

(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2004-525618

(P2004-525618A)

(43) 公表日 平成16年8月26日(2004.8.26)

(51) Int.Cl.⁷

C 1 2 N 15/09

A 6 1 K 48/00

C 1 2 N 5/10

F I

C 1 2 N 15/00

A 6 1 K 48/00

C 1 2 N 5/00

C 1 2 N 5/00

Z N A A

B

C

テーマコード (参考)

4 B O 2 4

4 B O 6 5

4 C O 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 326 頁)

(21) 出願番号 特願2002-555104 (P2002-555104)
 (86) (22) 出願日 平成14年1月8日 (2002.1.8)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年7月4日 (2003.7.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/000416
 (87) 国際公開番号 W02002/053581
 (87) 国際公開日 平成14年7月11日 (2002.7.11)
 (31) 優先権主張番号 09/756,095
 (32) 優先日 平成13年1月8日 (2001.1.8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 09/756,096
 (32) 優先日 平成13年1月8日 (2001.1.8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 09/756,097
 (32) 優先日 平成13年1月8日 (2001.1.8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 503243139
 イントロン, インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国 027606 ノースカ
 ロライナ州, ローリィ, メイン キャンパ
 ス ドライブ 840, スイート 350
 O
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 スプライセオソームにより媒介されるRNAトランススプライシング

(57) 【要約】

本発明の分子および方法は、所定のサブセットの細胞においてトランススプライシングされた分子をin vivo作製するための手段を提供する。本発明のプレトランススプライシング分子は、該プレトランススプライシング分子と、特定の標的細胞で特異に発現されるプレmRNAと、の間のトランススプライシング反応の基質となる。このin vivoトランススプライシング反応は、mRNAとして機能するか、または標的細胞で発現されるタンパク質をコードする新規なmRNAを提供する。このmRNAの発現産物は細胞または宿主生物に治療上有用なタンパク質、特定の細胞を死滅させる毒素、またはこのような細胞には通常存在しない新規なタンパク質である。本発明はさらに、エキソントグ付け法を用いてプレmRNA分子のエキソン／イントロン境界を同定するために遺伝子操作されたPTMを提供する。本発明のPTMはまた、特定の細胞型で発現されたタンパク質の精製および同定に使用できるペプチドアフィニティー精製タグをコードするキメラRNAの産生をもたらすようにデザインすることもできる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核酸分子を含んでなる細胞であって、該核酸分子が、

- a) 10～600ヌクレオチド長であり、細胞内で発現された標的プレmRNAに該核酸分子の結合をターゲットする1以上の標的結合ドメイン；
 - b) 分岐点、ピリミジントラクトおよび3' スプライス受容部位を含む3' スプライス領域；
 - c) 3' スプライス領域を標的結合ドメインから分離するスペーサー領域；および
 - d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
- を含んでなり、該核酸分子は細胞内の核スプライシング成分により認識されるものである、上記細胞。

10

【請求項 2】

核酸分子を含んでなる細胞であって、該核酸分子が、

- a) 10～600ヌクレオチド長であり、細胞内で発現された標的プレmRNAに該核酸分子の結合をターゲットする1以上の標的結合ドメイン；
 - b) 5' スプライス部位；
 - c) 5' スプライス部位を標的結合ドメインから分離するスペーサー領域；および
 - d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
- を含んでなり、該核酸分子は細胞内の核スプライシング成分により認識されるものである、上記細胞。

20

【請求項 3】

前記核酸分子が5' 供与部位をさらに含んでなる、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 4】

前記核酸分子が3' スプライス領域の1以上の側に結合する1以上の相補配列を含むセーフティーヌクレオチド配列をさらに含んでなる、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 5】

前記核酸分子が5' スプライス領域の1以上の側に結合する1以上の相補配列を含むセーフティーヌクレオチド配列をさらに含んでなる、請求項 2 に記載の細胞。

【請求項 6】

前記核酸分子が翻訳可能なタンパク質産物をコードする配列をさらに含んでなる、請求項 1 に記載の細胞。

30

【請求項 7】

前記核酸分子が翻訳停止コドンを含むヌクレオチド配列をさらに含んでなる、請求項 1 または 3 に記載の細胞。

【請求項 8】

核酸分子を発現する組換えベクターを含む細胞であって、該核酸分子が、

- a) 10～600ヌクレオチド長であり、細胞内で発現された標的プレmRNAに該核酸分子の結合をターゲットする1以上の標的結合ドメイン；
 - b) 分岐点、ピリミジントラクトおよび3' スプライス受容部位を含む3' スプライス領域；
 - c) 3' スプライス領域を標的結合ドメインから分離するスペーサー領域；および
 - d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
- を含んでなり、該核酸分子は細胞内の核スプライシング成分により認識されるものである、上記細胞。

40

【請求項 9】

核酸分子を発現する組換えベクターを含む細胞であって、該核酸分子が、

- a) 10～600ヌクレオチド長であり、細胞内で発現された標的プレmRNAに該核酸分子の結合をターゲットする1以上の標的結合ドメイン；
- b) 5' スプライス部位；
- c) 5' スプライス部位を標的結合ドメインから分離するスペーサー領域；および

50

d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
を含んでなり、該核酸分子は細胞内の核スプライシング成分により認識されるものである、上記細胞。

【請求項 10】

前記核酸分子が5' 供与部位をさらに含んでなる、請求項 8 に記載の細胞。

【請求項 11】

細胞内でキメラRNA分子を生成する方法であって、細胞内で発現された標的プレmRNAと、核スプライシング成分により認識される核酸分子とを、該核酸分子の一部が標的プレmRNAの一部にトランススプライシングされて細胞内でキメラRNAを形成する条件下で接触させることを含んでなり、該核酸分子が、

10

- a) 10～600ヌクレオチド長であり、細胞内で発現された標的プレmRNAに該核酸分子の結合をターゲットする1以上の標的結合ドメイン；
 - b) 分岐点、ピリミジントラクトおよび3' スプライス受容部位を含む3' スプライス領域；
 - c) 3' スプライス領域を標的結合ドメインから分離するスペーサー領域；および
 - d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
- を含んでなる、上記方法。

【請求項 12】

細胞内でキメラRNA分子を生成する方法であって、細胞内で発現された標的プレmRNAと、核スプライシング成分により認識される核酸分子とを接触させることを含んでなり、該核酸分子が、

20

- a) 10～600ヌクレオチド長であり、細胞内で発現された標的プレmRNAに該核酸分子の結合をターゲットする1以上の標的結合ドメイン；
 - b) 5' スプライス部位；
 - c) 5' スプライス部位を標的結合ドメインから分離するスペーサー領域；および
 - d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
- を含んでなり、該核酸分子は細胞内の核スプライシング成分により認識されるものである、上記方法。

【請求項 13】

前記核酸分子が5' 供与部位をさらに含んでなる、請求項 11 に記載の方法。

30

【請求項 14】

前記キメラRNA分子が翻訳可能なタンパク質をコードする配列を含んでなる、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 15】

前記キメラRNA分子が毒素をコードする配列を含んでなる、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 16】

- a) 10～600ヌクレオチド長であり、細胞内で発現された標的プレmRNAに核酸分子の結合をターゲットする1以上の標的結合ドメイン；
 - b) 分岐点、ピリミジントラクトおよび3' スプライス受容部位を含む3' スプライス領域；
 - c) 3' スプライス領域を標的結合ドメインから分離するスペーサー領域；
 - d) 3' スプライス領域の片側または両側に結合する1以上の相補配列を含むセーフティー配列；および
 - e) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
- を含んでなり、細胞内で核スプライシング成分により認識される、核酸分子。

40

【請求項 17】

- a) 10～600ヌクレオチド長であり、細胞内で発現された標的プレmRNAに核酸分子の結合をターゲットする1以上の標的結合ドメイン；
- b) 5' スプライス部位；
- c) 5' スプライス領域を標的結合ドメインから分離するスペーサー領域；

50

d) 5' スプライス領域の片側または両側に結合する1以上の相補配列を含むセーフティー配列；および

e) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
を含んでなり、細胞内で核スプライシング成分により認識される、核酸分子。

【請求項18】

前記核酸分子が5' 供与部位をさらに含んでなる、請求項16に記載の核酸分子。

【請求項19】

前記核酸分子が翻訳可能なタンパク質産物をコードする配列をさらに含んでなる、請求項16または17に記載の核酸分子。

【請求項20】

前記翻訳可能なタンパク質産物が毒素である、請求項16または17に記載の核酸分子。

【請求項21】

核酸分子を発現する発現ベクターであって、該核酸分子が、

a) 10～600ヌクレオチド長であり、細胞内で発現された標的プレmRNAに該核酸分子の結合をターゲットする1以上の標的結合ドメイン；

b) 分岐点、ピリミジントラクトおよび3' スプライス受容部位を含む3' スプライス領域；

c) 3' スプライス領域を標的結合ドメインから分離するスペーサー領域；および

d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；

を含んでなり、該核酸分子は細胞内の核スプライシング成分により認識されるものである、上記発現ベクター。 20

【請求項22】

核酸分子を発現する真核生物発現ベクターであって、該核酸分子が、

a) 10～600ヌクレオチド長であり、細胞内で発現された標的プレmRNAに該核酸分子の結合をターゲットする1以上の標的結合ドメイン；

b) 5' スプライス部位；

c) 5' スプライス領域を標的結合ドメインから分離するスペーサー領域；および

d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；

を含んでなり、該核酸分子は細胞内の核スプライシング成分により認識されるものである、上記真核生物発現ベクター。 30

【請求項23】

前記核酸分子が5' 供与部位をさらに含んでなる、請求項21に記載のベクター。

【請求項24】

前記スプライス部位の片側または両側に結合する1以上の相補配列を含むセーフティー配列をさらに含んでなる、請求項21または22に記載の発現ベクター。

【請求項25】

核酸分子を含んでなる細胞であって、該核酸分子が、

a) 分岐点、ピリミジントラクトおよび3' スプライス受容部位を含む3' スプライス領域；および

b) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；

を含んでなり、該核酸分子は細胞内の核スプライシング成分により認識されるものである、上記細胞。 40

【請求項26】

核酸分子を含んでなる細胞であって、該核酸分子が、

a) 5' スプライス部位；

b) 5' スプライス部位を標的結合ドメインから分離するスペーサー領域；および

c) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；

を含んでなり、該核酸分子が細胞内の核スプライシング成分により認識されるものである、上記細胞。

【請求項27】

10

20

30

40

50

前記核酸分子が5' 供与部位をさらに含んでなる、請求項 2 5 に記載の細胞。

【請求項 2 8】

標的プレ mRNA にトランススプライシングされるヌクレオチド配列がヌクレオチド配列タグを含んでなる、請求項 2 5 または 2 6 に記載の細胞。

【請求項 2 9】

核酸分子を発現する組換えベクターを含んでなる細胞であって、該核酸分子が、

- a) 分岐点、ピリミジントラクトおよび3' スプライス受容部位を含む3' スプライス領域；および
 - b) 標的プレ mRNA にトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
- を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである 10、上記細胞。

【請求項 3 0】

核酸分子を発現する組換えベクターを含んでなる細胞であって、該核酸分子が、

- a) 5' スプライス部位；および
 - b) 標的プレ mRNA にトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
- を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記細胞。

【請求項 3 1】

前記核酸分子が5' 供与部位をさらに含んでなる、請求項 2 9 に記載の細胞。

【請求項 3 2】

細胞内でキメラ RNA 分子を作製する方法であって、細胞内で発現された標的プレ mRNA と、核スプライシング成分により認識される核酸分子とを、該核酸分子の一部が細胞内で標的プレ mRNA の一部にトランススプライシングされてキメラ RNA を形成する条件下で接触させることを含んでなり、該核酸分子が、

- a) 分岐点、ピリミジントラクトおよび3' スプライス受容部位を含む3' スプライス領域；および
 - b) 標的プレ mRNA にトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
- を含むものである、上記方法。

【請求項 3 3】

細胞内でキメラ RNA 分子を作製する方法であって、細胞内で発現された標的プレ mRNA と、核スプライシング成分により認識される核酸分子とを、接触させることを含んでなり、該核酸分子が、 30

- a) 5' スプライス部位；および
 - b) 標的プレ mRNA にトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
- を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記方法。

【請求項 3 4】

前記核酸分子が5' 供与部位をさらに含んでなる、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記キメラ RNA 分子がヌクレオチド配列タグをさらに含んでなる、請求項 3 2 に記載の方法。 40

【請求項 3 6】

核酸分子を発現する真核生物発現ベクターであって、該核酸分子が、

- a) 分岐点、ピリミジントラクトおよび3' スプライス受容部位を含む3' スプライス領域；および
 - b) 標的プレ mRNA にトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
- を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記発現ベクター。

【請求項 3 7】

核酸分子を発現する真核生物発現ベクターであって、該核酸分子が、

a) 5' スプライス部位；および

b) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；

を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記発現ベクター。

【請求項 38】

前記核酸分子が5' 供与部位をさらに含んでなる、請求項 36 に記載のベクター。

【請求項 39】

核酸分子を発現する組換え発現ベクターを含んでなる発現ライブラリーであって、該核酸分子が、

a) 分岐点、ピリミジントラクトおよび3' スプライス受容部位を含む3' スプライス領域 10
；および

b) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；

を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記発現ライブラリー。

【請求項 40】

核酸分子を発現する組換え発現ベクターを含んでなる発現ライブラリーであって、該核酸分子が、

a) 5' スプライス部位；および

b) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；

を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである 20
、上記発現ライブラリー。

【請求項 41】

前記核酸分子が5' 供与部位をさらに含んでなる、請求項 39 に記載の発現ライブラリー。

【請求項 42】

標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列がヌクレオチド配列タグを含んでなる、請求項 39 または 40 に記載の発現ライブラリー。

