of human 21-23 nts-RNAs that are endogenous (from different RNA sources; tissues, cell types, etc.) are
20 obtained by cloning them by the method described for *Drosophila* (Elbashir et al. (2001) *Genes Dev* 15:188-200).

The obtained sequence information is used for the following aspects:

1. They are used to construct an expression library
25 containing these sequences. The library is based, as described in the previous examples, on the expression of chimeric RNAs that have let-7 precursor segments (let-7 5' extension, let-7 loop, and let-7 3' extension sequences) combined with the 21-23 nt RNA sequences. The
30 functions of these 21-23 nt RNAs and their target RNAs are studied by performing cellular assays.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

2. The sequence identification of naturally occurring 21-23
nts RNAs facilitates the search for their genomic
locations. Identification and characterization of the
genomic sequences provides information regarding the
5 production and processing of the members of the family of
these sRNAs. In analogy to the let-7 RNA, the founding
member of this family, new family member information is
used for generating a chimeric RNA expressing system as
explained for let-7 in previous examples. In addition,
10 genomic sequence information is useful for optimizing the
let-7 system described in previous examples.

Example 9: Construction of an undefined expression library of
sRNA species

15 This example describes the cloning of the sRNAs identified in
Example 8. It is not necessary to know the sequence of the
21-23 nucleotide RNAs. The method generates a DNA fragment
that consists of (in this order):

1. A 5' linker sequence to aid in cloning;
2. The 21-23 nucleotide sequence, which is preferably
20 antisense to the target sequence;
3. A central linker (loop) sequence;
4. A sequence able to base pair with the 21-23 nucleotide
sequence of 2 above; and
5. A 3' linker sequence to aid in cloning.

25 These DNA fragments are digested with restriction
endonucleases and cloned into vectors. The preferred vectors
are expression plasmids that contain let-7 or pol III
promoters.

30 As described in the Example 8, endogenous sRNAs belonging to
the family of let-7 RNA are identified by cloning and
sequencing. In this example, the isolated sRNAs are cloned

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

directly into an expression construct without first identifying their sequence (see Figure 5):

1. The sRNA is treated with Calf Intestinal Alkaline Phosphatase to remove the 5' phosphate group.
- 5 2. The product of step 1 is ligated at its 3' terminus to the 5' phosphate group of linker 1 to form an intermediate polynucleotide.

Linker 1 is an oligonucleotide that can fold into a stem-loop structure and has a terminal 3' OH group that can be used as a primer. A preferred oligonucleotide contains a
10 restriction site in the duplexed portion of the stem-loop. The presence of this restriction site facilitates the later excision and replacement of the linker sequence if necessary. The ligation is performed using T4 RNA
15 ligase.
3. The product of step 2 is phosphorylated at its 5' terminus by T4 polynucleotide kinase.
4. The product of step 3 is ligated at its 5' phosphate terminus to the 3' OH terminus of linker 2. Linker 2 is
20 an oligonucleotide having a 5' terminal OH group.
5. The product of step 4 is treated to allow the 3' terminus of linker 1 to anneal. This is used for an extension reaction using the 3' terminus of linker 1 as a primer with Reverse Transcriptase lacking the RNase H activity.
- 25 6. The product of step 5 is denatured and primer 4 is annealed. Primer 4 is complementary to the extreme 3' terminus of the product of step 5. Note: Linker 2 and primer 5 contain identical sequences.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

7. The annealed primer 4 is extended by DNA polymerase or reverse transcriptase or a mixture of both.
8. An additional optional round of amplification is performed using primer 4. The amplification is performed by Klenow Fragment DNA polymerase, or T4 DNA polymerase, or a thermal stable DNA polymerase.
9. The product of step 7 (optionally step 8) is digested by restriction enzyme 1 and cloned into an expression vector with the appropriate site. The expression vector is based on the let-7 gene or pol III promoter based as described in previous examples and can be viral such as adenoviral or can be non-viral.
10. If the existing loop sequence (embedded in linker 1) is not functional to obtain the active sRNA species, this loop can be replaced by another loop sequence which gives rise to active sRNAs; e.g. the let-7 loop sequence. Cleavage sites are included in linker 1 to make this option possible.

Example 10: Construction of an sRNA expression library directed against endogenous RNA targets

As it would be beneficial to be able to knock down expression of any gene, including currently unknown or uncharacterized genes, this example describes methods whereby different 19 nucleotide guide sequences are synthesized and cloned to make a library.

In analogy to Examples 8 and 9, an sRNA expression library is constructed. For example the sequences for the sRNA specifying their targets (mRNAs, structural RNAs, etc.) are obtained from databases, cellular extracts or chemically synthesized. For example, the sequences are obtained from databases containing

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

expressed RNA sequences, including but not limited to mRNA, ESTs, SAGE, and may or may not encode proteins including but not limited to kinases, proteases, phosphodiesterases, phosphatases, G-protein coupled receptors, growth factors, lipases, ABC transporters, DNases, RNases etc. Also sequences from structural RNA sequences (e.g. snRNAs, rRNAs, tRNAs, snoRNAs, etc.) can be used. From these collections of oligonucleotides are produced containing these sequences. The mixture of the oligonucleotides is used to clone into the expression construct, using the strategy outlined in Figure 6. Another example is the random generation of 19 nt sequences that produces a library of 4^{19} combinations (2.7×10^{11}), which are similarly cloned into an expression construct in accordance with the procedure outlined in Figure 6. In step (1) of this procedure, an oligonucleotide is synthesized containing the specifying sequence (or random sequence), N19, flanked on the 5' end by a linker sequence and on the 3' end by a sequence that can fold into a stem-loop structure and has a terminal 3' OH group that can be used as a primer. The 3' terminus is used as a primer in an extension reaction with DNA polymerase or reverse transcriptase. Preferably, the duplexed portion of the stem-loop includes a restriction site. The 5' linker sequence could also have a restriction site in order to facilitate cloning.

In step (2), the product of step (1) is denatured and primer 4 is annealed. Primer 4 is complementary to the extreme 3' terminus of the product of step (1). The extreme 5' terminus of the initial oligonucleotide of step (1) and the primer 4 contain identical sequences. If the 5' linker sequence does not have a restriction site, primer 4 can be designed to have a restriction site in order to facilitate cloning.

In step (3) the annealed primer 4 is extended by DNA polymerase or a thermal stable DNA polymerase (e.g. Taq).

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

An optional step (4) provides for further amplification of the construct by a DNA polymerase.

- In step (5), the product of step (3) or optionally step (4) is digested by restriction enzyme 1 (E1) and cloned into an expression vector with the appropriate restriction site. The preferred expression vector includes the let-7 or pol III promoter. The described method is especially suited for construction of pooled retroviral or lentiviral or AAV or integrating adenovirus sRNA expression libraries.
- 10 In optional step (6), if the loop sequence is not functional to obtain the active sRNA species, it can be replaced by another loop sequence which gives rise to active sRNAs; for example, the let-7 loop sequence. Restriction sites recognized by restriction enzymes 3 and 4 (E3 and E4 respectively) are
- 15 included in the stem-loop sequence to permit replacement.

Example 11: Production of an sRNA expression library

- A preferred expression construct produces the siRNAs at levels with the strongest knock-down of the target RNA. For example, an expression construct based on the U6 promoter as described
- 20 in previous examples.

- Oligonucleotides can be designed directed against these targets and used for the construction of knock-down expression clones. Preferably, the forward (F) oligonucleotides contain the guiding sequences against the targets, followed by the connecting loop sequence, followed by the sequences that are able to basepair to the guiding sequences, however the order of guide sequence and complement can be switched. The reverse (R) oligonucleotides are complementary to the cognate forward oligonucleotide. A specific pair of forward and reverse
- 25 oligonucleotides is annealed together forming a duplexed structure that is used for cloning into the expression vector.
- 30

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

The annealed F and R oligonucleotides either are cloned directly when designed with the appropriated overhangs matching these of the cloning vector, or they are digested with restriction enzymes prior to cloning to generate the
5 appropriated overhangs matching these of the cloning vector.

The construction of a library directed against endogenous targets is preferably performed by using a DNA vector construct in which annealed oligonucleotides are cloned directly.

10 For example, to generate an expression construct based on the U6 promoter, a vector is created that is converted into a linear sequence with the enzyme Sap I. Sap I cuts adjacent to its recognition sites (GCTCTC(N)_{1/4}). This has the advantage in that it cuts any sequence and that the recognition sequence
15 is not present in the final construct since it is present on the excised fragment. As a consequence, any sequence can be chosen to linearize the vector. Therefore it is used for the construction of expression plasmids based on various promoters, without disturbing the sequence. Preferably, the U6
20 promoter is used to create both cloning sites with different overhangs. In addition, to improve cloning efficiency the e. coli lethal gene, ccdB, is included in the fragment to be excised. When the restriction fragment is not excised and the ccdB gene remains in the plasmid, after transfection no e.
25 coli colonies are formed (Figure 25A). Only e. coli containing correct expression plasmids will form colonies. The sequences of the junctions are schematically given in Figure 25B.

The annealed oligonucleotides have the following sequence to
30 enable direct cloning into the U6 promoter based vector after Sap I digestion as discussed above:

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

Forward oligonucleotide:

5'-ACC-G-N18- -loop -N18*-C-TTT-3'

Reverse oligonucleotide:

3'-C-N18*-loop*-N18 -GAAAAAT-5'

- 5 When using a pol III promoter, to facilitate transcription the first nucleotide is preferably a G-nucleotide. Therefore, in a preferred embodiment, the 19 nt guiding sequence is G-N18. N18*-C is a sequence able to base-pair to the 19 nt guiding sequence (G-N18), loop is the connecting loop sequence, loop* is the complement of loop. See also Figure 25B.
- 10

The oligonucleotides are designed such that they are even smaller, i.e. 51 nt instead of 56 nucleotides:

Forward oligonucleotide:

5'-CC-G-N18- -loop -N18*-3'

- 15 Reverse oligonucleotide:

3'-N18*-loop*-N18 -GAA-5'

The expression vector has to be adjusted accordingly. See Figure 26

- 20 The present invention can also be used to generate random target sequences to produce an undefined library. The target sequences are not known, however they preferably start with a G to facilitate translation by Pol III. These oligonucleotides can produce a library with 4^{18} combinations ($6.87 \cdot 10^{10}$).

- 25 The non-viral DNA expression libraries generated as described above can be used in disease relevant cellular assays to screen for knockdown-induced phenotypes by transfecting the DNAs as arrayed collections using DNA transfer methods known in the art, such as lipofectamine or PEI. These libraries can also be used to generate collections of cell lines with
- 30 individual or multiple genes stably knocked down by including

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

a selectable marker in the expression plasmid prior to making the library in said vector.

The individual knockdown constructs can be pooled to various degrees, that is in one large pool of constructs, or subsets of such pool. The sets and subsets of pools can then be used in disease relevant assays where the phenotype is a selectable phenotype such as a flow cytometric phenotype (e.g. induction or repression of marker) or growth advantage phenotype.

Example 12. Arrayed adenoviral library construction

10 This example describes construction of an arrayed adenoviral sRNA expression library. "Arrayed adenoviral sRNA expression library" refers to a collection of adenoviruses (contained in multiwell plates, for example 96 or 384 well plates) mediating the expression of various (human) sRNAs, in which every well
15 contains a unique recombinant virus carrying a sRNA expression construct targeted against a gene, i.e. one target gene per well. Further details about the concept of arrayed adenoviral libraries can be found in WO 99/64582, US 6,340,595 and 6,413,776 (Arrayed adenoviral libraries for performing
20 functional genomics). Arrayed adenoviral libraries expressing sRNAs that down-regulate specific endogenous mRNAs can be used to infect cells including disease relevant human primary cell types such as HUVECs. These assays may be used to screen for genes that specifically inhibit a metabolic pathway, such as the Nf-kappaB pathway, by an expressed sRNA, and thereby
25 inhibit the up-regulation of a cytokine, such as IL8. .

A. Construction of Adenoviral Arrayed sRNA Library

Oligonucleotides are designed to be targeted against specific mRNAs transcribed from specific genes and used for the
30 construction of knock-down adenoviral expression clones. The preferred oligonucleotides are designed such that the first

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

- sequence (forward (F)) contains the guide sequences against the targets, covalently linked to the stem-loop second sequence, which is covalently linked to the third sequence that is able to base-pair with the first sequence. Another
- 5 embodiment reverses the guide function resulting in the third sequence as the guide sequence. The reverse (R) oligonucleotides are complementary to the cognate forward oligonucleotides. Specific pairs of forward and reverse oligonucleotides are annealed together forming a duplexed
- 10 structure that is used for cloning into an expression vector based on pIPspAdapt6 (described in WO 99/64582) containing a promoter, for instance the polIII-dependent let-7 or U6 promoter. The expression cassette may further contain (a) unique restriction enzyme recognition sequence(s) to
- 15 directionally ligate the annealed F and R oligonucleotides that encode for the sRNA sequences against an endogenous mRNA. The single stranded oligonucleotide components may be synthesized and annealed in 96 or 384 well plates to generate the double stranded oligonucleotides.
- 20 The array of sRNA Adapter plasmids is then, again in an arrayed format, transformed into host microorganisms, such as bacteria, preferably *Escherichia coli* (strain DH10B) or strains better suited for propagation of constructs containing adenoviral ITRs. Transformed bacteria can be plated and grown
- 25 on 6 well LB-ampicillin plates, after which a colony picker picks individual bacterial colonies and further inoculates liquid LB growth medium (+ 100 µg/ml ampicillin) in 96 well plates.
- The preferred method of this invention is to start the liquid
- 30 cultures directly from the 96 well *E. coli* transformation plates without plating and picking individual colonies. In both cases the resulting 96 well plates are incubated in a

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

rotary shaker (New Brunswick Scientific, Innova, floor model or equivalent) at 37°C, 300 rpm. After culturing bacteria for about 12 to about 24 hours, about 100 µl of bacterial cultures are then mixed with 100 µl of 50% glycerol using a Multimek robot (Beckman Coulter) or equivalent and stored at -80°C. These plates are defined as 'glycerol stock plates'.

B Preparation of plasmid DNA

A second step in the construction of the adenoviral sRNA expression library is the arrayed purification of DNA of individual plasmids from the primary library in amounts sufficient for adenovirus generation. For this purpose, a bacterial culture is prepared as follows. The glycerol stock plates are thawed and 3 µl of the bacterial culture is transferred to a 96 well plate filled with 280 µl of liquid LB growth medium (+ 100 µg/ml ampicillin) using a CybiWell robot (CyBio). These inoculated plates are then incubated for 18 hrs in a rotary shaker (37°C, 300rpm) (New Brunswick Scientific, Innova, floor model). Centrifugation of the 96 well plates (3 min, 2700 rcf) is performed to pellet the bacteria. All centrifugations of 96 well plates are performed in an Eppendorf microtiterplate centrifuge (type 5810). The supernatant is then removed by decanting into a waste container. The lysis of bacterial cells and precipitation of proteins and genomic DNA is performed by applying the classical alkaline lysis protocol. The buffers used to perform alkaline lysis are purchased from Qiagen (P1, P2, P3). In a first step, the bacterial pellet is resuspended into 60 µl of buffer P1. In a second step, 60 µl of buffer P2 is added to the resuspended bacterial cells. The solution is gently mixed and a 5 min incubation time is applied to achieve complete cell lysis. Finally, 60 µl of buffer P3 is added and a mixing step applied for precipitation of proteins and

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

genomic DNA. The 96 well plates are then centrifuged (40 min, 3220 rcf). The supernatant (100 µl) is collected and transferred to new V-bottom 96 well plates containing 80 µl of isopropanol (for precipitation of the plasmid DNA) using a
5 CybiWell robot (CyBio). The plates containing the pellet are discarded. The 96 well plates are centrifuged (45 min, 2700 rcf) and the supernatant discarded by decanting in a waste container. To remove salt traces, the pellet is washed with
10 100 µl of 70% ethanol and the 96 well plates are centrifuged again (10 min, 2700 rcf). The supernatant is removed again by decanting in a waste container and the DNA pellets are allowed to dry for 1 h in a laminar airflow cabinet. Finally, the DNA is dissolved in 20 µl of sterile TE buffer (1 mM Tris-HCl (pH7.6), 0.1mM EDTA). The integrity of the constructs is
15 assessed by restriction enzyme mapping and sequencing of either the whole array or parts thereof. Plates containing the dissolved DNA (further defined as DNA plates) are stored at -20°C until further use.

C. DNA quantification

20 Before use for transfection of PER.C6/E2A cells, the plasmid DNA preparations contained in 96 well plates are quantified. For this purpose, 5 µl of plasmid DNA is pipetted from the DNA plates and transferred to a 96 well plate containing 100 µl of TE buffer. 100 µl of 'quantification solution' is added.
25 This solution is prepared by dissolving 2 µl of SybrGreen (Molecular Probes) into 10 ml of TE Buffer. After a mixing step, measurement is performed in a Fluorimeter (Fluostar, BMG) with the following settings: emission: 485 nm; excitation: 520 nm, gain: 35. A standard curve is generated
30 by performing a measurement using different dilutions (in TE buffer) of a standard DNA sample (lambda DNA). By fitting results for the individual DNA samples on this curve, DNA

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

concentration per well is calculated. The mean DNA concentration per well for each DNA plate is then calculated. On average, a DNA concentration of 20-100 ng/ μ l of DNA is obtained.

5 D. Transfection of Per.C6/E2A cells

- The pIPspAdApt6 plasmid versions contain the 5' part (bp 1-454 and bp 3511-6093) of the adenovirus serotype 5 genome in which the E1 gene is deleted and a promoter (let-7- or pol III-derived) is introduced. In contrast, to the plasmid
- 10 pIPspAdApt6, the sRNA expression derivatives of pIPspAdapt lack the CMV promoter and the SV40 polyadenylation site. Two other materials needed for the generation of recombinant adenovirus particles are a cosmid and a packaging cell line (WO99/64582. US 6,340,595). The cosmid (pWE/Ad.AflIII-
- 15 rITRAE2A) contains the main part of the adenovirus serotype 5 genome (bp 3534-35953) from which the E2A gene is deleted. The Per.C6/E2A packaging cell line is derived from human embryonic retina cells (HER) transfected with plasmids mediating the expression of the E1 and E2A genes. The
- 20 adenoviral genes that are integrated into the genome of the PER.C6/E2A cell line share no homology with the adenoviral sequences on the adapter plasmid and the cosmid. Consequently, vector stocks that are free of replication competent adenoviruses (RCAs) are prepared.

25

- To obtain viruses, this adapter plasmid is co-transfected with the cosmid into a packaging cell line PER.C6/E2A. Once the adapter and helper plasmids are transfected into the PER.C6/E2A cell line, the complete Ad5 genome is reconstituted
- 30 by homologous recombination. The helper and adapter plasmids contain homologous sequences (bp 3535-6093), which are a

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

substrate for this recombination event. The DNA plates, which are prepared and quantified as described above, are used for transfection of the PER.C6/E2A cell line. Prior to this transfection, the plasmids contained in these plates are

5 linearized by digestion with the *PI-PspI* restriction enzyme (New England Biolabs). For this purpose, a certain volume of plasmid DNA (representing 66.7 ng of DNA on average, as calculated from the average DNA concentration of each DNA plate) is pipetted from the DNA plates into a V-bottom 96 well

10 plate containing a restriction mix composed of 1X restriction buffer (New England Biolabs: 10mM Tris-HCl (pH 8.6), 10mM MgCl₂, 150 mM KCl, 1 mM DTT), 100µg/ml BSA and 6 units of *PI-PspI* restriction enzyme (from a stock of 20 U/µl). For each DNA plate, an identical volume of plasmid is used for all

15 wells. Transfer of the DNA samples from the DNA plate to the plate containing the restriction mix and subsequent mixing is performed with a JoBi Well robot (CyBio). The plates containing the restriction mix are then put in plastic boxes containing humidified paper towels (to avoid evaporation) and

20 incubated at 65°C for 4 hrs. The helper plasmid (pWE/Ad.AflII-rITRAE2A) (which is prepared in batch using the Qiagen Maxi-prep kits) is also linearized with the *PacI* restriction enzyme (New England Biolabs).

The transfection of the PER.C6/E2A cells with the linearized

25 adapter and helper plasmids is set up as described below. 0.1867 µl of linearized helper plasmid (containing 93 ng of DNA) is mixed with 1.11 µl of serum free 2XDMEM (Life Technologies) to form a "helper mix". 0.597 µl of Lipofectamine (Life Technologies) is mixed to 1.11 µl of

30 2XDMEM to form a "lipo mix". In each well of 96 well plates containing the linearized adapter plasmids, 1.3µl of "helper mix" and 1.7 µl "Lipo mix" are pipetted using a CyBi-Well

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

robot (CyBio, equipped with a 'dropper'). The plates are then incubated for approximately 1 hour at room temperature before addition of 28.5 µl of serum-free DMEM. Mixing is performed by pipetting the mixture up and down three times (CyBi Well robot). Using the same device, 30 µl of the mix is transferred to 96 well plates containing PER.C6/E2A cells seeded at a density of 2.25×10^4 cells/well. Cells are seeded into 100 µl of PER.C6/E2A medium (composed of DMEM (Life Technologies) containing 10% FBS (Life Technologies), 50 µg/ml gentamycin and 10 mM $MgCl_2$), but prior to addition of the 30 µl of the DNA/Lipofectamine mix, the medium is removed from all wells of the plates. An incubation time of three hours at 39°C, 10% CO_2 is then applied. 170 µl of PER.C6/E2A medium is then added to the plates and an overnight incubation at 39°C, 10% CO_2 is applied. The 96 well plates containing the transfected PER.C6/E2A cells are incubated at 34°C, 10% CO_2 during three weeks. This temperature allows the expression of the E2A factor, which is required for adenoviral replication. During this incubation time, viruses are generated and replicated, as revealed by the appearance of CPE (cytopathic effect). The percentage of the wells showing CPE is scored manually or using an automated image scanner and appropriate algorithm, which allows for the evaluation of the efficiency of virus production. The 96 well plates are stored at -80°C until further propagation of the viruses.

E. Virus propagation

The final virus propagation step is aimed at obtaining a higher percentage of wells showing CPE and more homogenous virus titers. Viruses are propagated according to the following procedure. The transfection plates stored at -80°C are thawed at room temperature for about 1 hour. By means of

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

a 96 channel Hydra dispenser (Robbins), 20 μ l of the supernatant is transferred onto PER.C6/E2A cells seeded in 96 well plates at a density of 2.25×10^4 cells/well in 180 μ l of DMEM + 10% FBS. After handling of one series of 96 viruses, the needles of the dispenser are disinfected and sterilized by pipetting up 60 μ l of 5% bleach three times. The traces of bleach present in the needles are removed by three successive washes with 70 μ l of sterile water. Cells are incubated at 34°C, 10% CO₂ for approximately 10 days and the number of wells showing CPE is scored. In general, the number of wells showing CPE is increased after propagation. The plates are then stored at -80°C.