【請求項 43】

プレmRNA分子におけるエクソン-イントロン境界をマッピングする方法であって、

(i) 核酸分子と標的プレmRNA分子とを、該核酸分子の一部が標的プレmRNAの一部にトランス 30
スプライシングされてキメラmRNAを形成する条件下で接触させ；

(ii) 該キメラmRNA分子を増幅し；

(iii) 増幅した分子を選択的に精製し；さらに

(iv) 増幅した分子のヌクレオチド配列を決定し、それによりイントロン-エクソン境界を 40
同定する；

ことを含んでなる、上記方法。

【請求項 44】

a) 標的プレmRNAにプレトランススプライシング分子の結合をターゲットする2以上の標的 40
結合ドメイン；

b) 分岐点、ピリミジントラクト、ならびに3' スプライス受容部位および5' スプライス 40
供与部位を含む3' スプライス領域；

c) 3' スプライス領域および5' スプライス供与部位を標的結合ドメインから分離するス 40
ペーサー領域；および

d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；

を含んでなり、細胞内で核スプライシング成分により認識される、核酸分子。

【請求項 45】

前記スペーサー領域が3' スプライス領域および5' スプライス供与部位を標的結合ドメ 40
インから離す、請求項 44 に記載の核酸分子。

【請求項 46】

翻訳可能なタンパク質産物をコードする配列をさらに含んでなる、請求項 44 に記載の核 50

酸分子。

【請求項 47】

翻訳可能なタンパク質産物が毒素である、請求項 46 に記載の核酸分子。

【請求項 48】

翻訳停止コドンを含む配列をさらに含んでなる、請求項 44 に記載の核酸分子。

【請求項 49】

標的プレ mRNA にトランススプライシングされるヌクレオチド配列が嚢胞性繊維症膜貫通コンダクタンス調節タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んでなる、請求項 44 に記載の分子。

【請求項 50】

嚢胞性繊維症膜貫通コンダクタンス調節タンパク質をコードするヌクレオチド配列が嚢胞性繊維症膜貫通調節タンパク質コンダクタンス遺伝子のエキソン 10 を含んでなる、請求項 49 に記載の分子。

【請求項 51】

ヌクレオチド配列を発現する組換え発現ベクターであって、該ヌクレオチド配列が、

a) 標的プレ mRNA にプレトランススプライシング分子の結合をターゲットする 2 以上の標的結合ドメイン；

b) 分岐点、ピリミジントラクト、ならびに 3' スプライス受容部位および 5' スプライス供与部位を含む 3' スプライス領域；

c) 3' スプライス領域および 5' スプライス供与部位を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；および

d) 標的プレ mRNA にトランススプライシングされるヌクレオチド配列；

を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記組換え発現ベクター。

【請求項 52】

プレトランススプライシング分子分岐点、ピリミジントラクト、3' スプライス部位または 5' スプライス部位の 1 以上の側に結合する 1 以上の相補配列を含むセーフティヌクレオチド配列をさらに含んでなる、請求項 44 または 51 に記載の分子。

【請求項 53】

核酸分子を含んでなる細胞であって、該核酸分子が、

a) 標的プレ mRNA にプレトランススプライシング分子の結合をターゲットする 2 以上の標的結合ドメイン；

b) 分岐点、ピリミジントラクト、ならびに 3' スプライス受容部位および 5' スプライス供与部位を含む 3' スプライス領域；

c) 3' スプライス領域および 5' スプライス供与部位を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；および

d) 標的プレ mRNA にトランススプライシングされるヌクレオチド配列；

を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記細胞。

【請求項 54】

前記核酸分子のスペーサー領域が 3' スプライス領域および 5' スプライス供与部位を標的結合ドメインから離す、請求項 53 に記載の細胞。

【請求項 55】

前記核酸分子が翻訳可能なタンパク質産物をコードする配列をさらに含んでなる、請求項 53 に記載の細胞。

【請求項 56】

翻訳可能なタンパク質が毒素である、請求項 55 に記載の細胞。

【請求項 57】

前記核酸分子が翻訳停止コドンを含むヌクレオチド配列をさらに含んでなる、請求項 53 に記載の細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 58】

標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列が嚢胞性繊維症膜貫通コンダクタンス調節タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んでなる、請求項53に記載の細胞。

【請求項 59】

嚢胞性繊維症膜貫通コンダクタンス調節タンパク質をコードするヌクレオチド配列が嚢胞性繊維症膜貫通コンダクタンス調節タンパク質遺伝子のエキソン10を含んでなる、請求項53に記載の細胞。

【請求項 60】

ヌクレオチド配列を発現する組換え発現ベクターを含んでなる細胞であって、該ヌクレオチド配列が、 10

a) 標的プレmRNAにプレトランススプライシング分子の結合をターゲットする2以上の標的結合ドメイン；

b) 分岐点、ピリミジントラクト、ならびに3' スプライス受容部位および5' スプライス供与部位を含む3' スプライス領域；

c) 3' スプライス領域および5' スプライス供与部位を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；および

d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；

を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記細胞。 20

【請求項 61】

プレトランススプライシング分子分岐点、ピリミジントラクト、3' スプライス部位または5' スプライス部位の1以上の側に結合する1以上の相補配列を含むセーフティヌクレオチド配列をさらに含んでなる、請求項44または51に記載の細胞。

【請求項 62】

プレトランススプライシング分子と標的プレmRNAとを、二重トランススプライシング反応によりプレトランススプライシング分子の一部が標的プレmRNAの一部にトランススプライシングされてキメラmRNAを形成する条件下で接触させることを含んでなる、キメラmRNAの作製方法。

【請求項 63】

プレトランススプライシングmRNAが嚢胞性繊維症膜貫通コンダクタンス調節タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んでなる、請求項62に記載の方法。 30

【請求項 64】

プレトランススプライシングmRNAが嚢胞性繊維症膜貫通コンダクタンス調節タンパク質遺伝子のエキソン10を含んでなる、請求項62に記載の方法。

【請求項 65】

キメラmRNA分子を含む宿主細胞を提供する方法であって、

プレトランススプライシング分子を、標的プレmRNAを発現する宿主細胞に導入することを含んでなり、その際、二重トランススプライシング反応により、プレトランススプライシング分子の一部が標的プレmRNAの一部にトランススプライシングされてキメラmRNAを形成する条件下で、プレトランススプライシング分子が標的プレmRNAと結合する、上記方法。 40

【請求項 66】

前記宿主細胞がヒト細胞である、請求項63に記載の方法。

【請求項 67】

プレトランススプライシング分子が、宿主細胞において欠陥があるかまたは欠失しているタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んでなる、請求項63に記載の方法。

【請求項 68】

プレトランススプライシング分子が嚢胞性繊維症膜貫通調節タンパク質の断片をコードするヌクレオチド配列を含んでなる、請求項65に記載の方法。

【請求項 69】

請求項 1 に記載の核酸分子と製薬上許容される担体を含んでなる、医薬組成物。

【請求項 70】

a) 標的プレ mRNA にプレトランススプライシング分子の結合をターゲットする 1 以上の標的結合ドメイン；
b) 5' スプライス供与部位；
c) 5' スプライス供与部位を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；および
d) 標的プレ mRNA にトランススプライシングされる遺伝子の 5' 末端を含むヌクレオチド配列；
を含んでなり、細胞内で核スプライシング成分により認識される、核酸分子。

【請求項 71】

標的プレ mRNA にトランススプライシングされるヌクレオチド配列が翻訳可能なタンパク質産物をコードする、請求項 70 に記載の核酸分子。

【請求項 72】

翻訳可能なタンパク質産物が毒素である、請求項 71 に記載の核酸分子。

【請求項 73】

標的プレ mRNA にトランススプライシングされるヌクレオチド配列が翻訳停止コドンを含んでなる、請求項 70 に記載の核酸分子。

【請求項 74】

標的プレ mRNA にトランススプライシングされるヌクレオチド配列が嚢胞性繊維症膜貫通コンダクタンス調節タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んでなる、請求項 70 に記載の核酸分子。

【請求項 75】

嚢胞性繊維症膜貫通コンダクタンス調節タンパク質をコードするヌクレオチド配列が嚢胞性繊維症膜貫通調節タンパク質遺伝子のエキソン 1~10 を含んでなる、請求項 70 に記載の核酸分子。

【請求項 76】

ヌクレオチド配列を発現する組換え発現ベクターであって、該ヌクレオチド配列が、

a) 標的プレ mRNA にプレトランススプライシング分子の結合をターゲットする 1 以上の標的結合ドメイン；
b) 5' スプライス供与部位；
c) 5' スプライス供与部位を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；および
d) 標的プレ mRNA にトランススプライシングされる遺伝子の 5' 末端を含むヌクレオチド配列；
を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記発現ベクター。

【請求項 77】

プレトランススプライシング分子分岐点、ピリミジントラクト、または 3' スプライス部位の 1 以上の側に結合する 1 以上の相補配列を含むセーフティーヌクレオチド配列をさらに含んでなる、請求項 70 または 73 に記載の分子。

【請求項 78】

プレトランススプライシング分子分岐点、ピリミジントラクト、または 3' スプライス部位の 1 以上の側に結合する 1 以上の相補配列を含むセーフティーヌクレオチド配列をさらに含んでなる、請求項 76 に記載の組換え発現ベクター。

【請求項 79】

核酸分子を含んでなる細胞であって、該核酸分子が、

a) 標的プレ mRNA にプレトランススプライシング分子の結合をターゲットする 1 以上の標的結合ドメイン；
b) 5' スプライス供与部位；
c) 5' スプライス供与部位を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；および
d) 標的プレ mRNA にトランススプライシングされる遺伝子の 5' 末端を含むヌクレオチド配

10

20

30

40

50

列；

を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記細胞。

【請求項 80】

前記核酸分子が翻訳可能なタンパク質産物をコードする配列をさらに含んでなる、請求項 79 に記載の細胞。

【請求項 81】

前記核酸分子が翻訳停止コドンを含むヌクレオチド配列をさらに含んでなる、請求項 79 に記載の細胞。

【請求項 82】

標的プレ mRNA にトランススプライシングされるヌクレオチド配列が嚢胞性繊維症膜貫通調節タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んでなる、請求項 79 に記載の細胞。

【請求項 83】

嚢胞性繊維症膜貫通調節タンパク質をコードするヌクレオチド配列が嚢胞性繊維症膜貫通調節タンパク質遺伝子のエキソン 1~10 を含んでなる、請求項 79 に記載の細胞。

【請求項 84】

前記翻訳可能なタンパク質が毒素である、請求項 79 に記載の細胞。

【請求項 85】

ヌクレオチド配列を発現する組換え発現ベクターを含んでなる細胞であって、該ヌクレオチド配列が、

a) 標的プレ mRNA にプレトランススプライシング分子の結合をターゲットする 1 以上の標的結合ドメイン；

b) 5' スプライス供与部位；

c) 5' スプライス供与部位を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；および

d) 標的プレ mRNA にトランススプライシングされる遺伝子の 5' 末端を含むヌクレオチド配列；

を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記細胞。

【請求項 86】

プレトランススプライシング分子分岐点、ピリミジントラクト、または 5' スプライス部位の 1 以上の側に結合する 1 以上の相補配列を含むセーフティーヌクレオチド配列をさらに含んでなる、請求項 70 または 77 に記載の細胞。

【請求項 87】

プレトランススプライシング分子分岐点、ピリミジントラクト、または 5' スプライス部位の 1 以上の側に結合する 1 以上の相補配列を含むセーフティーヌクレオチド配列をさらに含んでなる、請求項 76 に記載の細胞。

【請求項 88】

キメラ mRNA 分子を作製する方法であって、プレトランススプライシング分子と標的プレ mRNA とを、トランススプライシング反応により、プレトランススプライシング分子の一部が標的プレ mRNA の 5' 末端にトランススプライシングされてキメラ mRNA を形成する条件下で接触させることを含んでなる、上記方法。

【請求項 89】

プレトランススプライシング mRNA が嚢胞性繊維症膜貫通コンダクタンス調節タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んでなる、請求項 88 に記載の方法。

【請求項 90】

プレトランススプライシング mRNA が嚢胞性繊維症膜貫通コンダクタンス調節タンパク質遺伝子のエキソン 1~10 を含んでなる、請求項 89 に記載の方法。

【請求項 91】

キメラ mRNA 分子を含む宿主細胞を提供する方法であって、プレトランススプライシング分子を、標的プレ mRNA を発現する宿主細胞に導入することを

10

20

30

40

50

含んでなり、その際、トランススプライシング反応により、プレトランススプライシング分子の一部が標的プレmRNAの5'部分にトランススプライシングされてキメラmRNAを形成する条件下で、プレトランススプライシング分子が標的プレmRNAと結合する、上記方法。

【請求項92】

前記宿主細胞がヒト細胞である、請求項91に記載の方法。

【請求項93】

プレトランススプライシング分子が、宿主細胞において欠陥があるかまたは欠失しているタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んでなる、請求項91に記載の方法。