From the 200 μ l of crude cell lysate containing the library viruses after the propagation step, six aliquots of 25 μ l are prepared in 384 well plates using a 96-channel Hydra dispenser. From four 96 well plates, six identical 384 well aliquot plates are prepared. Disinfection of the needles in between the individual plates is achieved by a triple washing step with 200 μ l 5% bleach and a triple washing step with 250 μ l sterile water to remove bleach traces. The 384 well aliquot plates are then stored at -80°C until further use in an assay.

A schematic representation of the library construction is shown in Figure 7.

In addition, modifications to the viral coat proteins can be introduced to obtain a different or improved tropism (EP 1191105).

The arrayed adenoviral libraries described above can be used in disease relevant cellular assays to screen for knockdown induced cellular phenotypes. Such libraries are particularly

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

useful when the adenoviral vector constructs are integrating adenoviral vectors, such as described in US 6,051,430 or WO 99/32647/EP 1042494 and Virology 2001 Sep 30; 288(2): 236-46. Such adenoviral sRNA expression libraries result in a library
5 of cell lines in which individual or multiple genes are stably knocked down. The individual knockdown adenoviruses can be used as arrays but also can be pooled to various degrees i.e. sets of pools or one large pool. The pools can then be used in disease relevant assays including assays with a selectable
10 phenotype such as a flow cytometric phenotype (screening for up-regulation or down regulation of a suitable marker by using, for example, fluorescence-labeled antibodies) or growth advantage phenotype.

Example 13. Arrayed AAV library construction

15 This example describes construction of an arrayed AAV sRNA expression library "comprising a collection of adenovirus associated virus (AAV) vectors, that are contained in multiwell plates, for example 96 or 384 well plates, and that mediate the expression of various unique (human) sRNAs. Each
20 well contains a unique recombinant AAV vector carrying an sRNA expression construct targeted against a specific gene. Arrayed AAV libraries expressing sRNAs that down regulate specific endogenous mRNAs can be used to infect cells including disease relevant human primary cell types such as
25 HUVECs, for example to screen for genes that specifically inhibit a metabolic pathway, such as the NfkapB pathway, by an expressed sRNA, and thereby down-regulate production of one or more cytokines, such as IL8.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

A. Construction of the AAV based sRNA library

- Oligonucleotides are designed to be targeted against specific mRNAs transcribed from specific genes and used for the construction of knock-down AAV expression clones. The
- 5 preferred oligonucleotides are designed as described above (Example 12). Specific pairs of forward and reverse oligonucleotides are annealed together forming a duplexed structure that is used for cloning into an AAV expression vector consisting of the AAV ITR sequences, an AAV packaging
- 10 signal (see US 6,140,103) and a promoter, for instance the polIII-dependant let-7 or U6 promoter. The expression cassette may further contain (a) unique restriction enzyme recognition sequence(s) to directionally ligate the annealed F and R oligonucleotides
- 15 The array of sRNA-AAV ligations is then, again in an arrayed format, transformed into host microorganisms, such as bacteria, preferably *Escherichia coli* (strain DH10B) or strains better suited for propagation of constructs containing AAV ITRs. Transformed bacteria can be plated and grown on 6
- 20 well LB-ampicillin plates, after which a colony picker picks individual bacterial colonies and further inoculates liquid LB growth medium (+ 100 µg/ml ampicillin) in 96 well plates followed by plasmid DNA isolation.

- The preferred method of this invention is to start the liquid
- 25 cultures directly from the 96 well *E. coli* transformation plates without plating and picking individual colonies. In both cases the resulting 96 well plates are incubated in a rotary shaker (New Brunswick Scientific, Innova, floor model or equivalent) at 37°C, 300 rpm. After culturing bacteria for
- 30 about 12 to about 24 hours, about 100 µl of bacterial cultures are then mixed with 100 µl of 50% glycerol using a Multimek

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

robot (Beckman Coulter) or equivalent and stored at -80°C. These plates are defined as 'glycerol stock plates'. From these 'glycerol stock plates', plasmid DNA can be prepared and quantified as described in Example 12.

5 B. Transfection of cells to generate AAV virions in arrayed format

For generation of arrayed AAV collections, AAV virions are produced from the arrayed srRNA-AAV plasmids DNAs described under A, using an AAV packaging cell line or a transient AAV packaging system. An AAV packaging cell line or derivative thereof, as described in US 6,140,103 may be used. Alternatively transient co-transfection of arrayed srRNA-AAV DNA with rep-cap expression constructs without a packaging signal or any other overlap with the srRNA-AAV constructs can be performed on cells infected with psoralene treated adenovirus to provide in trans the necessary helper genes of the helper adenovirus. For both approaches, the cell lines to be transfected are seeded in 96 well plates. Virus production, propagation and titering can be done with methods known to the art of AAV vector technology. After production of AAV srRNA-viruses in 96 well plates they can be re-aliquoted using a liquid handler into 384 well aliquot plates and stored at -80°C until further use.

The arrayed AAV libraries described above can be pooled to various degrees, that is in one large pool of retroviruses, or subsets of such retrovirus pool. The sets and subsets of pools can be used in disease relevant cellular assays to screen for knock-down induced phenotypes. Also these AAV srRNA expression libraries can be used to generate collections of cell lines with individual or multiple genes that are stably knocked-down.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

Example 14Retroviral libraries expressing sRNA

In this example, the Moloney Murine Leukemia Virus-based retroviral plasmid LZRSpBMN-LacZ, is used (Kinsella TM and Nolan GP (1996). Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus. Hum. Gene Ther. 7:1405-13).

A. Construction of the retrovirus-based sRNA library

- In LZRSpBMN-LacZ, the LacZ gene replaces the env-pol sequences. Furthermore, the EBV EBNA-1 gene and EBV oriP origin of replication are present in the plasmid backbone. These allow episomal replication of the plasmid in the packaging cells. In this way, high titer supernatant can be generated after transient transfection of the packaging cells.
- Transfected cells can be selected since a puromycin resistance gene, under control of the Phosphoglycerol Kinase-1 promoter, is also present in the plasmid backbone. Culturing of the transfected packaging cells in the presence of puromycin usually generates high titer supernatant.
- To express the chimeric RNA's as described above, the LZRSpBMN-LacZ vector is further modified by replacing the LacZ gene for an expression cassette. This expression cassette contains an ubiquitously active promoter, in particular, a promoter recognized by RNA polymerase III (pol III promoter) including but not limited to U6 and let7 promoters. The expression cassette can be cloned in either orientation at different positions within the viral backbone of the retroviral vector, as is well known to those skilled in the art (see for example, Medina MF, Joshi S. RNA-polymerase III-driven expression cassettes in human gene therapy. Curr Opin Mol Ther 1999 Oct; 1(5): 580-94.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

The expression cassette further contains (a) unique restriction enzyme recognition sequence(s) (see example 10) to directionally ligate and clone the annealed F and R oligonucleotides that encode the sRNA against an endogenous mRNA.

Oligonucleotides are designed as described above. Specific pairs of forward and reverse oligonucleotides are annealed together forming a duplexed structure that is used for cloning into a modified LZRSpBMN-LacZ vector or equivalent. The single stranded oligonucleotides components can be synthesized and annealed in 96 or 384 well plates to generate the double stranded oligonucleotides.

The arrayed library of retroviral plasmid-sRNA ligations is then, again in an arrayed format, transformed into host microorganisms, such as bacteria, preferably *Escherichia coli* (strain DH10B) or strains better suited for propagation of such constructs. Transformed bacteria can be plated and grown on 6 well LB-ampicillin plates, after which a colony picker picks individual bacterial colonies and further inoculates 300 µl of liquid LB growth medium (+ 100 µg/ml ampicillin) in 96 well plates followed by plasmid DNA isolation.

The preferred method of this invention is to start the liquid cultures directly from the 96 well E. coli transformation plates without plating and picking individual colonies. In both cases the resulting 96 well plates are incubated in a rotary shaker (New Brunswick Scientific, Innova, floor model or equivalent) at 37°C, 300 rpm. After culturing bacteria for about 12 to about 24 hours, about 100 µl of bacterial cultures are then mixed with 100 µl of 50% glycerol using a Multimek robot (Beckman Coulter) or equivalent and stored at -80°C. These plates are defined as 'glycerol stock plates'. From

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

these 'glycerol stock plates', plasmid DNA can be prepared and quantified as described in Example 12.

B. Transfection and virus collection

A suitable packaging cell line is subsequently used to
5 generate an arrayed retroviral library from the purified
retroviral plasmid-sRNA constructs. A suitable packaging cell
line is provided by the Phoenix (ΦNX) packaging cells (Nolan
GP and Shatzman AR (1998), Expression vectors and delivery
systems, Curr. Opin. Biotechnol. 9: 447-450), but other
10 packaging cells might be equally suitable. The Phoenix cells
express the gag /pol and env proteins from two different
constructs, thus minimizing the chance to generate replication
competent retroviruses. Furthermore, the presence of a
selection marker on each of these constructs allows the
15 selection of cells that have retained them.

Ecotrophic packaging cells (ΦNX-E) produce retrovirus that can
infect only rodent cells, while viruses produced in
amphotrophic (ΦNX-A) packaging cells can infect cells from
different origins. ΦNX cells do not adhere very well onto the
20 tissue petri dishes. Care must be taken that trypsinisation is
as short as possible and that the cells do not grow under
confluent or superconfluent conditions.

Transfection of packaging cells is routinely performed using
standard calcium phosphate co-precipitation, but other methods
25 might be equally suited such as lipofectamine and PEI (also
see WO 99/64582, US 6,340,595 and US 6,413,776). For this, the
cell line is seeded in 96 well plates. Virus production,
propagation and titering may be accomplished with methods
known in the art of retroviral vector technology. After
30 production of retroviral-sRNA viruses in 96 well plates, the

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

transfected cells can be aliquoted using a liquid handler into 384 well aliquot plates.

- To isolate the viral particles, collection of the retrovirus-containing supernatant may start 24 hours after transfection
- 5 by replacing the medium with fresh culture medium. A 24 hours collection period is usually sufficient for high titer supernatant. For this, the culture medium is gently withdrawn from the dish, centrifuged at 3000xg, and aliquoted. Aliquots can be stored at -80°C and are stable for at least six months.
- 10 Alternatively, the cells may be trypsinized to select for transfected cells and transferred to a fresh plate containing medium supplemented with 2.5 mg/ml of puromycin. Selection must be performed for a minimum period of 8 days. After this period, medium is replaced with normal medium without
- 15 puromycin. 24 hours the retrovirus-containing supernatant is collected by replacing the medium with fresh culture medium. Supernatant is centrifuged at 3000xg and stored in aliquots at -80°C.
- The arrayed retrovirus libraries described above can be used
- 20 in disease relevant cellular assays to screen for knock-down induced phenotypes. Also these retroviral sRNA expression libraries can be used to generate collections of cell lines with individual or multiple genes that are stably knocked-down.
- 25 The individual knockdown retroviruses, like the other vector-based members of the aforesaid libraries, can be pooled to various degrees, that is in one large pool of retroviruses, or subsets of such retrovirus pool. The sets and subsets of pools can then be used in disease relevant assays where the
- 30 phenotype is a selectable phenotype such as a flow cytometric

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

phenotype (e.g. induction or repression of marker) or growth advantage phenotype.

Example 15 siRNA To Suppress Expression Of Exogenous Genes During Virus Production.

- 5 Non-limiting examples using siRNA to knock down expression of exogenous genes during adenovirus and retrovirus production are presented below.

Adenovirus Production:

- 10 The unique sequences between the transcription start of the CMV promoter and the polylinker of the adenoviral vector pIPspAdapt 6 are used to down-modulate genes. These sequences are always part of the transcribed mRNA and independent of the sequence of the toxic protein and are depicted below (SEQ ID NO: 97)

- 15 5'-TCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTGGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGAACGGTGCAATGGAAGCTTGGTACCGGTGAATTCGGCGCGCC-3'

- Alternatively, unique nucleic acid sequences in the mRNA encoding the toxic protein can be used as target sequences for
 20 knock-down constructs. Polynucleotide sequences of the invention targeted against these sequences or a vector encoding the polynucleotide sequences are co-transfected with the viral plasmid(s) into the packaging cells to suppress exogenous protein production. Alternatively, the
 25 polynucleotide sequences of the invention, or a vector encoding the polynucleotide sequences, can be stably integrated into the packaging cells.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

Production of retrovirus:

The retroviral vector containing the exogenous gene contains a packaging signal surrounded by two splice sites, the splice donor site and the splice acceptor site. Replication of the

5 viral RNA requires the transcription of the full vector. However, the packaging signal is spliced out to produce mRNA before protein production. To allow replication of the viral RNA, but suppress expression of the exogenous gene, the sequences adjacent to the splice donor site and splice

10 acceptor site are used as a target for the polynucleotide sequences of the invention. The first sequence of said polynucleotide sequence consists of the complement of these two portions that are covalently linked and that form a unique sequence in the mRNA coding for the toxic protein. The first

15 portion is complementary to about 9 to 11 nucleotides of the sequence upstream of the splice donor sequence, and the second portion is complementary to about 9 to 11 nucleotides of the sequence downstream of the splice acceptor sequence. When the RNA is spliced to produce a mRNA, the sequence upstream of the

20 splice donor site and the sequence downstream of the splice acceptor site are joined together and will become the target complementing the above described polynucleotide thereby providing for the degradation and knock-down of the spliced mRNA sequence. The unspliced proviral RNA sequence will not

25 be knocked-down, as the two target sequences are not linked.

Again, the polynucleotide sequences as described above or a vector encoding the polynucleotide sequences are co-transfected with the viral plasmid(s) into the packaging cells to suppress exogenous protein production. Alternatively, the

30 polynucleotide sequences can be stably integrated into the packaging cells.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

It is apparent that many modifications and variations of this invention as hereinabove set forth may be made without departing from the spirit and scope thereof. The specific embodiments are given by way of example only and the invention
5 is limited only by the terms of the appended claims.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

We claim:

1. An isolated polynucleotide useful for the down regulation or degradation of a specific RNA molecule in a host cell, comprising a first polynucleotide sequence consisting of
5 about 17 to about 23 nucleotides and complementary to about 17 to about 23 nucleotides of said RNA sequence in said host cell, said first sequence covalently linked to a second sequence capable of forming a stem-loop structure when said second sequence is an RNA sequence,
10 wherein said first sequence consists essentially of a RNA sequence, or a single stranded DNA equivalent thereof.
2. A polynucleotide of claim 1, comprising further a third sequence complementary to said first sequence and covalently linked to the distal end of said second
15 sequence.
3. A polynucleotide of claims 1 or 2, wherein said second sequence is capable of forming a stem-loop structure within said second sequence.
4. A polynucleotide of claims 2 or 3, wherein all
20 nucleotides in said first and third sequences base pair.
5. A polynucleotide of claims 1 to 4, wherein said second sequence contains at least one nucleotide sequence capable of being cleaved enzymatically.
6. A polynucleotide of claim 5, having at least two
25 enzymatic cleavage sites.
7. A polynucleotide of claims 5 or 6, wherein at least one of said enzymatic cleavage sites is located in the stem portion of said stem-loop structure.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

8. A polynucleotide of claims 5 to 7, wherein at least one enzymatic cleavage site is inserted between said first sequence and said second sequence.
- 5 9. A polynucleotide of claims 1 to 8, wherein the function of the expression products associated with said first sequence is unknown.
10. A polynucleotide of claims 1 to 9, wherein said first sequence is about 19 to about 21 nucleotides in length.
- 10 11. A self complementing single-stranded polynucleotide useful for the down regulation or degradation of RNA in a host cell, comprising a first polynucleotide sequence consisting of about 17 to about 23 nucleotides and complementary to about 17 to about 23 nucleotides of said RNA sequence in said host cell, and a third nucleotide
15 sequence covalently linked by a second nucleotide sequence capable of forming a stem-loop structure when said second sequence is an RNA sequence, and such that all nucleotides in said first sequence and said third
20 sequence are capable of base pairing with each other, wherein said second nucleotide sequence comprises a stem-loop forming region that comprises a sequence derived from naturally occurring RNA sequences and that does not functionally target a specific RNA molecule in a host cell.
- 25 12. A polynucleotide of claims 1 to 11, wherein said second sequence is derived from naturally occurring RNA sequences other than mRNA and is about 4 to about 30 nucleotides in length.
- 30 13. A polynucleotide of claims 1 to 12, wherein said second sequence is about 4 to about 13 nucleotides.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

14. A polynucleotide of claims 2 to 13, further comprising a fourth nucleotide sequence comprising an RNA sequence or a single stranded DNA equivalent thereof, said fourth sequence covalently linked to said free end of said first or third sequence, wherein said RNA sequence is capable of being cleaved enzymatically in the host cell resulting in a free end of said first or third sequences.
15. A polynucleotide of claim 14, further comprising a fifth nucleotide sequence comprising an RNA sequence or a single stranded DNA equivalent thereof, said fifth sequence covalently linked to said free end of said first or third sequence, wherein said RNA sequence is capable of being cleaved enzymatically in the host cell resulting in a free end of said first or third sequences.
16. A DNA sequence according to claims 14 or 15, wherein said fourth sequence functions to permit the directional cloning thereof into a vector.
17. A vector useful for transfecting host cells comprising a polynucleotide of claim 1 to 16, and a promoter sequence positioned upstream of said first sequence.
18. A vector of claim 17, wherein said promoter is a microRNA promoter, preferably said promoter is a let-7 promoter.
19. A vector of claims 17 or 18, wherein said promoter is a promoter recognized by RNA Polymerase III, preferably said promoter is selected from the group consisting of 5S rRNA, tRNAs, VA RNAs, Alu RNAs, H1, or U6 small nuclear RNA.
20. A vector according to claims 17 to 19, wherein said polynucleotide consists of DNA covalently linked to an adenoviral genome sequence.

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

21. A method for reducing the amount of at least one RNA
sequence present in a host cell comprising transfecting
said cell with a polynucleotide according to claims 1 to
16 or a vector encoding said polynucleotide, wherein said
5 first sequence is complementary with said RNA sequence.
22. A method for preparing a self-complementing single
stranded polynucleotide including complementary sequences
covalently linked by a polynucleotide sequence forming a
stem loop structure, comprising treating a single
10 stranded polynucleotide consisting essentially of a first
polynucleotide sequence covalently linked to a second
polynucleotide sequence that includes at least two
nucleotide sequences capable of complementary base
pairing and thereby forming a stem-loop structure and
15 that has a 3' OH terminus, under conditions such that
said first sequence serves as a template starting at the
3' OH terminus for the synthesis of a complementary
sequence thereto.
23. A method of preparing a vector including the sequence of
20 a polynucleotide according to claims 1 to 13, wherein
said polynucleotide is a DNA sequence and further
comprises a fourth sequence linked to the free end of
said first sequence, and wherein said polynucleotide is
denatured, converted into a double stranded
25 polynucleotide, and ligated into a vector capable of
transfecting a host cell and transcribing said
polynucleotide.
24. A method of determining the function of a naturally
occurring polynucleotide sequence comprising transfecting
30 a host cell with a vector according to claims 17 to 20,
said vector including a polynucleotide sequence

WO 03/020931

PCT/EP02/09670

complementary to said naturally occurring polynucleotide
and detecting a change in cellular phenotype.

25. A library of vectors comprising expressible
polynucleotide sequence according to claims 1 to 16, and
5 a promoter sequence operably linked to said sequence.
26. A library according to claim 25 wherein said vectors are
viral vectors.
27. A library according to claim 26 wherein said vectors are
selected from a group consisting of AAV, Lentivirus or
10 Retrovirus
28. A library according to claim 26 wherein said vectors are
adenoviral vectors, preferably said adenoviral vectors
are replication defective.
29. A cell stably transfected with a polynucleotide according
15 to claims 1 to 16 or a vector according to claims 17 to
20, preferably said cell is a PER.C6 cell.
30. A method of producing viral vectors encoding a toxic
protein comprising
- 20 (a) introducing into a cell a polynucleotide sequence
according to claims 1 to 16 and having a first
sequence that is complementary to a unique sequence
included in the mRNA sequence coding for said toxic
protein,
- (b) introducing said viral vector into said cell,
- 25 (c) culturing said cells under conditions allowing
expression of said polynucleotide sequence and
replication of said viral vector, and

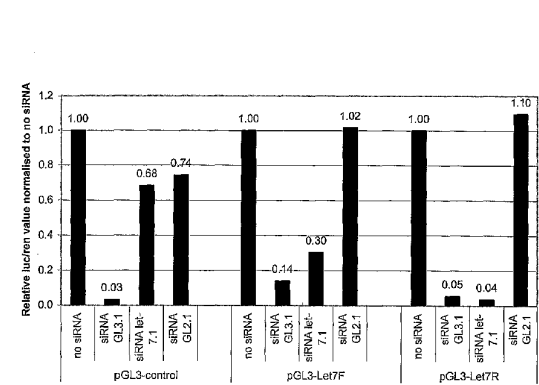
WO 03/020931

PCT/EP02/09670

(d) recovering said viral vectors.

31. A method according to claim 30, wherein said cell is a viral packaging cell that is stably transfected with said polynucleotide.
- 5 32. A method of lowering the amounts of specific RNA or protein translated from RNA in a subject, comprising the administration of a vector according to claims 17 to 22, and transfecting cells in said subject, in an amount effective to lower the amounts of said specific RNA in
- 10 said transfected cells.

Figure 1



WO 03/020931

2/34

PCT/EP02/09670

Figure 2

5' extension	let7-antisense	loop	let7-sense	3' extension
NT_011523.4 H s22_11680 Homo sapiens chromosome 22				
TTTGGGG.	TGAGGTAGTAGGTT GTATAGT	TTGGGGCTGTGCCCTGC TATGGGATA	ACTATACAATCTAC TGTCTTT	CCTGAA
NT_009215.3 H s11_9372 Homo sapiens chromosome 11				
TCCAGGT.	TGAGGTAGTAGGTT GTATAGT	TTAGAATTACATCAAGG GAGATA	ACTGTACAGCCTCC TAGCTTT	CCTGGG
NT_025808.2 Hs9_25964 Homo sapiens chromosome 9				
GTGGGA.	TGAGGTAGTAGGTT GTATAGT	TTTAGGGTCACACCCAC CACTGGGAGATA	ACTATACAATCTAC TGTCTTT	CCTAAC
NT_025808.2 H s9_25964 Homo sapiens chromosome 9, A				
TTGCTCTATCA GAG.	TGAGGTAGTAGGTT GTATAGT	TGTGGGGTAGTGATTTT ACCCGTGTCAGGAGATA	ACTATACAATCTAT TGCCCTT	CCCTGAGGA GTAG
NT_011512.3 Hs21_11669 Homo sapiens chromosome 21; 21 D				
GTGTGATCC GGGT.	TGAGGTAGTAGGTT GTATAGT	TTAGAGTTACACCCCTGG GGTTA	ACTGTACAACCTTC TAGCTT	TCCTTGAG CACAC
NT_011799.5 H sX_11956 Homo sapiens chromosome X; X B				
GTGCTCTGTGG GA	TGAGGTAGTAGGTT GTATAGT	TTTAGGGTCATACCCCA TCTGGGAGATA	ACTATACAGTCTAC TGTCTT	TCCCACGGT GGTAC
NT_011091.5 H s19_11248 Homo sapiens chromosome 19; 19 C				
CCTGCCGGGCC CCCCGGGC	TGAGGTAGGAGGTT GTATAGT	TGAGGAGGACCCCAAG GAGATC	ACTATACGGCCTCC TAGCTT	TCCCCAGGC TGGCCCTG CAGGGGACG GGCCCCGGC GGG