【請求項94】

プレトランススプライシング分子が嚢胞性繊維症膜貫通コンダクタンス調節タンパク質の断片をコードするヌクレオチド配列を含んでなる、請求項93に記載の方法。 10

【請求項95】

請求項27に記載の核酸分子と製薬上許容される担体を含んでなる、医薬組成物。

【請求項96】

CFTR PTM24である、核酸分子。

【請求項97】

核酸分子を含んでなる植物細胞であって、該核酸分子が、

- a) 細胞内で発現された標的プレmRNAに核酸分子の結合をターゲットする1以上の標的結合ドメイン；
 - b) 3'スプライス受容部位を含む3'スプライス領域； 20
 - c) 3'スプライス領域を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；および
 - d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
- を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記植物細胞。

【請求項98】

核酸分子を含んでなる植物細胞であって、該核酸分子が、

- a) 核酸分子の結合ドメインを植物細胞内で発現された標的プレmRNAにターゲットする1以上の標的結合ドメイン；
 - b) 5'スプライス部位；
 - c) 5'スプライス部位を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；および 30
 - d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
- を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記植物細胞。

【請求項99】

前記核酸分子が5'供与部位をさらに含んでなる、請求項97に記載の植物細胞。

【請求項100】

前記核酸分子がUAに富む配列をさらに含んでなる、請求項97に記載の植物細胞。

【請求項101】

前記核酸分子が3'スプライス領域の1以上の側にまたはそれに隣接して結合する1以上の相補配列を含むセーフティーヌクレオチド配列をさらに含んでなる、請求項97に記載の植物細胞。 40

【請求項102】

前記核酸分子が5'スプライス領域の1以上の側にまたはそれに隣接して結合する1以上の相補配列を含むセーフティー配列をさらに含んでなる、請求項98に記載の植物細胞。

【請求項103】

前記核酸分子が翻訳可能なタンパク質産物をコードする配列をさらに含んでなる、請求項97に記載の植物細胞。

【請求項104】

前記核酸分子が翻訳停止コドンを含むヌクレオチド配列をさらに含んでなる、請求項97に記載の植物細胞。

【請求項 105】

核酸分子を発現する組換えベクターを含んでなる植物細胞であって、該核酸分子が、

- a) 核酸分子の結合ドメインを細胞内で発現された標的プレmRNAにターゲットする1以上の標的結合ドメイン；
 - b) 3' スプライス受容部位を含む3' スプライス領域；
 - c) 3' スプライス領域を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；および
 - d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
- を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記植物細胞。

【請求項 106】

10

核酸分子を発現する組換えベクターを含んでなる細胞であって、該核酸分子が、

- a) 核酸分子の結合ドメインを植物細胞内で発現された標的プレmRNAにターゲットする1以上の標的結合ドメイン；
 - b) 5' スプライス部位；
 - c) 5' スプライス部位を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；および
 - d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
- を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記細胞。

【請求項 107】

前記核酸分子が5' 供与部位をさらに含んでなる、請求項 105 に記載の細胞。

20

【請求項 108】

前記核酸分子がUAに富む領域をさらに含んでなる、請求項 105 に記載の細胞。

【請求項 109】

植物細胞においてキメラRNA分子を作製する方法であって、

細胞内で発現された標的プレmRNAと、核スプライシング成分により認識される核酸分子とを、該核酸分子の一部が標的プレmRNAの一部にトランススプライシングされて細胞内でキメラRNAを形成する条件下で接触させることを含んでなり、該核酸分子が、

- a) 核酸分子の結合ドメインを植物細胞内で発現された標的プレmRNAにターゲットする1以上の標的結合ドメイン；
 - b) 3' スプライス受容部位を含む3' スプライス領域；
 - c) 3' スプライス領域を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；および
 - d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
- を含んでなる、上記方法。

30

【請求項 110】

植物細胞においてキメラRNA分子を作製する方法であって、

細胞内で発現された標的プレmRNAと、核スプライシング成分により認識される核酸分子とを、接触させることを含んでなり、該核酸分子が、

- a) 核酸分子の結合ドメインを植物細胞内で発現された標的プレmRNAにターゲットする1以上の標的結合ドメイン；
 - b) 5' スプライス部位；
 - c) 5' スプライス部位を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；および
 - d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
- を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記方法。

40

【請求項 111】

前記核酸分子が5' 供与部位をさらに含んでなる、請求項 109 に記載の方法。

【請求項 112】

前記核酸分子がUAに富む配列をさらに含んでなる、請求項 109 に記載の方法。

【請求項 113】

前記キメラRNA分子が翻訳可能なタンパク質をコードする配列を含んでなる、請求項 10

50

9に記載の方法。

【請求項114】

前記キメラRNA分子が毒素をコードする配列を含んでなる、請求項109に記載の方法。

【請求項115】

- a) 核酸分子の結合ドメインを植物細胞内で発現された標的プレmRNAにターゲットする1以上の標的結合ドメイン；
 - b) 3' スプライス受容部位を含む3' スプライス領域；
 - c) 3' スプライス領域を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；
 - d) 3' スプライス部位の片側もしくは両側にまたはそれに隣接して結合する1以上の相補配列を含むセーフティー配列；および
 - e) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
- を含んでなり、細胞内で核スプライシング成分により認識される、核酸分子。

10

【請求項116】

- a) 核酸分子の結合ドメインを植物細胞内で発現された標的プレmRNAにターゲットする1以上の標的結合ドメイン；
 - b) 5' スプライス部位；
 - c) 5' スプライス部位を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；
 - d) 5' スプライス部位の片側もしくは両側にまたはそれに隣接して結合する1以上の相補配列を含むセーフティー配列；および
 - e) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
- を含んでなり、細胞内で核スプライシング成分により認識される、核酸分子。

20

【請求項117】

5' 供与部位をさらに含んでなる、請求項115に記載の核酸分子。

【請求項118】

3' スプライス部位の片側もしくは両側で、またはそれに隣接して結合する1以上の相補配列を含むセーフティー配列をさらに含んでなる、請求項116に記載の核酸分子。

【請求項119】

UAに富む配列をさらに含んでなる、請求項115または116に記載の核酸分子。

【請求項120】

核酸分子を発現する真核生物発現ベクターであって、該核酸分子が、

30

- a) 核酸分子の結合ドメインを植物細胞内で発現された標的プレmRNAにターゲットする1以上の標的結合ドメイン；
 - b) 3' スプライス受容部位を含む3' スプライス領域；
 - c) 3' スプライス領域を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；および
 - d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
- を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記真核生物発現ベクター。

【請求項121】

核酸分子を発現する真核生物発現ベクターであって、該核酸分子が、

- a) 核酸分子の結合ドメインを植物細胞内で発現された標的プレmRNAにターゲットする1以上の標的結合ドメイン；
 - b) 5' スプライス部位；
 - c) 5' スプライス部位を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；および
 - d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
- を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記真核生物発現ベクター。

40

【請求項122】

前記核酸分子が5' 供与部位をさらに含んでなる、請求項120に記載のベクター。

【請求項123】

前記核酸分子がUAに富む配列をさらに含んでなる、請求項120または121に記載のベ

50

クター。

【請求項 1 2 4】

- a) 核酸分子の結合ドメインを植物細胞内で発現された標的プレmRNAにターゲットし、ランダムなヌクレオチド配列を含んでなる、1以上の標的結合ドメイン；
 - b) 5' スプライス部位；
 - c) 5' スプライス部位を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；および
 - d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
- を含んでなり、細胞内で核スプライシング成分により認識される、核酸分子。

【請求項 1 2 5】

核酸分子を含んでなる細胞であって、該核酸分子が、

10

- a) 核酸分子の結合を細胞内で発現された因子VIIIまたはパピローマウイルスプレmRNAにターゲットする1以上の標的結合ドメイン；
 - b) 分岐点、ピリミジントラクトおよび3' スプライス受容部位を含む3' スプライス領域；
 - c) 3' スプライス領域を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；および
 - d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
- を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記細胞。

【請求項 1 2 6】

核酸分子を含んでなる細胞であって、該核酸分子が、

20

- a) 核酸分子の結合を細胞内で発現された因子VIIIまたはパピローマウイルスプレmRNAにターゲットする1以上の標的結合ドメイン；
 - b) 3' スプライス受容領域；
 - c) 3' スプライス領域を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；および
 - d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
- を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記細胞。

【請求項 1 2 7】

核酸分子を含んでなる細胞であって、該核酸分子が、

30

- a) 核酸分子の結合を細胞内で発現された因子VIIIまたはパピローマウイルスプレmRNAにターゲットする1以上の標的結合ドメイン；
 - b) 5' スプライス部位；
 - c) 5' スプライス部位を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；および
 - d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
- を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記細胞。

【請求項 1 2 8】

前記核酸分子が5' 供与部位をさらに含んでなる、請求項 1 2 5 に記載の細胞。

【請求項 1 2 9】

前記核酸分子が3' スプライス領域の片側もしくは両側に結合する1以上の相補配列を含むセーフティーヌクレオチド配列をさらに含んでなる、請求項 1 2 5 に記載の細胞。

40

【請求項 1 3 0】

前記核酸分子の標的プレmRNAへの結合が相補性、三重らせん形成またはタンパク質-核酸相互作用により媒介される、請求項 1 2 5 に記載の細胞。

【請求項 1 3 1】

標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列が因子VIIIポリペプチドまたはパピローマウイルスポリペプチドをコードする、請求項 1 2 5 に記載の細胞。

【請求項 1 3 2】

パピローマウイルスが発癌性パピローマウイルスである、請求項 1 2 5 に記載の細胞。

【請求項 1 3 3】

50

標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列がイヌもしくはヒト因子VIIIタンパク質のエキソン23～26、またはマウスもしくはヒト因子VIIIタンパク質のエキソン16～26をコードする、請求項125に記載の細胞。

【請求項134】

核酸分子を発現する組換えベクターを含んでなる細胞であって、該核酸分子が、

a) 核酸分子の結合を細胞内で発現された因子VIIIまたはパピローマウイルスプレmRNAにターゲットする1以上の標的結合ドメイン；

b) 分岐点、ピリミジントラクトおよび3' スプライス受容部位を含む3' スプライス領域；

c) 3' スプライス領域を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；および

d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；

を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記細胞。

10

【請求項135】

核酸分子を発現する組換えベクターを含んでなる細胞であって、該核酸分子が、

a) 核酸分子の結合を細胞内で発現された因子VIIIまたはパピローマウイルスプレmRNAにターゲットする1以上の標的結合ドメイン；

b) 3' スプライス受容部位；

c) 3' スプライス領域を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；および

d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；

を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記細胞。

20

【請求項136】

核酸分子を発現する組換えベクターを含んでなる細胞であって、該核酸分子が、

a) 核酸分子の結合を細胞内で発現された因子VIIIまたはパピローマウイルスプレmRNAにターゲットする1以上の標的結合ドメイン；

b) 5' スプライス部位；

c) 5' スプライス部位を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；および

d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；

を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記細胞。

30

【請求項137】

前記核酸分子が5' 供与部位をさらに含んでなる、請求項134に記載の細胞。

【請求項138】

細胞においてキメラRNA分子を作製する方法であって、

細胞内で発現された標的プレmRNAと、核スプライシング成分により認識される核酸分子とを、該核酸分子の一部が標的プレmRNAの一部にトランススプライシングされて細胞内でキメラRNAを形成する条件下で接触させることを含んでなり、該核酸分子が、

a) 核酸分子の結合を細胞内で発現された因子VIIIまたはパピローマウイルスプレmRNAにターゲットする1以上の標的結合ドメイン；

b) 分岐点、ピリミジントラクトおよび3' スプライス受容部位を含む3' スプライス領域；

c) 3' スプライス領域を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；および

d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；

を含んでなる、上記方法。

40

【請求項139】

細胞においてキメラRNA分子を作製する方法であって、

細胞内で発現された標的プレmRNAと、核スプライシング成分により認識される核酸分子とを、該核酸分子の一部が標的プレmRNAの一部にトランススプライシングされて細胞内でキメラRNAを形成する条件下で接触させることを含んでなり、該核酸分子が、

50

- a) 核酸分子の結合を細胞内で発現された因子VIIIまたはパピローマウイルスプレmRNAにターゲットする1以上の標的結合ドメイン；
 - b) 3' スプライス受容領域；
 - c) 3' スプライス領域を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；および
 - d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
- を含んでなる、上記方法。

【請求項140】

細胞においてキメラRNA分子を作製する方法であって、細胞内で発現された標的プレmRNAと、核スプライシング成分により認識される核酸分子とを、接触させることを含んでなり、該核酸分子が、

10

- a) 核酸分子の結合を細胞内で発現された因子VIIIまたはパピローマウイルスプレmRNAにターゲットする1以上の標的結合ドメイン；
 - b) 5' スプライス部位；
 - c) 5' スプライス部位を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；および
 - d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
- を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記方法。

【請求項141】

前記核酸分子が5' 供与部位をさらに含んでなる、請求項138に記載の方法。

【請求項142】

20

前記キメラRNA分子が翻訳可能なタンパク質をコードする配列を含んでなる、請求項138に記載の方法。

【請求項143】

- a) 核酸分子の結合を細胞内で発現された因子VIIIまたはパピローマウイルスプレmRNAにターゲットする1以上の標的結合ドメイン；
 - b) 分岐点、ピリミジントラクトおよび3' スプライス受容部位を含む3' スプライス領域；
 - c) 3' スプライス領域を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；
 - d) 3' スプライス部位の片側または両側に結合する1以上の相補配列を含むセーフティー配列；および
 - e) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
- を含んでなり、細胞内で核スプライシング成分により認識される、核酸分子。