Figure 3

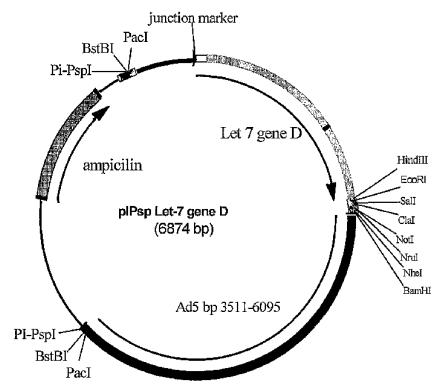


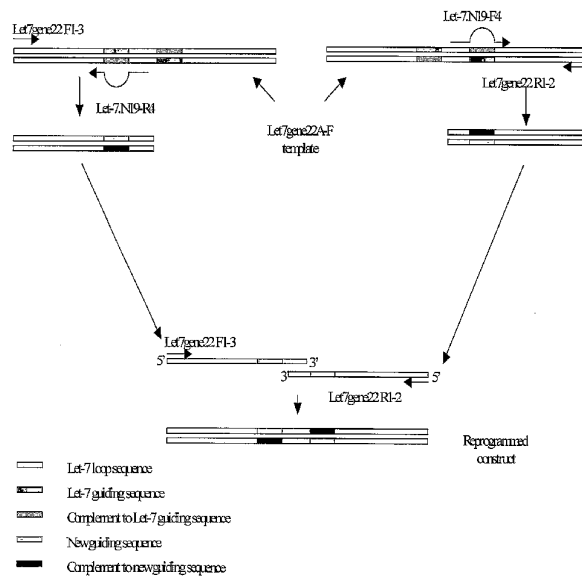
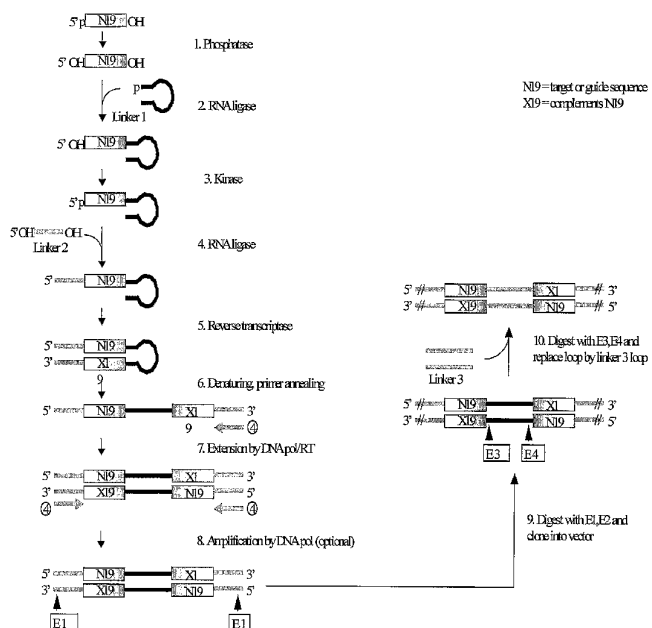
Figure 4

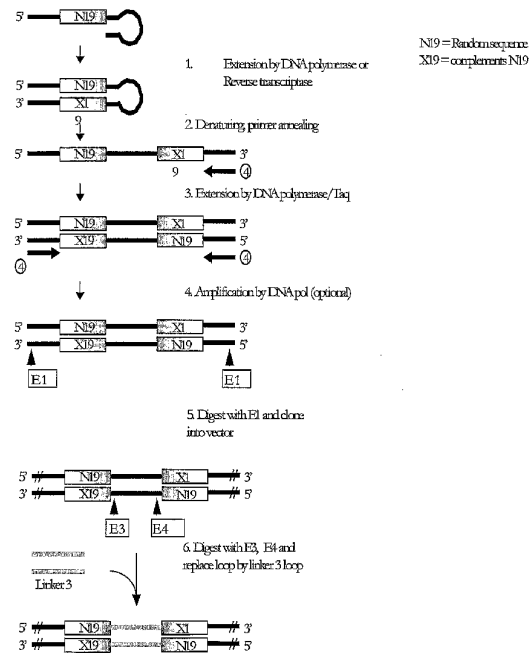
Figure 5

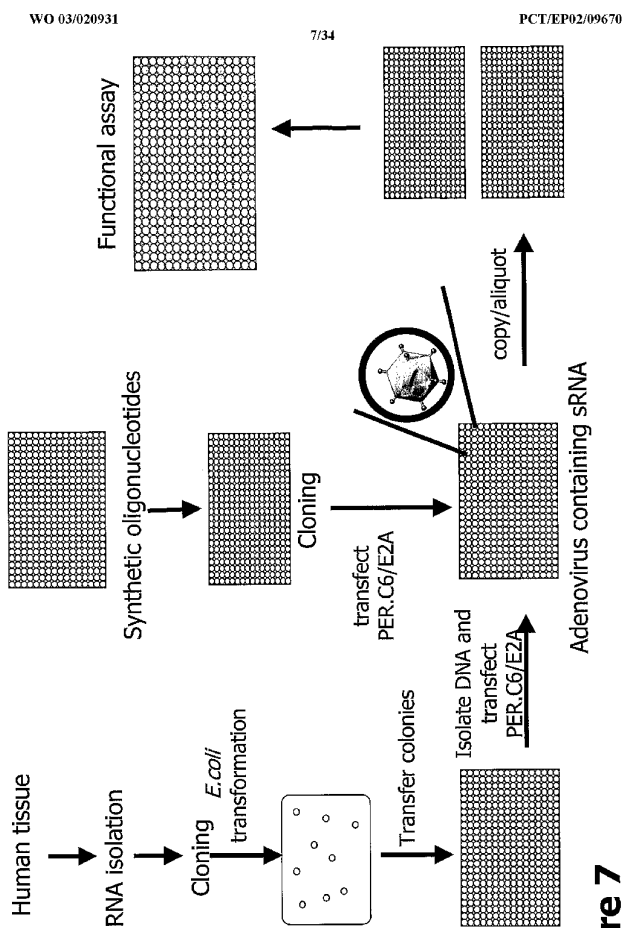


WO 03/020931

6/34

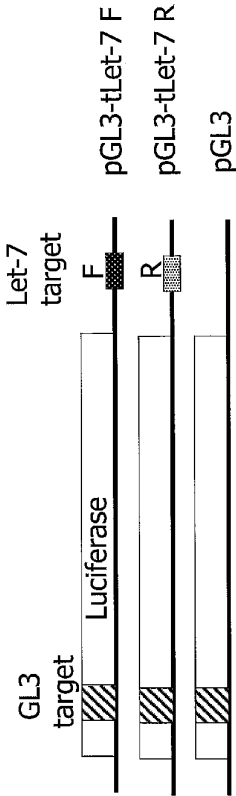
PCT/EP02/09670

Figure 6

**Figure 7**

The reporter system

Reporter constructs



RNAs

1. siRNA-GL3.1
siRNA-Let-7.1
2. Loop RNA-GL3.2
Loop RNA-Let-7.2

Figure 8

Results
RNA co-transfection

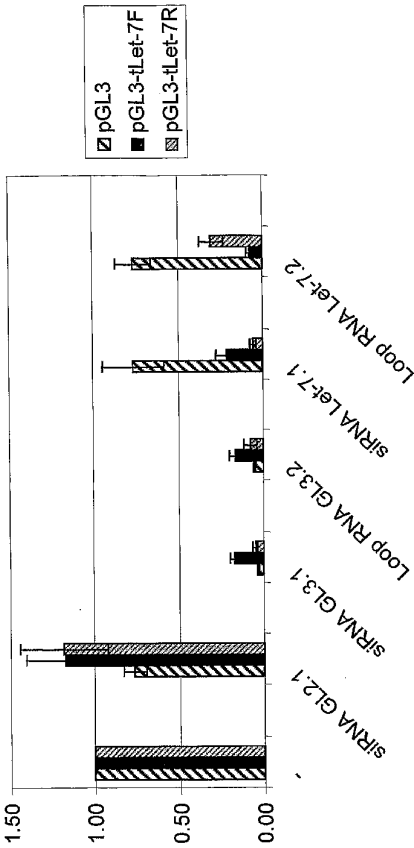


Figure 9

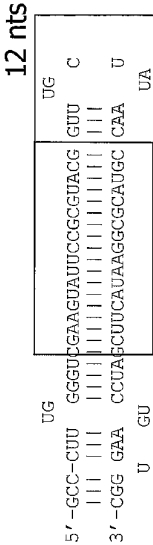
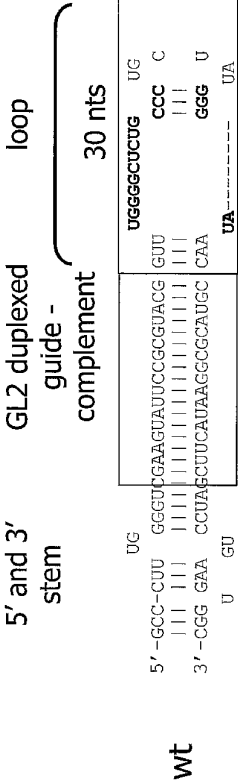
Let-7 RNA secondary structures

Let7-gGL2-loop 12

WO 03/020931

10/34

PCT/EP02/09670



Loop 12
Figure 10

Adenovirus vector development

Reducing the loop size: miR and Let-7 derived

WO 03/020931

11/34

(223)

JP 2005-501557 A 2005.1.20

PCT/EP02/09670

Name	derived	Loop sequence	loop size (nts)
Let-7 L1:	mir-26b	GT- GTGTGCTGTCC-	15
Let-7 L2:	mir-26b	- GTGTGCTGTCC-	11
Let-7 L3:	mir-28	GT- TTACCTTTCTGA-	16
Let-7 L4:	mir-28	- TTACCTTTCTGA-	12
Let-7 L5:	mir-31	GT- TTGAACTGGGAA-	16
Let-7 L6:	mir-31	- TTGAACTGGGAA-	12
Let-7 L11:	Let7L	GT- TGCTCTGCTA -	14
Let-7 L12:	Let7L	GT- TTGCTATA -	12

Figure 11

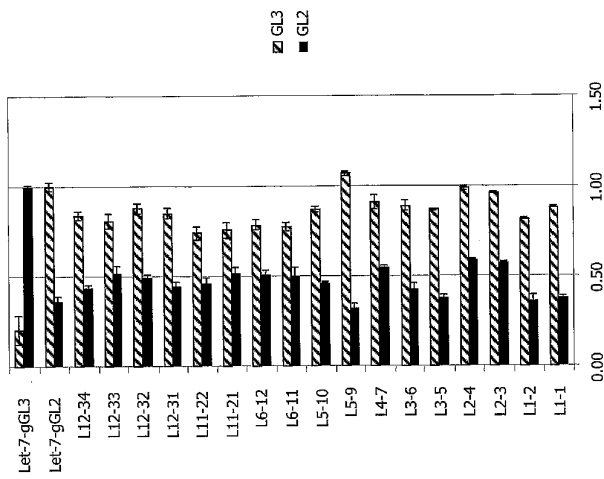
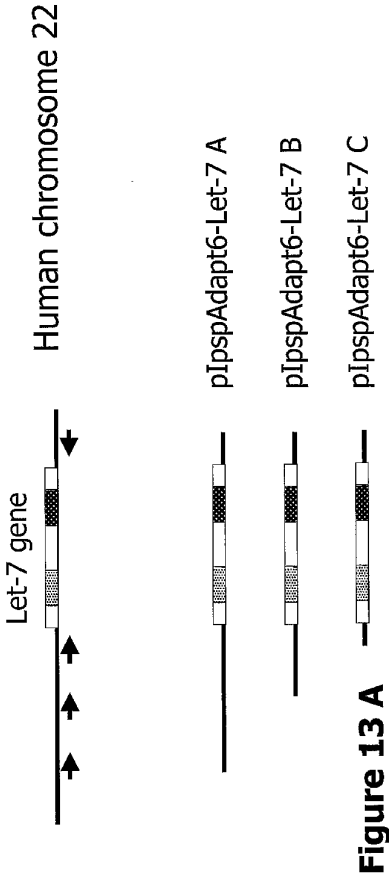