30

【請求項144】

- a) 核酸分子の結合を細胞内で発現された因子VIIIまたはパピローマウイルスプレmRNAにターゲットする1以上の標的結合ドメイン；
 - b) 3' スプライス受容領域；
 - c) 3' スプライス領域を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；
 - d) 3' スプライス部位の片側または両側に結合する1以上の相補配列を含むセーフティー配列；および
 - e) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
- を含んでなり、細胞内で核スプライシング成分により認識される、核酸分子。

40

【請求項145】

- a) 核酸分子の結合を細胞内で発現された因子VIIIまたはパピローマウイルスプレmRNAにターゲットする1以上の標的結合ドメイン；
 - b) 5' スプライス部位；
 - c) 5' スプライス部位を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；
 - d) 5' スプライス部位の片側または両側に結合する1以上の相補配列を含むセーフティー配列；および
 - e) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；
- を含んでなり、細胞内で核スプライシング成分により認識される、核酸分子。

50

【請求項 1 4 6】

前記核酸分子が5' 供与部位をさらに含んでなる、請求項 1 8 に記載の核酸分子。

【請求項 1 4 7】

前記核酸分子の標的プレmRNAへの結合が相補性、三重らせん形成またはタンパク質-核酸相互作用により媒介される、請求項 1 4 3 に記載の核酸分子。

【請求項 1 4 8】

標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチドが翻訳可能な因子VIIIポリペプチドまたはパピローマウイルスポリペプチドおよび／またはマーカータンパク質をコードする、請求項 1 4 3 に記載の核酸分子。

【請求項 1 4 9】

パピローマウイルスが発癌性パピローマウイルスである、請求項 1 4 3 に記載の核酸分子。

【請求項 1 5 0】

パピローマウイルスがパピローマウイルス16である、請求項 1 4 9 に記載の核酸分子。

【請求項 1 5 1】

パピローマウイルスが発癌性パピローマウイルスである、請求項 1 4 5 に記載の核酸分子。

【請求項 1 5 2】

ヒトパピローマウイルスが発癌性パピローマウイルスである、請求項 1 4 5 に記載の核酸分子。

【請求項 1 5 3】

標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列がイヌもしくはヒト因子VIIIタンパク質のエキソン23～26、またはマウスもしくはヒト因子VIIタンパク質のエキソン16～26をコードする、請求項 1 4 3 に記載の核酸分子。

【請求項 1 5 4】

前記核酸分子の標的プレmRNAへの結合が相補性、三重らせん形成またはタンパク質-核酸相互作用により媒介される、請求項 1 4 5 に記載の核酸分子。

【請求項 1 5 5】

標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列が因子VIIIポリペプチドおよび／またはマーカー遺伝子配列をコードする、請求項 1 4 5 に記載の核酸分子。

【請求項 1 5 6】

標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列が因子VIIIタンパク質のエキソン23～26をコードする、請求項 1 4 5 に記載の核酸分子。

【請求項 1 5 7】

核酸分子を発現する真核生物発現ベクターであって、該核酸分子が、

a) 核酸分子の結合を細胞内で発現された因子VIIIまたはパピローマウイルスプレmRNAにターゲットする1以上の標的結合ドメイン；

b) 分岐点、ピリミジントラクトおよび3' スプライス受容部位を含む3' スプライス領域；

c) 3' スプライス領域を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；および

d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；

を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記発現ベクター。

【請求項 1 5 8】

核酸分子を発現する真核生物発現ベクターであって、該核酸分子が、

a) 核酸分子の結合を細胞内で発現された因子VIIIまたはパピローマウイルスプレmRNAにターゲットする1以上の標的結合ドメイン；

b) 3' スプライス受容部位；

c) 3' スプライス領域を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；および

d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；

10

20

30

40

50

を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記発現ベクター。

【請求項 159】

核酸分子を発現する真核生物発現ベクターであって、該核酸分子が、

- a) 核酸分子の結合を細胞内で発現された因子VIIIポリペプチドまたはパピローマウイルススタンパク質プレmRNAにターゲットする1以上の標的結合ドメイン；
- b) 5' スプライス部位；
- c) 5' スプライス部位を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；および
- d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；

を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記発現ベクター。 10

【請求項 160】

前記核酸分子が5' 供与部位をさらに含んでなる、請求項 157 に記載のベクター。

【請求項 161】

ウイルスベクターである、請求項 157 に記載のベクター。

【請求項 162】

アデノ随伴ウイルスベクターである、請求項 161 に記載のベクター。

【請求項 163】

生理学上許容される担体および請求項 157 ～ 162 のいずれか1項に記載の核酸分子を含んでなる、組成物。 20

【請求項 164】

核酸分子を含んでなる細胞であって、該核酸分子が、

- a) 核酸分子の結合を細胞内で発現されたウイルスプレmRNAにターゲットする1以上の標的結合ドメイン；
- b) 分岐点、ピリミジントラクトおよび3' スプライス受容部位を含む3' スプライス領域；
- c) 3' スプライス領域を標的結合ドメインから離すスペーサー領域；および
- d) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；

を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記細胞。 30

【請求項 165】

子宮頸癌患者に核酸分子を投与することを含んでなる、該患者においてパピローマウイルスプレmRNAの発現を抑制する方法であって、該核酸分子が、

- a) 核酸分子の結合を細胞内で発現されたパピローマウイルスプレmRNAにターゲットする1以上の標的結合ドメイン；および
- b) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；

を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記方法。

【請求項 166】

核酸分子を発現する組換えベクターを含んでなる細胞であって、該核酸分子が、 40

- a) 核酸分子の結合を細胞内で発現されたパピローマウイルスプレmRNAにターゲットする1以上の標的結合ドメイン；
- b) 3' スプライス受容部位；および
- c) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；

を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記細胞。

【請求項 167】

核酸分子を発現する組換えベクターを含んでなる細胞であって、該核酸分子が、

- a) 核酸分子の結合を細胞内で発現されたパピローマウイルスプレmRNAにターゲットする1以上の標的結合ドメイン；

b) 5' スプライス部位；および

c) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；

を含んでなり、該核酸分子は細胞内で核スプライシング成分により認識されるものである、上記細胞。

【請求項 168】

細胞においてキメラRNAを作製する方法であって、

細胞内で発現された標的プレmRNAと、核スプライシング成分により認識される核酸分子とを、該核酸分子の一部が標的プレmRNAの一部にトランススプライシングされて細胞内でキメラRNAを形成する条件下で接触させることを含んでなり、該核酸分子が、

a) 核酸分子の結合を細胞内で発現されたパピローマウイルスプレmRNAにターゲットする10
以上の標的結合ドメイン；

b) 3' スプライス受容部位；および

c) 標的プレmRNAにトランススプライシングされるヌクレオチド配列；

を含んでなる、上記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

1. 緒論

本発明は、標的スプライセオソームトランススプライシングによって新規な核酸分子を作製する方法および組成物を提供する。本発明の組成物は、天然の標的前駆体メッセンジャーRNA分子(標的プレmRNA)と相互作用し、新規なキメラRNA分子(キメラRNA)の形成をもたらすトランススプライシング反応を媒介するようデザインされたプレトランススプライシング分子(PTM)を含む。本発明のPTMは、それ自体、RNA翻訳の阻害のようなある機能を遂行するか、または細胞において欠陥があるもしくは不活性なタンパク質を補足するタンパク質をコードするか、または特定の細胞を死滅させる毒素をコードする新規なキメラRNAの産生をもたらすように遺伝子操作される。一般に、標的プレmRNAは、特定の細胞型内で発現され、従って、新規なキメラRNAの発現を選択された細胞型にターゲットする手段となることから、標的として選択される。本発明はさらに、エキソンのタグ付け法を用いてプレmRNA分子のエキソン／イントロン境界を同定するために遺伝子操作されたPTMに関する。またPTMは、特定の細胞型で発現するタンパク質を精製および同定するのに使用できるペプチドアフィニティー精製タグをコードするキメラRNAの生成をもたらすようデザインすることもできる。本発明の方法は、本発明のPTMと標的プレmRNAを、PTMの一部が標的プレmRNAの一部にトランススプライシングされて新規なキメラRNA分子を形成するような条件下で接触させることを含む。本発明の方法および組成物は、癌などの増殖性疾患の治療、または遺伝疾患、自己免疫疾患もしくは感染性疾患の治療のための細胞遺伝子調節、遺伝子修復および自殺遺伝子治療に使用できる。また、本発明の方法および組成物は、標的スプライセオソームトランススプライシングにより、植物において新規な核酸分子を生成するためにも使用できる。例えば、標的トランススプライシングは植物の病害の処置、病害耐性植物の遺伝子操作、または植物での所望の遺伝子の発現のために植物において遺伝子発現を調節するために使用できる。本発明の方法および組成物はまた、イントロン／エキソン境界をマッピングするため、また、いずれかの細胞で発現した新規なタンパク質を同定するためにも使用できる。 30 40

【背景技術】

【0002】

2. 発明の背景

染色体のDNA配列はコード領域(エキソン)を含み、通常、介在する非コード領域(イントロン)も含んだプレmRNAへと転写される。イントロンはスプライシングと呼ばれる精密なプロセスでプレmRNAから除かれる(Chowら, 1977, Cell 12: 1-8;およびBerget, S.M.ら, 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 3171-3175)。スプライシングは、いくつかの小さなリボヌクレオタンパク質(snRNP)と、集合してスプライセオソームとして知られる酵素 50

複合体を形成する多くのタンパク質因子との協調した相互作用として起こる (Mooreら, 1993, *The RNA World*, R.F. GestlandおよびJ.F. Atkins編 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Kramer, 1996, *Annu. Rev. Biochem.*, 65:367-404; StaleyおよびGuthrie, 1998, *Cell* 92: 315-326)。

【0003】

プレmRNAのスプライシングは2ステップ機構で進行する。第1のステップでは、5' スプライス部位が切断されて「遊離の」5'エキソンと輪縄状の中間体が生じる (Moore, M.J.およびP.A. Sharp, 1993, *Nature* 365: 364-368)。第2のステップでは、この5'エキソンが3'エキソンと連結し、それに伴って輪縄状の産物としてのイントロンが遊離する。これらのステップは小さな核リボヌクレオタンパク質とスプライセオソームと呼ばれるタンパク質の複合体で触媒される。これらのスプライシング反応部位は5'および3' スプライス部位の周辺の共通配列によって規定される。5' スプライス部位共通配列はAG/GURAGU(ここでA=アデノシン、U=ウラシル、G=グアニン、C=シトシン、R=プリン、/=スプライス部位)である。3' スプライス領域は、分岐点または分枝部位、ポリピリミジントラクトおよび3' スプライス共通配列(YAG)の3つの個別の配列エレメントからなる。これらのエレメントは3' スプライス領域を大まかに規定し、3' スプライス領域は3' スプライス部位の上流に100ヌクレオチドのイントロンを含みうる。哺乳類の分岐点共通配列はYNYURAC(ここでN=任意のヌクレオチド、Y=ピリミジン)である。下線のAは分岐形成部位である(BPA=分岐点アデノシン)。3'スプライス共通配列はYAG/Gである。分岐点とスプライス部位の間には通常ポリピリミジントラクトが見られるが、これは哺乳類系では効果的な分岐点の利用と3' スプライス部位の認識に重要なものである (Roscinio, R. F.ら, 1993, *J. Biol. Chem.*, 268:11222-11229)。分岐点およびポリピリミジントラクトの下流にある最初のYAGのトリヌクレオチドは最もよく用いられる3' スプライス部位である (Smith, C.W.ら, 1989, *Nature* 342:243-247)。

【0004】

ほとんどの場合、スプライシング反応は同じプレmRNA分子内で起こり、これはシススプライシングと呼ばれる。独立して転写された2つのプレmRNAの間のスプライシングをトランススプライシングと呼ぶ。トランススプライシングはトリパノソーマで初めて発見され (Sutton & Boothroyd, 1986, *Cell* 47: 527; Murphyら, 1986, *Cell* 47:517)、続いて線虫 (Krause & Hirsh, 1987, *Cell* 49:753); 扁虫 (Rajkovicら, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:8879; Davisら, 1995, *J. Biol. Chem.* 270: 21813) および植物のミトコンドリア (Malekら, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:553) で発見された。寄生虫 *Trypanosoma brucei* では、全てのmRNAがトランススプライシングによりその5'末端にスプライスリーダー (SL) RNAを獲得する。Caenorhabditis elegansでも、いくつかの遺伝子で5'リーダー配列がトランススプライシングされる。この機構は多くの異なる転写物に単一の共通配列を付加するのに好適である。

【0005】

トランススプライシング機構は従来のシススプライシング機構とほとんど同じであり、2つのホスホリル転移反応によって起こる。まず、2'-5'ホスホジエステル結合が形成され、シススプライシングの場合の輪縄状の中間体に等しい「Y」型の分岐を持つ中間体が生じる。第2の反応であるエキソン連結は従来のシススプライシングと同様に起こる。また、3' スプライス部位の配列およびトランススプライシング反応を触媒するsnRNPのいくつかは、シススプライシングに関与するそれらの対応物とよく似ている。

【0006】

またトランススプライシングは、あるプレmRNAのイントロンが別のプレmRNAのイントロンと相互作用して、2つの通常のプレmRNA間のスプライス部位の組換えを促進するという、また違ったプロセスについてもいう場合がある。このタイプのトランススプライシングは、トランスジェニックマウスにおいて内因性の不変領域に連結されたヒト免疫グロブリン可変領域配列をコードする転写産物を説明するために仮定されたものである (Shimizuら, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8020)。さらにまた、c-myc pre-RNAのトランスス

プライシングが実証され(Vellard, M.ら, Proc. Natl. Acad. Sci., 1992 89:2511-2515)、もっと最近では、培養細胞および核抽出物中に、互いにトランススプライシングされたクローン化SV40由来のRNA転写物が検出された(Eulら, 1995, EMBO. J. 14:3226)。しかし、哺乳類プレmRNAの天然に存在するトランススプライシングは極めてまれであると考えられる。

【0007】

数グループにより、スプライシング機構を調べるモデル系としてin vitroトランススプライシングが用いられている(Konarska & Sharp, 1985, Cell 46:165-171; Solnick, 1985, Cell 42:157; Chiara & Reed, 1995, Nature 375:510; PasmanおよびGarcia-Blanco, 1996, Nucleic Acids Res. 24:1638)。かなり効率的なトランススプライシング(シススプライシングされた類似体の30%)は互いに塩基対合可能なRNA間で達成されたが、塩基対合によって結びつかないRNAのスプライシングはさらに10倍低くなった。基質間で明確なRNA-RNA相互作用を必要としない他のin vitroトランススプライシング反応が、Chiara & Reed (1995, Nature 375: 510), Bruzik J.P. & Maniatis, T. (1992, Nature 360:692)ならびにBruzik J.P.およびManiatis, T. (1995, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 92: 7056-7059)によって観測されている。これらの反応は比較的低い頻度でしか起こらず、下流5' スプライス部位またはエキソンスプライシングエンハンサーなどの特殊なエレメントを要する。

10

【0008】

RNAを正しく切断して連結する働きをする複数のタンパク質の前駆体mRNAへの結合を含むスプライシング機構に加えて、第3の機構としてはイントロン自身によるRNAの切断および連結を含み、これは触媒RNA分子またはリボザイムと呼ばれる。このリボザイムの切断活性は、リボザイムに別の「ハイブリダイゼーション」領域を組み込むことにより特定のRNAにターゲッティングされている。標的RNAとハイブリダイズすると、このリボザイム切断触媒領域は標的を切断する。このようなリボザイム活性は、外来のまたは異常なRNAの産生を特徴とするヒト疾患の治療など、in vivoにおける標的RNAの不活性化または切断に有用であることが示唆されている。また、特定のRNAのターゲッティングおよび破壊のためのもう1つの機構として、アンチセンスRNAの使用も提案されている。このような例では、小RNA分子を標的RNAとハイブリダイズさせ、標的RNAに結合することによって標的RNAの翻訳を妨げるか、あるいはヌクレアーゼの活性化によりRNAの破壊を起こすようにデザイン

20

30

【0009】

最近まで、特定の標的遺伝子を改変するための標的トランススプライシングの実用上の適用例は第1群リボザイムに基づく機構に限られていた。テトラヒメナ(Tetrahymena)第1群リボザイムを用いた標的トランススプライシングは、大腸菌(E. coli)(Sullenger B.A.およびCech. T.R., 1994, Nature 341: 619-622)、マウス繊維芽細胞(Jones, J.T.ら, 1996, Nature Medicine 2:643-648)、ヒト繊維芽細胞(Phylacton, L.A.ら, Nature Genetics 18:378-381)およびヒト赤血球前駆体(Lapら, 1998, Science 280: 1593-1596)で実証されている。改変型第1群リボザイムによって起こる標的RNAトランススプライシングの多くの用途が検討されてきたが、天然の哺乳類スプライシング機構、すなわちスプライセオソームによって媒介される標的トランススプライシングはこれまでに報告されていない。

40

【発明の開示】

【0010】

3. 発明の概要

本発明は、スプライセオソームにより媒介される標的トランススプライシングを介して新規な核酸分子を作製するための組成物および方法に関する。本発明の組成物は、天然の標的プレmRNA分子(以下、「プレmRNA」という)と相互作用しかつ新規なキメラRNA分子(以下、「キメラRNA」という)の形成をもたらすスプライセオソームトランススプライシング反応を媒介するようにデザインされた、プレトランススプライシング分子(以下、「PTM」という)を含む。本発明の方法は、本発明のPTMと天然標的プレmRNAとを、PTMの一部が天然

50

プレmRNAにスプライシングされて新規なキメラRNAを形成するような条件下で接触させることを含む。本発明のPTMは、トランススプライシング反応から生じた新規なキメラRNAそれ自体がRNAの翻訳を阻害するといったある機能を遂行するか、あるいはまた、キメラRNAが細胞内で欠陥のあるまたは不活性なタンパク質を補足するタンパク質をコードするか、または特定の細胞を死滅させる毒素をコードするように遺伝子操作される。一般に、標的プレmRNAは、それが特定の細胞型で発現され、それにより新規なキメラRNAの発現を選択された細胞型にターゲットするための手段を提供するという理由で選択される。標的細胞としては、限定されるものではないが、ウイルスその他の感染性病原体に感染した細胞、良性または悪性新生物、あるいは自己免疫疾患または組織拒絶に関わる免疫系の成分が挙げられる。また本発明のPTMは、遺伝病に関与することが分かっている遺伝子変異を修正 10
するために使用できる。特に、内部エキソンを置換するために二重トランススプライシング反応を用いることができる。本発明のPTMはまた、標的プレmRNAにおいてイントロン／エキソン境界を同定する方法としてmRNA分子のエキソン配列にタグを付けるために遺伝子操作することもできる。本発明はさらに、特定の細胞型で発現されるタンパク質を精製および同定する際に用いるペプチドアフィニティー精製タグをコードするよう遺伝子操作されるPTM分子の使用に関する。本発明の方法および組成物は遺伝子調節、遺伝子修復および標的化された細胞死に使用することができる。このような方法および組成物は限定されるものではないが、遺伝病、感染性疾患または自己免疫疾患、および癌などの増殖性疾患の治療ならびに植物における遺伝子発現の調節に使用できる。

【0011】

20

5. 発明の詳細な説明

本発明はプレトランススプライシング分子(PTM)を含んでなる組成物、および新規な核酸分子を作製するためのかかる分子の使用に関する。本発明のPTMは、プレmRNAに特異的に結合するようにデザインされた1以上の標的結合ドメイン；分岐点、ピリミジントラクト、ならびに3'スプライス受容部位および／または5'スプライス供与部位を含む3'スプライス領域；ならびにそのRNAスプライス部位を標的結合ドメインから離す1以上のスペーサー領域を含んでなる。また、本発明のPTMは翻訳可能なタンパク質産物をコードするもの 30
のようないずれかのヌクレオチド配列を含むように操作することもできる。

【0012】

本発明の方法は、本発明のPTMと天然プレmRNAを、PTMの一部が天然プレmRNAの一部へとトランススプライシングされて新規なキメラRNAを生じるような条件下で接触させることを含む。標的プレmRNAは、それが特定の細胞型で発現し、従って、新規なRNAの発現を選択された細胞型へターゲッティングする機構をもたらしことから、標的として選択される。得られるキメラRNAは特定の細胞型で所望の機能をもたすか、または遺伝子産物を産生 30
しうる。特定の細胞としては、限定されるものではないが、ウイルスその他の感染性病原体に感染したもの、良性または悪性新生物、あるいは自己免疫疾患または組織拒絶に関わる免疫系の成分が挙げられる。特異性はPTMの結合ドメインを標的的内因性プレmRNAに結合するように改変することで達成される。キメラRNAによりコードされる遺伝子産物は、例えば治療遺伝子またはマーカー遺伝子ならびに毒素をコードする遺伝子など、臨床的に有用な遺伝子をはじめとするいずれの遺伝子であってもよい。

40

【0013】

5.1. プレトランススプライシング分子の構造

本発明は標的トランススプライシングにより新規なキメラ核酸分子を作出するのに用いる組成物を提供する。本発明のPTMは(i)PTMの結合をプレmRNAへターゲッティングする1以上の標的結合ドメイン、(ii)分岐点、ピリミジントラクト、ならびに3'スプライス受容部位および／または5'スプライス供与部位を含む3'スプライス領域；ならびに(iii)そのRNAスプライス部位を標的結合ドメインから離す1以上のスペーサー領域を含んでなる。また、このPTMは翻訳可能なタンパク質産物をコードするいずれかのヌクレオチド配列を含む 40
ように操作することもできる。本発明のさらにもう1つの実施形態では、PTMはキメラRNA分子の翻訳を阻害するヌクレオチド配列を含むように操作することができる。例えば、こ

50

のヌクレオチド配列は、翻訳停止コドンまたは二次構造を形成することにより翻訳を阻害するヌクレオチド配列を含んでもよい。あるいは、キメラRNAはアンチセンス分子として働き、それによりそれが結合するRNAの翻訳を阻害するものであってもよい。

【0014】

PTMの標的結合ドメインは、選択されたプレmRNAのターゲッティング領域に対して相補的、かつ、アンチセンス配向である複数の結合ドメインを含んでもよい。本明細書において標的結合ドメインは、結合の特異性を与え、核のスプライセオソームプロセッシング機構がPTMの一部をプレmRNAの一部へとトランススプライシングできるように近接してプレmRNAをつなぎ止めるいずれかの配列として定義される。これらの標的結合ドメインは数千までのヌクレオチドを含みうる。本発明の好ましい実施形態では、これらの結合ドメインは少なくとも10ないし30、数百までのヌクレオチドを含みうる。本明細書に示されるように、PTMの特異性は標的結合ドメインの長さを増加させることによって著しく高めることができる。例えば標的結合ドメインは数百またはそれより多いヌクレオチドを含んでもよい。さらにまた、標的結合ドメインは「直鎖状」であってもよいが、このRNAは、複合体を安定化させて、それによりスプライシング効率を高めうる二次構造を形成するように折りたたまれていてもよいと考えられる。第2の標的結合領域は分子の3'末端に位置してもよく、本発明のPTMに組み込むことができる。絶対的な相補性が好ましいが、必ずしも必要ではない。本明細書に関してRNAの一部に「相補的な」配列とは、そのRNAとハイブリダイズして安定な二重らせんを形成しうるのに十分な相補性を有する配列を意味する。ハイブリダイズ能は相補性の程度および核酸の長さの両方に依存しうる(例えば、Sambrookら, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York参照)。一般にハイブリダイズする核酸が長いほど、RNAと誤対合する塩基をより多く含んでなお安定した二重らせんを形成する。当業者ならば、標準的な方法を用いてハイブリダイズした複合体の安定性を調べることで、二重らせんの誤対合または長さの許容度を確かめることができる。

10

20

30

40

【0015】

PTMをイントロン-エキソントグ付けまたはペプチドアフィニティータグ付けに用いるようデザインする場合、PTMライブラリーを、標的結合ドメインにランダムなヌクレオチド配列を含むように遺伝子操作する。あるいは、イントロン-エキソントグ付けには、標的結合ドメインを欠くようにPTMを遺伝子操作してもよい。かかるPTM分子ライブラリーを作製する上での到達目標は、ライブラリーが、細胞で発現する各RNA分子に結合しうるPTM分子の集団を含むということである。組換え発現ベクターは、ランダムなDNA断片をPTMに挿入してランダムな標的結合ドメインを形成させるのに使用できる制限エンドヌクレアーゼ部位を含むPTMのコード領域を含むように遺伝子操作することができる。標的結合ドメインとしてPTMに含めるべきランダムヌクレオチド配列は、限定されるものではないが、制限酵素によるDNA部分消化、またはDNAのランダム断片を作出するDNA物理的剪断をはじめ、当業者に周知の様々な異なる方法を用いて作出することができる。ランダム結合ドメイン領域はまた、縮重オリゴヌクレオチド合成によって作出することもできる。これらの縮重オリゴヌクレオチドは、縮重結合ドメインを有するPTM分子ライブラリーの作出のため、各末端に制限エンドヌクレアーゼ認識部位を有し、PTM分子へのクローニングを容易にするために操作することができる。

【0016】

また、結合はその他の機構、例えば三重らせんの形成、またはPTMが特定のRNA結合タンパク質、すなわち特定の標的プレmRNAと結合したタンパク質を認識するように操作されているものなど、タンパク質／核酸相互作用によって達成することもできる。あるいは、本発明のPTMは、例えばRNA分子内のヌクレオチド間の分子内塩基対合によって生じるヘアピン構造などの二次構造を認識するようにデザインしてもよい。

【0017】

また、PTM分子は分岐点、ピリミジントラクトおよび3' スプライス受容AG部位および／または5' スプライス供与部位を含む3' スプライス領域を含む。RNA スプライシングに用い

50

る5' スプライス供与部位および3' スプライス領域の共通配列は当技術分野で周知のものである(Mooreら, 1993, The RNA World, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 303-358参照)。さらにまた、本発明の実施において、5' 供与スプライス部位および3' スプライス領域として機能する能力を維持する改変共通配列を用いてもよい。要するに、5' スプライス部位共通配列はAG/GURAGU(ここで、A=アデノシン、U=ウラシル、G=グアニン、C=シトシン、R=プリンおよび/=スプライス部位)である。3' スプライス部位は分岐点または分岐部位、ポリピリミジントラクトおよび3' 共通配列(YAG)の3つの異なる配列エレメントからなる。哺乳類の分岐点共通配列は YNYURAC(Y=ピリミジン)である。下線を引いたAは分岐形成部位である。ポリピリミジントラクトは、分岐点とスプライス部位アクセプターとの間に位置し、様々な分岐点利用および3' スプライス部位認識に重要なものである。