Figure 12

Human Let-7 Genomic constructs



Let-7 gene expression constructs

Reporter constructs and Let-7 plasmids

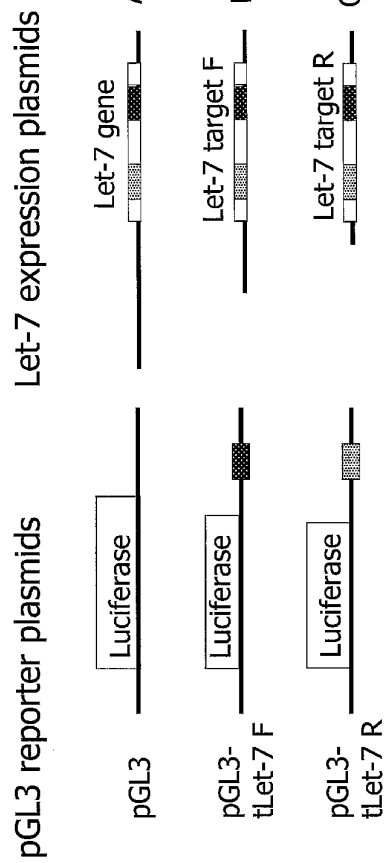


Figure 13 B

Results
Let-7 gene constructs co-transfection

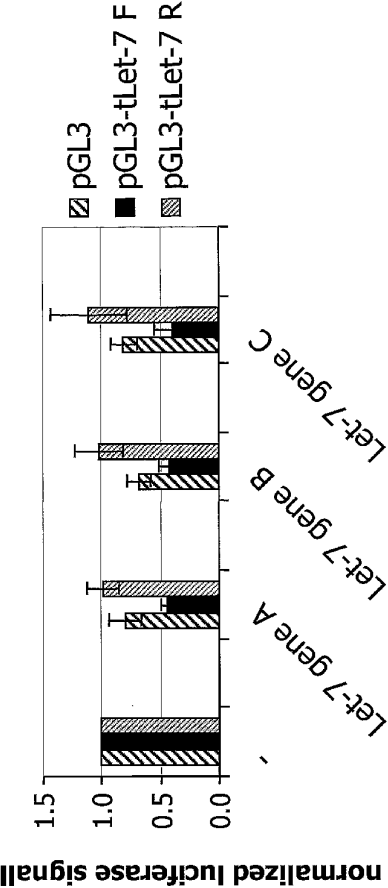


Figure 14

Reprogrammed Let-7 chimeras

Reporter constructs and Let-7 chimeric constructs

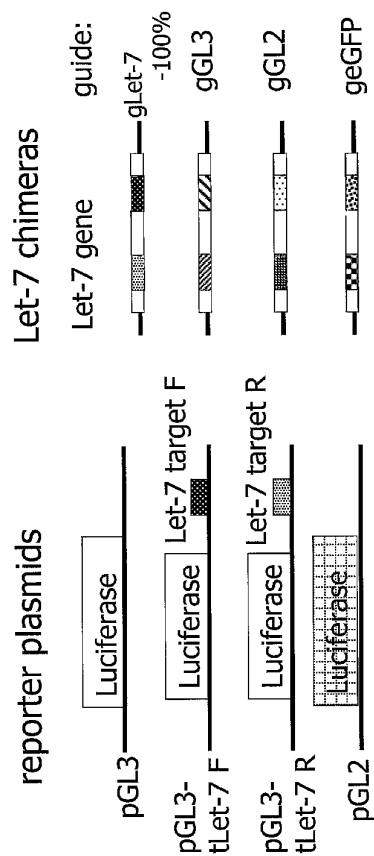


Figure 15

Results
Reprogrammed Let-7 chimeras co-transfection

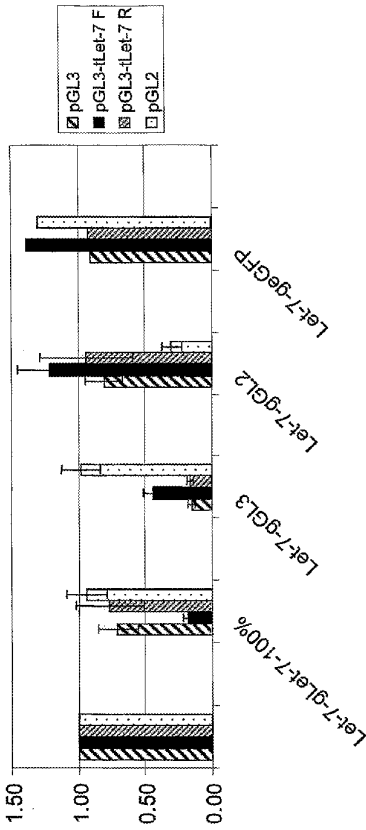


Figure 16

Knock-down RNA expression

Northern analysis

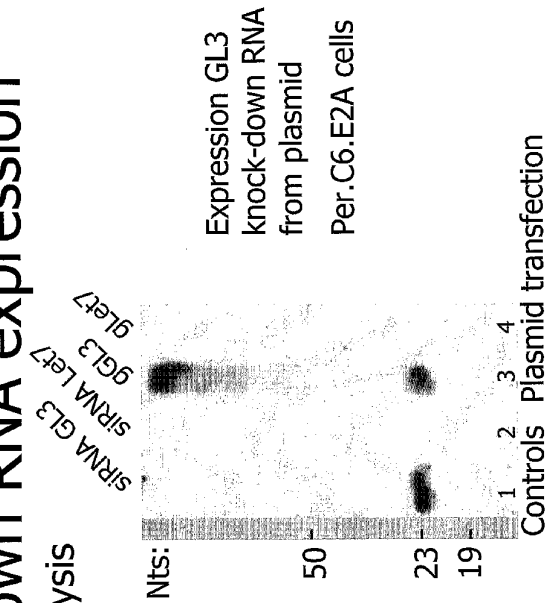


Figure 17

WO 03/020931

19/34

PCT/EP02/09670

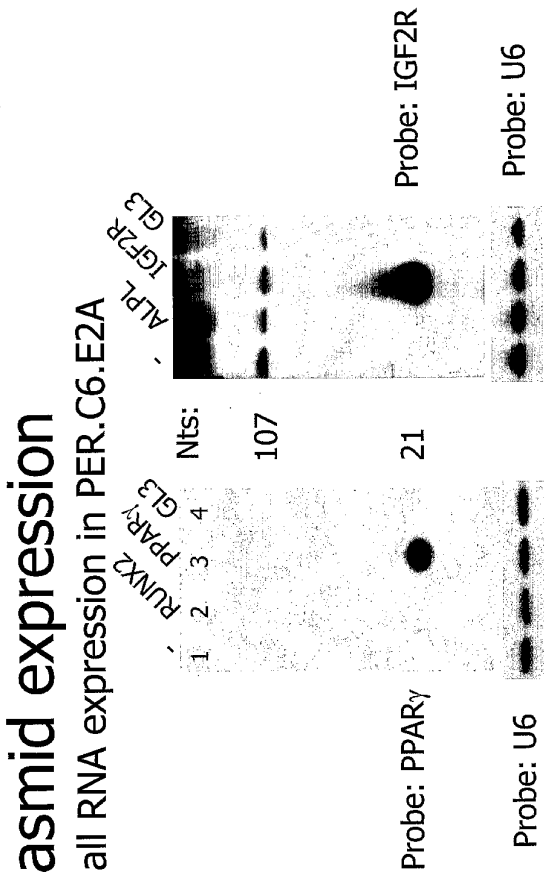


Figure 18

Promoter variants

WO 03/020931

20/34

PCT/EP02/09670

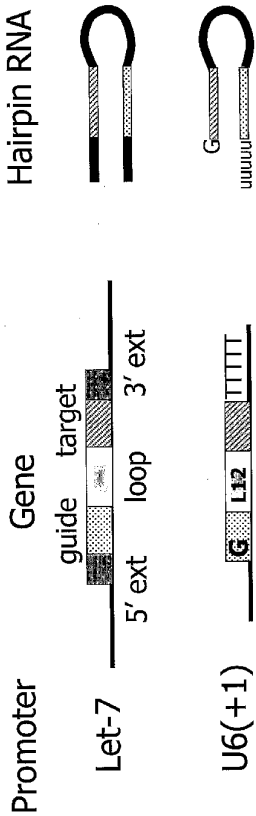


Figure 19

WO 03/020931

21/34

PCT/EP02/09670



Figure 20

Promoter variants
Plasmid transfection

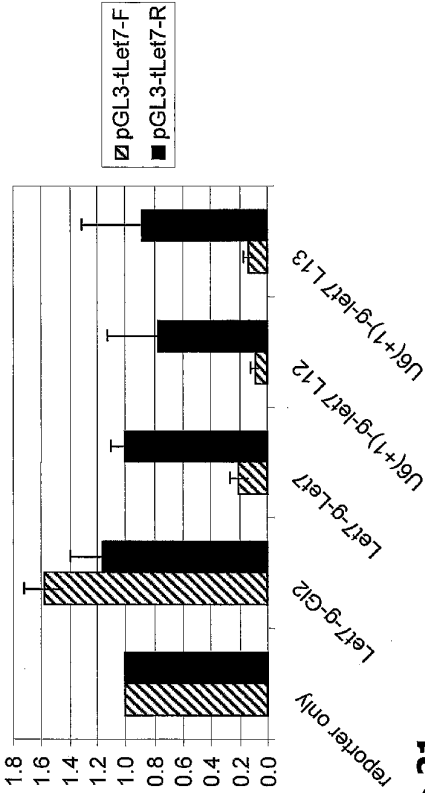


Figure 21

Transfection of Ad-EGFP
super-infection with adenoviruses

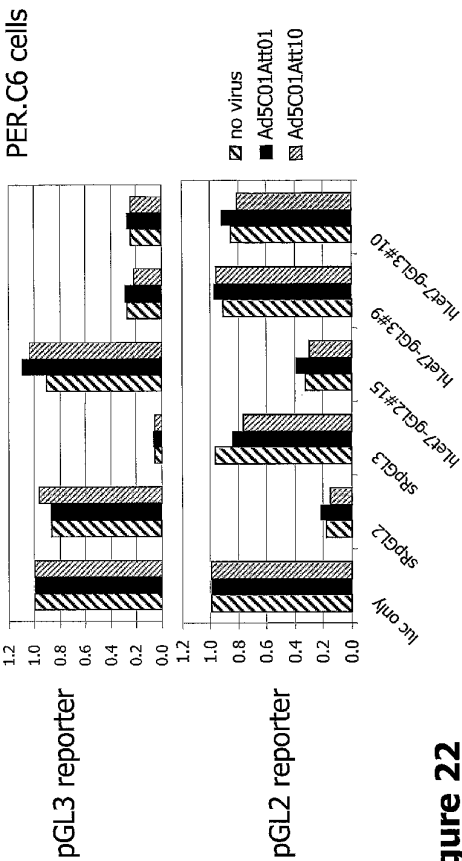
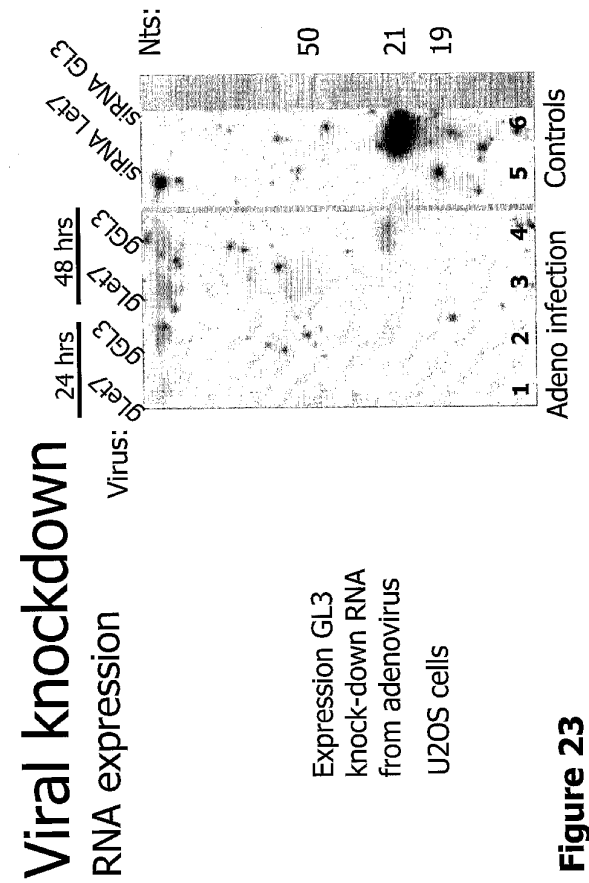


Figure 22



Viral knock-down
Co-infection of adenoviral reporter constructs

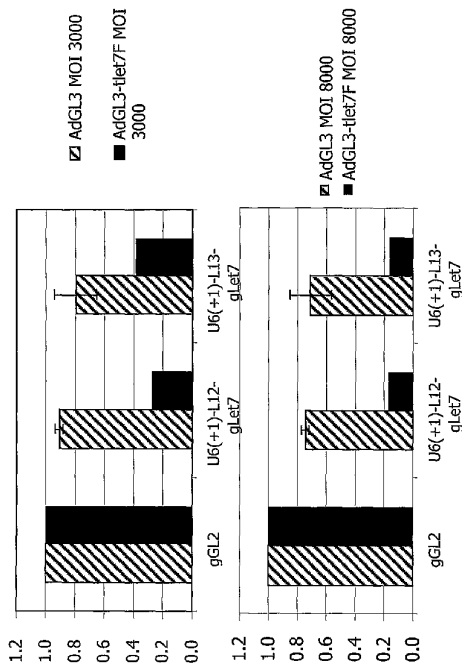


Figure 24

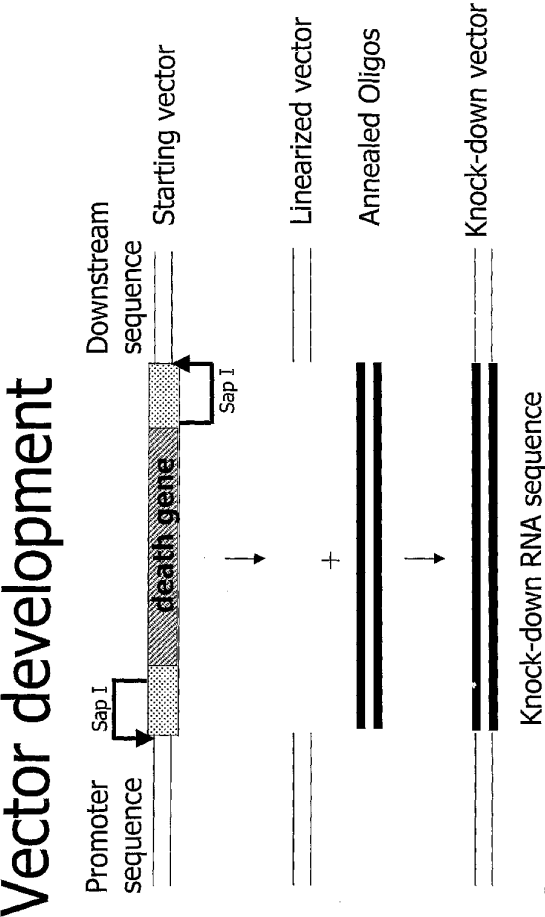


Figure 25 A

[illegible]

Figure 25 B Option 1

Sap I: GCTCTTC (N)^{1/4}

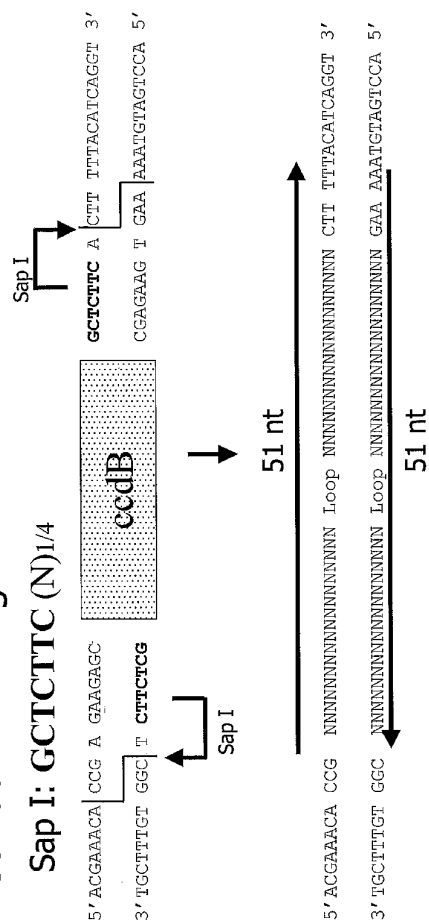


Figure 26 Option 2

Viral knock-down endogenous
target Real Time PCR

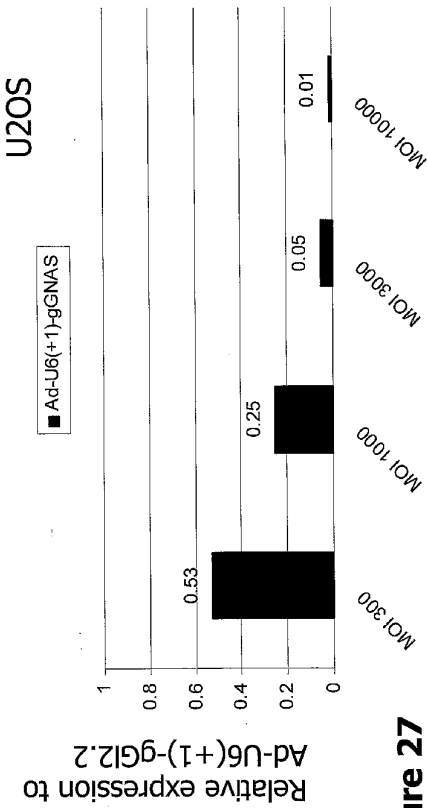
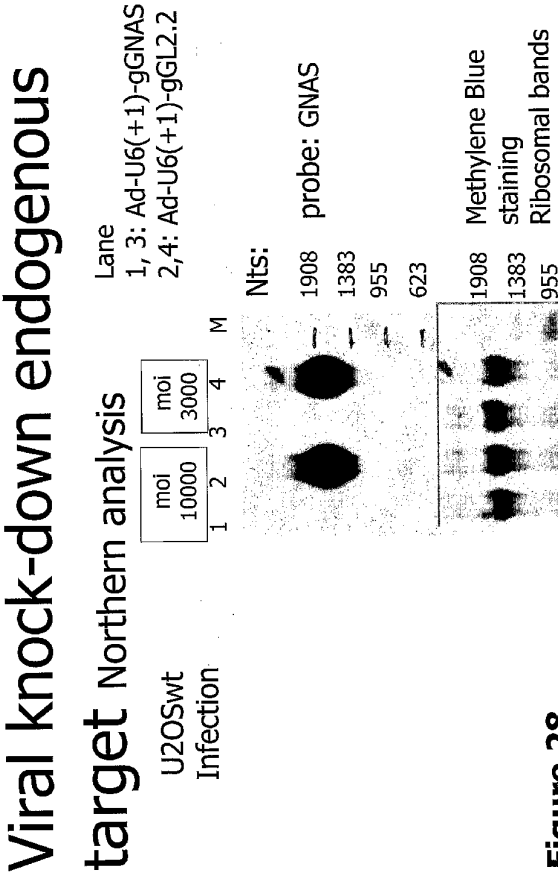