10

【0018】

さらに、3' 受容部位(AG)を含んでなるPTMを遺伝子操作することができる。このようなPTMはピリミジントラクトおよび/または分岐点配列をさらに含んでもよい。

【0019】

最近、ジヌクレオチドAUで始まり、ジヌクレオチドACで終わるプレメッセンジャーRNAイントロンが確認され、U12イントロンと呼ばれている。U12イントロン配列ならびにスプライス受容/供与配列として機能するいずれかの配列をPTMで用いてもよい。

【0020】

また、標的結合ドメインからRNAスプライス部位を離すスペーサー領域もPTMに含めてよい。このスペーサー領域は非スプライスPTMの翻訳を遮断する停止コドン、および/または

20

標的プレmRNAへのトランススプライシングを促進する配列などの特徴を有しうる。

【0021】

本発明の好ましい実施形態では、スペーサー、結合ドメイン、またはPTMの他のいずれかの場所に「セーフティー」を組み込んで非特異的トランススプライシングを妨げる。これは比較的弱い相補性によってPTMの3'および/または5' スプライス部位のエレメントをカバーして非特異的トランススプライシングを妨げるPTMの1領域である。PTMは、PTMの結合/ターゲッティング部分のハイブリダイゼーションの際に 3'および/または5' スプライス部位はカバーされず、完全活性型となるようにデザインされる。

【0022】

「セーフティー」は、PTM分岐点、ピリミジントラクト、3' スプライス部位および/または5' スプライス部位(スプライシングエレメント)の片側または両側に弱く結合する1以上のシス配列の相補的ストレッチからなる(または、第2の個別の核酸ストランドでありうる)か、あるいは、スプライシングエレメントそれ自体の一部と結合しうる。この「セーフティー」結合はスプライシングエレメントが活性となるのを防ぐ(すなわちU2 snRNPその他のスプライシング因子がPTMスプライス部位認識エレメントと結合するのを妨げる)。この「セーフティー」の結合はPTMの標的結合領域が標的プレmRNAに結合して露出し、PTMスプライシングエレメントを活性化する(それらを標的プレmRNAへとトランススプライシングされやすくする)ことで阻害されうる。

30

【0023】

本発明のPTMには、細胞死などの作用をもたらしうる翻訳可能なタンパク質、あるいはマーカーとしての欠損した機能または作用を回復するものをコードするヌクレオチド配列が含まれる。例えば、ヌクレオチド配列は公知の遺伝病で欠損または変異している遺伝子産物をコードする配列を含みうる。あるいは、ヌクレオチド配列は、細胞の同定または画像化に用いうるマーカータンパク質またはペプチドをコードすることができる。本発明のさらに別の実施形態では、アフィニティー精製に用いるPTM分子には、HISタグ(6つの連続するヒスチジン残基)(Janknechtら, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8972-8976)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)のC末端(SmithおよびJohnson, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8703-8707)(Pharmacia)またはFLAG(Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys)(Eastman Kodak/IBI, Rochester, NY)などのアフィニティータグをコードするヌクレオチド配列を含めてもよい。このようなヌクレオチド配列を含むPTMを使用すると、ペプチ

40

50

ドアフィニティータグと結合させた細胞で通常発現されるペプチド配列を含む融合タンパク質をコードするキメラRNAが産生される。このアフィニティータグは細胞で発現されるペプチド配列の迅速な精製と同定のための方法を提供する。好ましい実施形態では、ヌクレオチド配列は、放射線照射または化学療法などの続いて行う治療に対する細胞の感受性を高める何らかの機能を提供する毒素その他のタンパク質をコードしてもよい。

【0024】

本発明の極めて好ましい実施形態では、PTM分子はジフテリア毒素サブユニットAをコードするヌクレオチド配列を含むようにデザインする (Greenfield, L.ら, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 6853-6857)。ジフテリア毒素サブユニットAは酵素毒素活性を含み、ヒト細胞で発現または送達された場合に細胞死をもたらす働きをする。さらに本発明では、限定されるものではないが、シュードモナス毒素、志賀毒素および外毒素Aをはじめ、その他種々の公知のペプチド毒素を用いてもよい。

【0025】

PTM分子の前後いずれかにさらなる特徴 (例えば、スプライシングを促進するためのポリアデニル化シグナルもしくは5' スプライス配列、さらなる結合領域、「セーフティー」自己相補領域、さらなるスプライス部位、または分子の安定性を調節し、分解を防ぐための保護基など) を有する翻訳可能なタンパク質をコードするヌクレオチド配列を付加することができる。

【0026】

本発明のPTMへ組み込みうるさらなる特徴としては、非スプライシングプレmRNAの発現を防ぐための、結合ドメインとスプライス部位の間の領域における停止コドンまたはその他のエレメントが挙げられる。本発明の別の実施形態では、PTMは、3' 標的イントロンまたはエキソンへの結合を促進するために、また、固定された原型のシス5' スプライス部位 (U5および/またはU1結合部位) を遮断するために、翻訳可能なタンパク質をコードするヌクレオチド配列から下流にある第2のアンチセンス結合ドメインを伴って作出することができる。

【0027】

また、キメラトランススプライシング産物の作出に二重トランススプライシング反応を必要とするPTMも作出することができる。このようなPTMはRNAの修復に使用できる内部エキソンを置換するのに使用できる。2つのトランススプライシング反応を促進するようにデザインされたPTMは上記のように作製されるが、それらは5' 供与部位と3' スプライス受容部位の双方を含む。さらに、PTMは2以上の結合ドメインおよびスプライサー領域を含んでもよい。これらのスプライサー領域は複数の結合ドメインとスプライス部位との間、あるいはまた複数の結合ドメイン間で置換してもよい。

【0028】

核局在化およびスプライセオソームの組み込み、ならびに細胞内安定性を促進または補助するため、PTMに3' ヘアピン構造、環化RNA、ヌクレオチド塩基修飾または合成類似体などのさらなるエレメントを組み込むことができる。

【0029】

さらにまた、植物細胞で用いるPTMを設計する際には、植物でのイントロンのプロセッシングに必ずしも不可欠な配列ではないため、保存された分岐点配列またはポリピリミジントラクトを含む必要はない。しかし、脊椎動物および酵母のスプライシングに必要なものなど、3' スプライス受容部位および/または5' スプライス供与部位は含まれる。さらに、植物でのスプライシング効率はUA豊富なイントロン配列も含めることによって増大させることができる。当業者ならば、植物におけるトランススプライシング反応を媒介しうるいずれの配列を用いてもよいことが分かるであろう。

【0030】

本発明のPTMは、標的細胞において新規なキメラRNAを産生するようにデザインした方法で用いることができる。本発明の方法は、例えば、RNA分子、またはRNA分子へ転写されるDNAベクターなど、当業者が用いるいずれの形態であってもよいが、PTMを標的細胞へ送達す

ることを含んでなり、そのPTMがプレmRNAに結合し、プレmRNAの一部へスプライシングされるPTM分子の一部を含んでなるキメラRNAの形成をもたらすトランススプライシング反応を媒介する。

【0031】

5.2. トランススプライシング分子の合成

本発明の核酸分子は、RNAもしくはDNAまたはその誘導体もしくは改変型、一本鎖もしくは二本鎖でありうる。核酸とは、デオキシリボヌクレオチドからなる場合であれ、リボヌクレオチドからなる場合であれ、また、ホスホジエステル結合からなる場合であれ、改変型の結合からなる場合であれ、PTM分子、またはPTM分子をコードする核酸分子を意味する。また、核酸という用語には、生物学的にみられる5つの塩基(アデニン、グアニン、チミン、シトシンおよびウラシル)以外の塩基からなる核酸も特に含まれる。

10

【0032】

本発明のRNAおよびDNA分子は、DNAおよびRNA分子の合成に関して当技術分野で公知のいずれの方法によっても調製することができる。例えば、核酸は当業者に周知の方法により市販の試薬およびシンセサイザーを用いて化学的に合成してもよい(例えば、Gait, 1985, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford, England)。あるいはRNA分子は、RNA分子をコードするDNA配列のin vitroおよびin vivo転写によって作製することもできる。このようなDNA配列はT7またはSP6ポリメラーゼプロモーターなどの適切なRNAポリメラーゼプロモーターを組み込んだ様々なベクターへ組み込むことができる。RNAはSPS65(Promega Corporation, Madison, WI)などのプラスミドを用いるin vitro

20

【0033】

核酸分子は例えば分子の安定性、ハイブリダイゼーション、細胞への輸送などを向上させるために塩基部分、糖部分、またはリン酸骨格を改変することができる。例えば全体としての電荷を小さくするようPTMを改変すると、分子の細胞への取り込みを向上させることができる。さらにまた、ヌクレアーゼ分解に対する感受性を低減する改変を行うこともできる。核酸分子はペプチド(例えば、in vivoで宿主細胞受容体をターゲットティングするため)、または細胞膜(例えば、Letsingerら, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6553-6556; Lemaitreら, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648-652; 1988年12月15日公開のPCT公開W088/09810参照)または血液脳関門(例えば、1988年4月25日公開のPCT公開W089/10134)を通過する輸送を補助する薬剤、ハイブリダイゼーション誘発切断剤(例えば、Krollら, 1988, BioTechniques 6:958-976参照)またはインターカレート剤(例えば、Zon, 1988, Pharm. Res. 5:539-549)などのその他の付属基を含んでもよい。この目的で核酸分子は、別の分子、例えばペプチド、ハイブリダイゼーション誘発架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーション誘発切断剤などにコンジュゲートしてもよい。核酸分子への種々のその他周知の改変が細胞内安定性および半減期を上昇させる手段として導入できる。可能な改変としては、限定されるものではないが、分子の5'および/または3'末端へのリボまたはデオキシヌクレオチドのフランキング配列の付加が挙げられる。安定性の上昇が望まれるいくつかの環境では、2'-O-メチル化などの改変型のヌクレオチド内結合を有する核酸が

30

40

【0034】

核酸は当技術分野において周知であるような好適な手段のいずれかによって精製しうる。例えば、核酸は逆相クロマトグラフィーまたはゲル電気泳動によって精製することができる。もちろん当業者ならば、精製方法が精製する核酸の大きさによってある程度異なることが分かるであろう。

【0035】

50

PTMをコードする核酸分子を用いる場合、核酸分子の発現ベクターへのクローニングには当技術分野で公知のクローニング技術を用いることができる。使用できる当技術分野で一般に知られている組換えDNA技術の方法は、Ausubelら(編), 1993, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY;およびKriegler, 1990, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NYに記載されている。

【0036】

目的のPTMをコードするDNAは、DNAの大スケール複製も提供し、かつ、PTMの転写を指令する必須エレメントも含む様々な宿主ベクター系に組換え操作することができる。患者の標的細胞をトランスフェクトすることを目的にこのような構築物を用いると、内因的に発現したプレmRNA標的と相補的塩基対を形成し、それにより複合化した核酸分子間のトランススプライシング反応を促進するのに十分な量のPTMの転写が起こる。例えば、ベクターは、細胞に取り込ませ、PTM分子の転写を命令することができるようにin vivoで導入することができる。このようなベクターは、転写されて目的のRNAを産生する限り、エピソームとして維持されるものであっても染色体に組み込まれるものであってもよい。このようなベクターは当技術分野で標準的な組換えDNA技術によって構築することができる。

10

【0037】

目的のPTMをコードするベクターは、プラスミド、ウイルス、または哺乳類細胞で複製および発現させるのに用いる当技術分野で公知のその他のものであってもよい。PTMをコードする配列の発現は、哺乳類、好ましくはヒトの細胞で機能させるために当技術分野で公知のいずれかのプロモーターによって調節することができる。このようなプロモーターは誘導性のものであっても構成的なものであってもよい。このようなプロモーターとしては、限定されるものではないが、SV40初期プロモーター領域(Benoist, C.およびChambon, P., 1981, *Nature* 290:304-310)、ラウス肉腫ウイルスの3'長い末端リピートに含まれるプロモーター(Yamamotoら, 1980, *Cell* 22: 787-797)、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター(Wagnerら, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1441-1445)、メタロチオネイン遺伝子の調節配列(Brinsterら, 1982, *Nature* 296:39-42)、CMVウイルスプロモーター、ヒト漿膜ゴナドトロピン-βプロモーター(Hollenbergら, 1994, *Mol. Cell. Endocrinology* 106:111-119)などが挙げられる。いずれの種類のプラスミド、コスミド、YACまたはウイルスベクターを用いて、直接組織部位へ導入できる組換えDNA構築物を作製することができる。あるいは、所望の標的細胞へ選択的に感染するウイルスベクターを用いることもできる。

20

30

【0038】

ペプチドアフィニティー精製タグをコードするPTMの使用に関しては、ランダムな標的結合部位を含むヌクレオチド配列をPTMに挿入し、それらを選択可能な哺乳類発現ベクター系にクローニングするのが望ましい。限定されるものではないが、それぞれtk欠損、hgprt欠損またはaprt欠損細胞における単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼおよびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼタンパク質の発現についての選択をはじめ、いくつかの選択系を使用することができる。また、メトトレキサート耐性を付与するジヒドロ葉酸トランスフェラーゼ(dhfr)、ミコフェノール酸耐性を付与するキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(gpt)、アミノグリコシドG-418耐性を付与するネオマイシン(neo)、およびハイグロマイシン耐性を付与するハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ(hygro)に関する選択に基づく代謝拮抗物質耐性を使用することができる。本発明の好ましい実施形態では、いずれの細胞にも1個のベクターまたは限られた数のベクターしか存在しないように、培養細胞を細胞に対して低率のベクターで形質転換する。本発明の実施に用いるベクターとしては、限定されるものではないが、レトロウイルスまたはアデノ随伴ウイルス種に由来するものなどウイルス発現ベクターをはじめとするいずれかの真核発現ベクターが挙げられる。