Figure 27

WO 03/020931

30/34

PCT/EP02/09670



Relative expression in U2OSwt
24h post infection

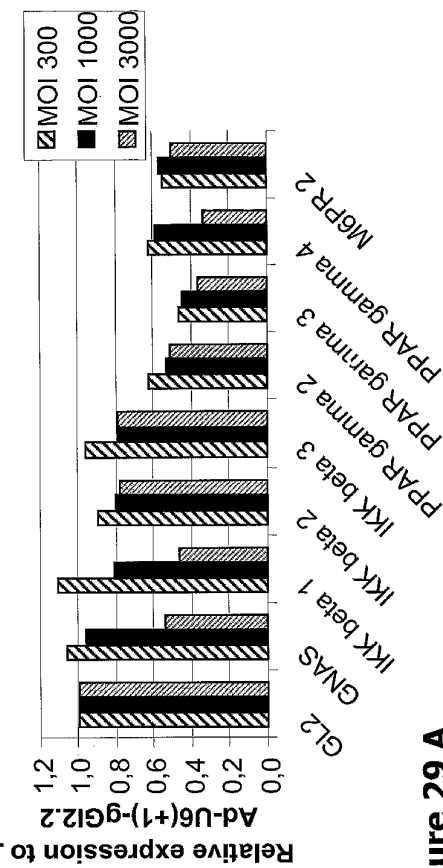


Figure 29 A

Relative expression in U2OSwt
48h post infection

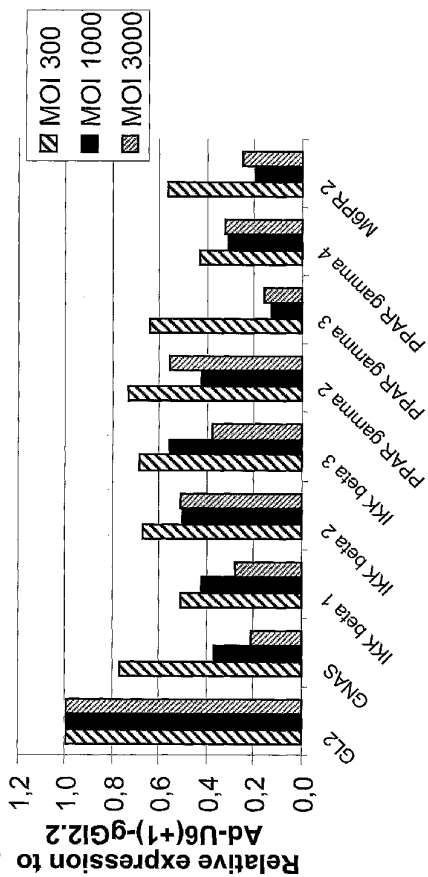


Figure 29 B

Relative expression in U2OSwt
144h post infection

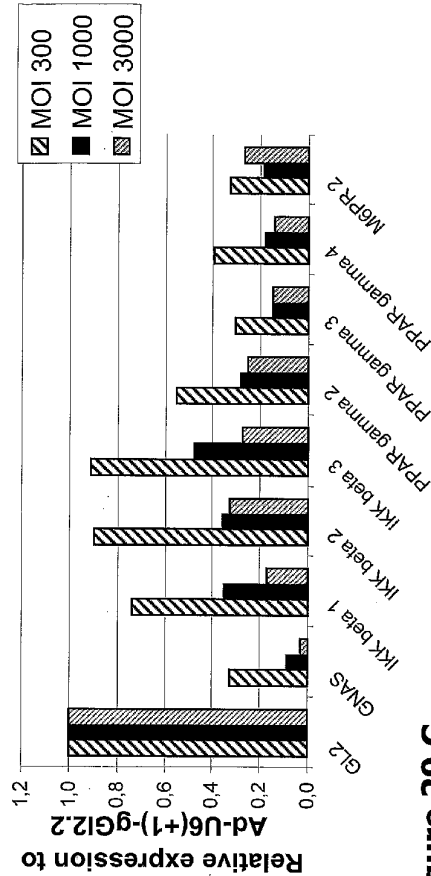


Figure 29 C

Functional knock-down of GNAS

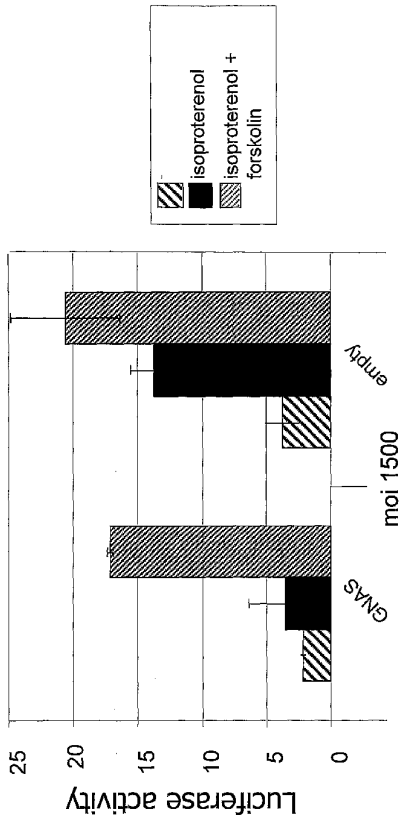


Figure 30

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 March 2003 (13.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/020931 A3(51) International Patent Classification: C12N 15/11,
5/10, 7/00, A61K 31/713

(21) International Application Number: PCT/EP02/09670

(22) International Filing Date: 29 August 2002 (29.08.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/317,229 1 September 2001 (01.09.2001) US
60/385,733 4 June 2002 (04.06.2002) US(71) Applicant (for all designated States except US): GALA-
PAGOS GENOMICS N.V. (BE/BF); Generaal de Witte-
laan 11 A3, B-2800 Mechelen (BE).

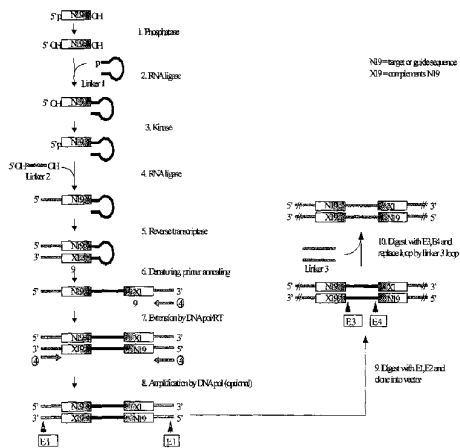
(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ARTS, Gert-Jan

[NL/NL]: Wilkestraat 46, NL-2403 ES Alphen AD Rijn
(NL). **LANGEMEIJER, Ellen, Vera** [NL/NL]; Simon-
straat 87, NL-2628 TG Delft (NL). **PIEST, Ivo** [NL/NL];
Waverbancken 16, NL-3645 VS Vinkeveen (NL). **VAN ES,**
Helmuth, Hendrikus, Gerardus [NL/NL]; Breestraat 18,
NL-2011 ZZ Haarlem (NL). **MICHELIS, Godefridus,**
Augustinus, Maria [NL/NL]; Vronckelaan 12, NL-2352
EP Leiderdorp (NL).(74) Agent: HOOVELD, Arjen, J., W.; Amold & Siedsma,
Sweelinckplein 1, NL-2517 GK The Hague (NL).(81) Designated States (national): AL, AG, AL, AM, AI, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, GR, GU, 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, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[Continued on next page]

(54) Title: SIRNA KNOCKOUT ASSAY METHOD AND CONSTRUCTS

(57) Abstract: The present in-
vention relates to polynucleotide
constructs, methods for their
preparation, and preparations
for their use in methods that
lower the amount of RNA
and/or protein production in
cells based on the intracellular
expression of small interfering
polyribonucleic acid molecules.

WO 03/020931 A3

WO 03/020931 A3 

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(88) Date of publication of the international search report:
20 November 2003

Published:
with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/09670
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/11 C12N5/10 C12N7/00 A61K31/713		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N A61K		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HUTVAGNER GYORGY ET AL: "A cellular function for the RNA-interference enzyme dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA," SCIENCE (WASHINGTON D C), vol. 293, no. 5531, 3 August 2001 (2001-08-03), pages 834-838, XP002204649 ISSN: 0036-8075	1-4, 10-13, 21,32
Y	page 838, middle column, line 4 - last line ; figure 5	17,20, 23-29
Y	WO 99 64582 A (INTROGENE BV) 16 December 1999 (1999-12-16) cited in the application examples 3,9,16,20 claims ----- -/--	17,20, 23-29
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document but 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 "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 3 September 2003		Date of mailing of the international search report 22/09/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3016		Authorized officer Andres, S.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/09670
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 49035 A (GEN HOSPITAL CORP) 24 August 2000 (2000-08-24) page 11, line 15 - page 14, line 14 claims; figure 1 -----	1-4, 10-13, 17, 21, 22, 29, 32
X	PASQUINELLI AMY E ET AL: "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA." NATURE (LONDON), vol. 408, no. 6808, 2000, pages 86-89, XP002204652 ISSN: 0028-0836 cited in the application the whole document -----	1-3, 10, 21
X	WO 96 29097 A (RES CORP TECHNOLOGIES INC) 26 September 1996 (1996-09-26) page 6 - page 8 page 26, line 6 - line 20 page 52 claims -----	1, 2, 4, 17, 21, 23, 29, 32
A	ELBASHIR SAYDA M ET AL: "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs." GENES & DEVELOPMENT, vol. 15, no. 2, 15 January 2001 (2001-01-15), pages 188-200, XP002204651 ISSN: 0890-9369 -----	
A	MEDINA M F C ET AL: "RNA POLYMERASE III-DRIVEN EXPRESSION CASSETTES IN HUMAN GENE THERAPY" CURRENT OPINION IN MOLECULAR THERAPEUTICS, vol. 1, no. 5, October 1999 (1999-10), pages 580-594, XP001055319 ISSN: 1464-8431 the whole document -----	17-20, 23, 25-28
A	WO 00 52188 A (ELLARD FIONA MARGARET ; KINGSMAN SUSAN MARY (GB); MITROPHANOUS KYRIACO) 8 September 2000 (2000-09-08) page 8 page 22 - page 26 claims; examples -----	30, 31
A	WO 00 11154 A (DONAHUE BRIAN A ; HARDY STEPHEN F (US); CELL GENESYS INC (US); SNYDER) 2 March 2000 (2000-03-02) page 16 - page 18 claims ----- -/--	30, 31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. Application No. PCT/EP 02/09670
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	PADDISON PATRICK J ET AL: "Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells." GENES & DEVELOPMENT, vol. 16, no. 8, 15 April 2002 (2002-04-15), pages 948-958, XP002204653 ISSN: 0890-9369 the whole document	1-4, 10-13, 17-19, 21-24, 29,32
P, X	YU JENN-YAH ET AL: "RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 99, no. 9, 30 April 2002 (2002-04-30), pages 6047-6052, XP002204654 ISSN: 0027-8424 the whole document	1,2,10, 17,19, 21,23, 29,32
P, X	RAYKOV Z ET AL: "Transient suppression of transgene expression by means of antisense oligonucleotides: A method for the production of toxin-transducing recombinant viruses." GENE THERAPY, vol. 9, no. 5, March 2002 (2002-03), pages 358-362, XP002253225 ISSN: 0969-7128 the whole document	30,31
E	WO 03 012082 A (ANDREWS PETER ; AXORDIA LTD (GB); WALSH JAMES (GB); GOKHALE PAUL (GB)) 13 February 2003 (2003-02-13) page 7, line 23 - page 8 page 12, line 29 - page 13, line 2 page 23, line 24 - page 25, line 13 claims figure 3 on page 3/41 of the figures	1-4, 10, 11,17, 21,29,32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		national application No. PCT/EP 02/09670
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 21 (as far as in vivo methods are concerned) and 32 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.	
2. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:	
3. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 8.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:		
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. <input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. <input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest		
<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.		
<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 information on patent family members

 International Application No.
 PCT/JP 02/09670

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9964582	A	16-12-1999	US 6413776 B1 02-07-2002
			AU 756605 B2 16-01-2003
			AU 4294799 A 30-12-1999
			CA 2301403 A1 16-12-1999
			EP 1022335 A1 26-07-2000
			JP 2002526031 T 20-08-2002
			WO 9964582 A2 16-12-1999
			US 2003027170 A1 06-02-2003
			US 2003059794 A1 27-03-2003
			US 6340595 B1 22-01-2002
WO 0049035	A	24-08-2000	AU 3369900 A 04-09-2000
			WO 0049035 A1 24-08-2000
WO 9629097	A	26-09-1996	WO 9629097 A1 26-09-1996
WO 0052188	A	08-09-2000	AU 2926000 A 21-09-2000
			WO 0052188 A1 08-09-2000
WO 0011154	A	02-03-2000	AU 5544499 A 14-03-2000
			CA 2340335 A1 02-03-2000
			EP 1105470 A1 13-06-2001
			JP 2002532058 T 02-10-2002
			WO 0011154 A1 02-03-2000
			US 2002076808 A1 20-06-2002
WO 03012082	A	13-02-2003	WO 03012082 A2 13-02-2003

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,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,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100127638

弁理士 志賀 美苗

(72)発明者 ヘルト・ヤン・アルツ

オランダ、エヌエル - 2 4 0 3 エーエス・アルフェン・アーデー・レイン、ウィッケストラート 4 6 番

(72)発明者 エレン・フェラ・ランヘメイヤー

オランダ、エヌエル - 2 6 2 8 テーヘー・デルフト、シモンズストラート 8 7 番

(72)発明者 イフォ・ピースト

オランダ、エヌエル - 3 6 4 5 ヴェーエス・フィンケフェーン、ワーファーバンケン 1 6 番

(72)発明者 ヘルムート・ヘンドリクス・ヘラルドゥス・ファン・エス

オランダ、エヌエル - 2 0 1 1 ゼットゼット・ハールレム、ブレーストラート 1 8 番

(72)発明者 ホーデフリドゥス・アウグスティヌス・マリア・ミヒエルス

オランダ、エヌエル - 2 3 5 2 エーペー・レイダードルプ、フロンケンラーン 1 2 番

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 CA04 CA11 DA02 EA02 FA02 GA11 HA09

HA17

4B063 QA08 QQ52 QR32 QR35 QR59 QR77 QR80 QS05 QS34 QS38

QX10

4B065 AA90X AB01 BA02 CA44 CA46

4C084 AA13 NA14 ZC021 ZC022