40

【0039】

5.3. トランススプライシング分子の使用および投与

50

5.3.1 遺伝子調節、遺伝子修復および標的化細胞死のためのPTM分子の使用

本発明の組成物および方法は遺伝子調節、遺伝子修復、および標的化細胞死をはじめとする種々の異なる用途を有する。例えば、トランススプライシングは毒性を有するタンパク質を細胞に導入するために使用できる。さらにPTMは、ウイルスmRNAと結合してウイルスmRNAの機能を破壊するか、あるいは、ウイルスmRNAを発現するいずれの細胞も破壊しうるように操作することができる。本発明のさらに別の実施形態では、PTMは、有害なmRNA転写物に停止コドン配置し、それにより転写物の発現を低下させるように操作することができる。

【0040】

本発明のある実施形態では、PTM分子はパピローマウイルスRNAと結合してウイルスRNAの機能を阻害するようにデザインした。具体的には、HPVプレmRNAを特異的にターゲティングし、HPV感染した癌細胞においてのみ阻害的または毒性であるタンパク質の発現をもたらすように抗HPV PTMをデザインした。このように本発明は、パピローマウイルスRNAの機能を阻害するようにデザインしたPTM分子を提供する。このようなパピローマウイルスとしては、限定されるものではないが、ヒトパピローマウイルスを含む哺乳類パピローマウイルスが挙げられる。

10

【0041】

パピローマウイルスは、ヒトをはじめ種々の脊椎動物に乳頭腫(いぼ)を作る小型DNAウイルスの一群である。さらに、ヒトパピローマウイルスはわが国で性的伝染病の最も一般的な原因の一つであり、大部分の子宮頸癌は発癌性ヒトパピローマウイルスに関連し、E6およびE7発癌タンパク質をコードするウイルスmRNAを発現する。このように、本発明のPTM分子は感染した宿主内でパピローマウイルスの増殖を阻害するのに使用できる。

20

【0042】

二重トランススプライシング反応、3'エキソン置換および／または5'エキソン置換をはじめとする標的トランススプライシングを用い、末端切断型または点突然変異を含む転写物を修復または修正することができる。本発明のPTMは特定の突然変異の上流もしくは下流、または未成熟3'の上流で標的転写物を切断し、突然変異を含む転写物の部分を機能的配列で置換するトランススプライシング反応を介して変異転写物を修正するようにデザインされている。

【0043】

さらにまた、腫瘍細胞での毒素の選択的発現のために二重トランススプライシング反応を用いてもよい。例えば、PTMは、ヒトβ-漿膜ゴナドトロピン-6(βhCG6)遺伝子転写物の第2のエキソンを置換し、ジフテリア毒素サブユニットA(DT-A)をコードするエキソンを送達するようにデザインすることができる。サブユニットBの不在下でのDT-Aの発現はDT-A遺伝子を発現する細胞でのみ毒性となるはずである。βhCG6はトランススプライシングによる遺伝子改変の原型的な標的である。βhCG6遺伝子の配列および構造は完全に知られており、スプライシングのパターンが決定されている。βhCG6遺伝子は多くの非生殖細胞系の腫瘍をはじめとする多種の固形癌で発現が高いが、このβhCG6遺伝子は正常な成体の大部分の細胞ではサイレントである。従って、βhCG6プレmRNAは腫瘍特異的毒性をもたらすようにデザインされたトランススプライシング反応の望ましい標的となる。

30

40

【0044】

βhCG6プレmRNAの第1のエキソンは、トランススプライシングmRNAの効率的な翻訳に必要なシグナルを提供するとともに、DT-A毒素の適切な折りたたみにより最小の妨害しか引き起こさないように、開始コドンAUGを含む5つのアミノ酸だけをコードするのが理想的である。キメラタンパク質の形成を妨げる停止コドンを含むようにデザインされたDT-Aエキソンは、βhCG6遺伝子の最後のエキソンへとトランススプライシングされるように操作する。βhCG6遺伝子の最後のエキソンは、mRNAをポリアデニル化して確実に翻訳されるようにする適当なシグナルを有する構築物を提供する。

【0045】

嚢胞性繊維症(CF)はヒトにおいて最も一般的な致死性の遺伝子病の1つである。遺伝子解

50

析および分子解析の双方に基づき、嚢胞性繊維症に関連する遺伝子が単離され、そのタンパク質産物が推定されている(Kerem, B.S.ら, 1989, Science 245:1073-1080; Riordanら, 1989, Science 245: 1066-1073; Rommansら, 1989, Science 245:1059-1065)。CF関連遺伝子のタンパク質産物は嚢胞性繊維症膜貫通調節タンパク質(CFTR)と呼ばれる。本発明の特定の実施形態では、トランススプライシング反応は嚢胞性繊維症膜貫通調節タンパク質(CFTR)をコードするDNA配列における遺伝子欠損を修正するために用い、それによって嚢胞性繊維症膜貫通調節タンパク質をコードするDNA配列が発現され、患者の気道上皮細胞に機能的塩素イオンチャネルが形成される。

【0046】

集団研究によって、最も多い嚢胞性繊維症突然変異はCFTRアミノ酸配列の508番のフェニルアラニンをコードするエキソン10における3つのヌクレオチドの欠失であることが示された。図15に示されているように、トランススプライシング反応はCFTRのアミノ酸配列の508番の欠失を修正することができた。遺伝子欠損の修正に用いるPTMは、CFTR BDイントロン9配列、スペーサー配列、分岐点、ポリピリミジントラクト、3' スプライス部位および野生型CFTR BDエキソン10配列を含んでいた(図13)。トランススプライシング反応を用いてCFTRをコードする変異DNAが首尾よく修正できるということは、遺伝子欠損の修正のためのPTMの全般的な適用を支持するものである。

10

【0047】

血友病Aは凝固カスケードの重要な成分である因子VIIIの活性の欠損を特徴とするX染色体関連出血障害である。血友病Aの罹患率は男性5,000ないし10,000人におよそ1人である。罹患者は関節および筋肉出血に苦しみ、打撲しやすく、傷からの出血が長引く。血友病Aは因子VIII遺伝子における種々の突然変異から起こる。この遺伝子は26個のエキソンからなり、186kbにわたる。突然変異が同定されている血友病A患者の約95%は遺伝子に点突然変異を有する。本発明の特定の実施形態では、因子VIIIをコードするDNA配列における遺伝子欠損を修正するためにトランススプライシング反応を用い、それにより因子VIIIタンパク質をコードするDNA配列が発現し、患者の血漿で機能的凝固因子が形成される。本発明のPTMは因子VIII遺伝子のコード領域における欠損を修正することを目的として対象とするいずれのエキソンまたはエキソンの組合せも修復するように遺伝子操作することができる。

20

【0048】

遺伝的研究では、最も一般的な因子VIII突然変異が生じることが示されている。図46に示されるように、トランススプライシング反応は因子VIIIアミノ酸配列における突然変異を修正することができた。突然変異はマウス遺伝子のエキソン16とイントロン16の間にネオマイシン遺伝子を挿入し、エキソン16のオープンリーディングフレームに割り込ませ、イントロン16の3'スプライス供与部位を除去することにより作出した。遺伝子欠損を修正するのに用いたPTMは因子VIIIエキソン16~24コード配列、スペーサー配列、分岐点、ポリピリミジントラクト、および3'受容スプライスを含んでいた(図44A)。トランススプライシング反応を用いて因子VIIIをコードする変異型DNAが首尾よく修正できるということは、遺伝子欠損の修正のためのPTMの全般的な適用をさらに支持するものである。

30

【0049】

本発明の方法および組成物はまた、植物での遺伝子発現を調節するためにも使用できる。例えば、いずれかの操作された遺伝子の発現を選択された標的植物遺伝子の本来の調節下に置くためにトランススプライシングを用いてもよく、それにより操作された遺伝子の発現が調節される。トランススプライシングはまた、非宿主植物において操作された遺伝子の発現を妨げたり、あるいは内因性の遺伝子産物をさらに望ましい産物へと変換するためにも使用できる。

40

【0050】

本発明の特定の実施形態では、トランススプライシングはBt毒素(*Bacillus thuringiensis*)を産生する殺虫遺伝子の発現を調節するためにも使用できる。例えば、昆虫が植物を食害した後にはじめて発現する傷害応答遺伝子(プレmRNA)へとトランススプライシングされ

50

るようにPTMをデザインすることができる。このようにして、植物の全細胞がPTM中にBt遺伝子を有するようになるが、これらの細胞は昆虫が植物を傷害した際に傷害した場所ではBtは産生されない。植物の残りの部分は、ほとんどあるいはまったくBtを作らない。PTMは、所望の発現パターンで、Bt遺伝子を選択されたいずれかの遺伝子へとトランススプライシングすることができる。さらに、PTMをターゲティングして植物の食用部分ではBtを産生しないようにすることができるはずである。

【0051】

PTMの使用に関する1つの利点は、PTMが標的遺伝子の本来の遺伝子制御エレメントを獲得していることから、操作した遺伝子上流にある適当な調節配列を同定・再構成するのに費やす時間や労力が軽減される。このようにPTMによって調節される遺伝子の発現は、標的プレmRNAを含む植物細胞でしか起こらないはずである。消費者は組換え遺伝子から作られたタンパク質を食べたがらないので、植物の食用部分または花粉で発現しない遺伝子をターゲティングすることで、トランススプライシングは遺伝子組換え植物に対する抵抗を緩和することができる。かかる作物の食用部分は、遺伝子組換えタンパク質が含まれていないことを試験する必要がある。

【0052】

また、PTMは他の植物には存在しない宿主細胞特有の配列へターゲティングすることができる。従って、PTMをコードする遺伝子(DNA)がたとえ他の植物種にジャンプしたとしても、そのPTM遺伝子にはトランススプライシングの適当な標的がないことになる。このようにトランススプライシングは他の植物種へ遺伝子が「ジャンプ」することを防ぐ「フェイルセーフ(fail-safe)」様式を与え、PTM遺伝子は、適当な標的プレmRNAを含む操作された植物宿主でしか発現しない。操作されていない植物での発現は不可能なのである。

【0053】

トランススプライシングはまた、ある遺伝子産物を別のものへと変換するより効率的な経路を提供する。例えば、トランススプライシングリボザイムおよびキメラオリゴをトウモロコシゲノムに組み込んで飽和油と不飽和油の比率を改変することができる。トランススプライシングはまた、ある遺伝子産物を別のものへと変換するのに用いることができる。

【0054】

例えば、リボソームへの封入、マイクロパーティクル、マイクロカプセル、組成物を発現しうる組換え細胞、受容体により媒介されるエンドサイトーシス(例えば、WuおよびWu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432参照)、レトロウイルスその他のベクターの一部としての核酸の構築、DNA注入、エレクトロポレーション、リン酸カルシウムにより媒介されるトランスフェクションなど、種々の送達系が知られており、本発明の組成物を細胞へ導入するのに用いることができる。

【0055】

これらの組成物および方法は癌およびその他の重篤なウイルス感染、自己免疫疾患、ならびに特定の細胞型の改変または除去が有益なその他の病状を治療するために使用できる。また、これらの組成物および方法は、欠損または変異遺伝子産物の発現が正常な表現型をもたらす遺伝性の遺伝子疾患を有する患者の細胞に、機能的生物活性分子をコードする遺伝子を提供するために使用することもできる。

【0056】

好ましい実施形態では、PTM機能を促進するために、遺伝子送達および宿主細胞での発現という方法で、PTMをコードする配列を含んでなる核酸を投与する。本発明のこの実施形態では、核酸はPTM産生を促進することにより作用を媒介する。当技術分野で利用できる宿主細胞に対する遺伝子送達の方法はいずれも本発明に従って使用できる。遺伝子送達法の総説としては、Strauss, M.およびBarranger, J.A., 1997, Concepts in Gene Therapy, by Walter de Gruyter & Co., Berlin; Goldspielら, 1993, Clinical Pharmacy 12:488-505; WuおよびWu, 1991, Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 33:573-596; Mulligan, 1993, Science 260:926-932;ならびにMorganおよびAnderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; 1993, TIBTECH 11(5):155-215を参

照。方法例を以下に記載する。

【0057】

宿主細胞への核酸の送達は直接的(すなわち、宿主がその核酸または核酸を運ぶベクターに直接曝される場合)であっても、間接的(すなわち、まず、*in vitro*にて宿主細胞をその核酸で形質転換した後、宿主へ移植する場合)であってもよい。これらの2つのアプローチはそれぞれ*in vivo*または*ex vivo*遺伝子送達として知られている。

【0058】

特定の実施形態では、核酸は直接*in vivo*投与し、そこで発現させてPTMを産生させる。これは例えばそれを適当な核酸発現ベクターの一部として構築し、細胞内のものとなるように投与することにより、あるいは例えば欠陥または弱毒レトロウイルスその他のウイルスベクターを用いた感染(米国特許第4,980,286号参照)により、あるいは裸のDNAの直接注入により、あるいはマイクロパーティクル衝撃(例えば、遺伝子ガン; Biolistic, Dupont)の使用により、あるいは脂質もしくは細胞表面受容体またはトランスフェクション剤によるコーティング、あるいはリポソーム、マイクロパーティクルまたはマイクロカプセルへの封入により、あるいは核へ入ることが知られているペプチドに結合させて投与することにより、あるいは受容体によって媒介されるエンドサイトーシスを受けるリガンドへ結合させて投与する(例えば、WuおよびWu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432)ことによるなど、当技術分野で公知の多くの方法のいずれかによって達成することができる。

【0059】

特定の実施形態では、PTMを含むウイルスベクターを使用することができる。例えば、ウイルスゲノムのパッケージングおよび宿主細胞DNAへの組み込みに必要でないレトロウイルス配列を削除するように改変されたレトロウイルスベクターを用いることができる(Millerら, 1993, Meth. Enzymol. 217:581-599参照)。あるいは、アデノウイルスまたはアデノ随伴ウイルスベクターを細胞または組織への遺伝子送達に使用することができる(アデノウイルスを基にした遺伝子送達の総説としてはKozarskyおよびWilson, 1993, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503参照)。

【0060】

細胞への遺伝子送達に対する別のアプローチとしては、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウムを媒介とするトランスフェクション、またはウイルス感染のような方法により組織培養細胞へ遺伝子を導入することを含む。通常、導入方法は細胞への選択マーカーの導入を含む。次にこれらの細胞を、導入遺伝子を取り込み、それを発現している細胞を単離する選択下に置く。得られた組換え細胞は当技術分野で公知の種々の方法により宿主へ送達することができる。好ましい実施形態では、遺伝子送達に用いる細胞は宿主細胞自身のものである。

【0061】

本発明はまた、有効量のPTMまたはPTMをコードする核酸および製薬上許容される担体を含んでなる医薬組成物も提供する。特定の実施形態では、「製薬上許容される」とは、連邦政府または州政府の規制機関によって認可されているか、または米国薬局方またはその他動物用、より好ましくはヒト用として汎用されている薬局方に挙げられていることを意味する。「担体」とは、それとともに治療薬を投与する希釈剤、アジュバント、賦形剤またはビヒクルをさす。好適な医薬担体の例は、E.W. Martinによる"Remington's Pharmaceutical Sciences"に記載されている。

【0062】

特定の実施形態では、医薬組成物は、(1)例えばそのタンパク質を欠いた、遺伝的に欠陥がある、生物学的に不活性もしくは活性が不十分な、または発現が十分でない宿主で内因性タンパク質または機能が存在しないか、そのレベルが低い(正常または望ましいものに比べて)疾病または疾患、あるいは(2)*in vitro*または*in vivo*アッセイによって特定のタンパク質の機能を阻害するPTMの利便性が示される疾病または疾患、において投与する。PTMにより媒介されるトランススプライシング反応から生じたキメラmRNAによってコードされるタンパク質の活性は、例えば宿主組織サンプル(例えば、生検組織から)を得、*in vit*

10

20

30

40

50

roでmRNAまたはタンパク質レベル、発現したキメラmRNAの構造および／または活性に関してアッセイすることで容易に検出することができる。このように、限定されるものではないが、キメラmRNAによりコードされるタンパク質を検出および／または可視化する免疫アッセイ（例えば、ウェスタンブロット、免疫沈降とその後のドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動、免疫組織化学など）、および／またはキメラmRNAの存在を検出および／または可視化することによるキメラmRNAの発現の形成を検出するハイブリダイゼーションアッセイ（例えば、ノーザンアッセイ、ドットブロット、in situハイブリダイゼーションおよび逆転写PCRなど）などをはじめとする、当技術分野で標準的な多くの方法を利用することができる。

【0063】

本発明はまた、有効量のPTMまたはPTMをコードする核酸、および製薬上許容される担体を含んでなる医薬組成物も提供する。特定の実施形態では、「製薬上許容される」とは、連邦政府または州政府の規制機関によって認可されているか、または米国薬局方またはその他動物用、より好ましくはヒト用として汎用されている薬局方に挙げられていることを意味する。「担体」とは、それとともに治療薬を投与する希釈剤、アジュバント、賦形剤またはビヒクルをさす。好適な医薬担体の例は、E.W. Martinによる"Remington's Pharmaceutical Sciences"に記載されている。特定の実施形態では、本発明の医薬組成物は治療を必要とする領域に局所投与するのが望ましい。これは限定されるものではないが例えば、手術中の局所注入(local infusion)、例えば術後の外傷用医薬材料と組み合わせた局所適用、注射、カテーテル、坐剤、あるいはインプラント(インプラントはシアラスティック(sialastic)メンブランまたはファイバーなどの膜をはじめとする多孔質、非多孔質、またはゼラチン素材のものである)によって達成できる。ナノ粒子、徐放性ポリマー、ヒドロゲルなどの母材など、その他の放出制御性薬物送達系もある。

【0064】

PTMはターゲッティングされる細胞で所望の作用をもたらすのに有効な量で投与する。PTMの有効用量は生物学的半減期、バイオアベラビリティおよび毒性などのパラメーターに着目する当業者に周知の手法によって決定することができる。有効である本発明の組成物の量は治療する疾病または疾患の性質によって異なり、標準的な臨床技術によって決定することができる。さらにまた、最適用量範囲を確定する助けとして所望によりin vitroアッセイを用いてもよい。

【0065】

本発明はまた、本発明の医薬組成物の1以上の成分を、所望により容器を伴い、充填させた1以上の容器を含んでなる医薬パックまたはキットも提供し、このような容器は医薬または生物製品の製造、使用または販売を規制する政府機関によって規定された形態で認知でき、なお、この認知はヒトにおける投与を目的とする製造、使用または販売の政府機関による認可を反映している。

【0066】

5.3.2 エキシソンのタグ付けのためのPTM分子の使用

ヒトその他の生物のゲノムを配列決定し、特性解析する現在の努力を鑑みれば、このような特性解析を容易にする方法が必要である。ゲノムマッピングおよびシーケンシングによって現在得られる情報の大部分はmRNAのcDNAへの逆転写によって作出される相補的DNA(cDNA)ライブラリーから得られるものである。残念なことに、このプロセスはイントロン配列およびエキソン／イントロン境界の位置に関する情報を欠落させる。

【0067】

本発明は、(i)プレトランススプライシング分子とプレmRNA分子を、そのプレトランススプライシング分子の一部が標的プレmRNAへとトランススプライシングされてキメラmRNAを形成するような条件下で接触させ、(ii)そのキメラmRNA分子を増幅し、(iii)増幅した分子を選択的に精製し、さらに(iv)増幅した分子のヌクレオチド配列を決定し、それによりイントロン-エキソン境界を決定することを含んでなる、プレmRNA分子のエキソン-イントロン境界をマッピングする方法を包含する。

【0068】

本発明のある実施形態では、プレmRNA分子のエキソン-イントロン境界を位置決定するためのトランススプライシング反応でPTMを用いることができる。イントロン-エキソン境界のマッピングに用いるPTMは上記第5.1節のものと類似した構造を有する。具体的にはPTMは多くのプレmRNAと結合するようにデザインされた標的結合ドメイン、(ii)分岐点、ピリミジントラクトおよび3' スプライス受容部位、または5' スプライス供与部位を含む3' スプライス領域、(iii)そのmRNAスプライス部位を標的結合ドメインから離すスペーサー領域、および(iv)プレmRNAへとトランススプライシングされるタグ領域を含む。あるいは、エキソン-イントロン境界を位置決定するのに用いるPTMは標的結合ドメインを含まないように操作することもできる。

10

【0069】

イントロン-エキソンマッピングのためには、ランダムヌクレオチド配列を含む標的結合ドメインを含むようにPTMを遺伝子操作する。このランダムヌクレオチド配列は、プレmRNAと結合してそれをつなぎ止めることができる少なくとも15~30で数百までのヌクレオチド配列を含み、これにより核のスプライセオソームプロセッシング機構がPTMの一部(タグまたはマーカー領域)をプレmRNAの一部へとトランススプライシングすることができる。短い標的結合ドメインを含有する、またはイノシンを含有するPTMはストリンジェントでない条件下でプレmRNA分子と結合する。さらに、強い分岐点配列およびピリミジントラクトはPTMトランススプライシングの非特異性を増強する働きをする。

【0070】

PTM分子において標的結合ドメインとして用いるランダムヌクレオチド配列は、限定されるものではないが、制限エンドヌクレアーゼによるDNAの部分消化、またはDNAの物理的剪断をはじめとする様々な異なる方法を用いて作出することができる。このようなランダムヌクレオチド配列の使用は、細胞内で発現した各標的プレmRNAに関して種々の結合活性を有するPTM分子の膨大なアレイを作出するようにデザインされる。オリゴヌクレオチドのランダムライブラリーは、遺伝子操作されたPTM分子をプラスミドベクターへクローニングするための各末端にある適当な制限エンドヌクレアーゼ認識部位を用いて合成することができる。ランダムオリゴヌクレオチドを連結して発現させると、ランダムなPTMの結合ライブラリーが得られる。

20

【0071】

本発明の特定の実施形態では、ランダムヌクレオチド配列を含んでなる標的結合ドメインを含むPTM分子をコードする発現ライブラリーは当業者に周知の種々の方法を用いて作出することができる。理想的には、このライブラリーは細胞内で発現した各標的プレmRNAと相互作用しうるPTM分子を含むのに十分複雑なものである。

30

【0072】

例を挙げれば、図9はイントロン-エキソン境界のマッピングに利用できる2形態のPTMの模式図である。左のPTMはプレmRNA3' スプライス部位へと非特異的にトランススプライシングされうるが、右のPTMはプレmRNA5' スプライス部位へとトランススプライシングされうる。PTMと標的プレmRNAとの間のトランススプライシングの結果、原型エキソンの3' または5' いずれかの末端に特定のヌクレオチド配列「タグ」を有するキメラmRNA分子が産生される。

40

【0073】

選択的精製の後、PTMのタグヌクレオチド配列内で始まり、タグ付けされたエキソン配列へと進行するプライマーを用いてDNAシーケンシング反応を行う。このタグヌクレオチド配列の最後のヌクレオチドのすぐ後の配列がエキソン境界を表す。イントロン-エキソンタグの同定のためには、当業者に周知の方法を用いてin vitroまたはin vivoのいずれかで本発明のトランススプライシング反応を行うことができる。

【0074】

5.3.3. 細胞内で発現したタンパク質の同定のためのPTM分子の使用

本発明のさらにもう1つの実施形態では、PTMにより媒介されるトランススプライシング反

50

応は細胞内で発現する、これまでには検出されなかった未知のタンパク質を同定するために使用できる。この方法は、とりわけタンパク質サイズが小さい、あるいはタンパク質が低濃度であるために二次元電気泳動または他の方法では検出できない、あるいは二次元電気泳動では他のタンパク質と同様の移動パターンを示すためにタンパク質を検出できないタンパク質の同定に特に有用である。

【0075】

本発明は、(i)ランダムな標的結合ドメインおよびペプチドタグをコードするヌクレオチド配列を含有するプレトランススプライシング分子とプレmRNA分子を、そのプレトランススプライシング分子の一部が標的プレmRNAの一部へとトランススプライシングされて融合ポリペプチドをコードするキメラmRNAを形成するような条件下で接触させるか、あるいはゲル電気泳動によってそれを分離し、(ii)融合ポリペプチドをアフィニティー精製する、さらに(iii)融合タンパク質のアミノ酸配列を決定することを含んでなる、細胞内で発現したタンパク質を同定する方法に関する。

【0076】

細胞内で発現したタンパク質を同定するためには、本発明のPTMを、(i)ランダム化ヌクレオチド配列を含んでなる標的結合ドメイン、(ii)分岐点、ピリミジントラクトおよび3'スプライス受容部位および／または5'スプライス供与部位を含む3'スプライス領域、(iii)そのPTMスプライス部位を標的結合ドメインから離すスペーサー領域、および(iv)マーカーまたはペプチドアフィニティー精製タグをコードするヌクレオチド配列を含むように遺伝子操作する。このようなペプチドタグとしては、限定されるものではないが、HISタグ(6ヒスチジン連続残基)(Janknechtら, 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972-8976)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)(Smith, D.B.およびJohnson, K.S., 1988, Gene 67:31)(Pharmacia)またはFLAG(Kodak/IBI)タグ(Nisson, J.ら, J. Mol. Recognit., 1996, 5:585-594)が挙げられる。

【0077】

このようなPTMを用いたトランススプライシング反応の結果、マーカーまたはペプチドアフィニティー精製タグに結合した細胞内で通常発現されるタンパク質配列を含んでなる融合タンパク質をコードするキメラmRNA分子が形成される。このような方法の望ましい到達点は細胞内で合成された全てのタンパク質がマーカーまたはペプチドアフィニティータグを受け取り、それにより細胞内で発現した各タンパク質を同定する方法を提供することである。

【0078】

本発明の特定の実施形態では、ランダムヌクレオチド配列を含んでなる種々の標的結合ドメインを有するPTMをコードするPTM発現ライブラリーを作製する。望ましい到達点は細胞内で発現した各プレmRNAに結合しうるPTMを産生するに十分複雑なPTM発現ライブラリーを作り出すことである。好ましい実施形態では、このライブラリーを哺乳類発現ベクターにクローニングし、1個の細胞につき1つ、またはせいぜい数個のベクターが存在するようにする。

【0079】

キメラタンパク質の発現を同定するには、宿主細胞をこのPTMライブラリーで形質転換し、1個のPTMベクターを含有する個々のコロニーが増殖および精製可能なようにプレーティングする。単一のコロニーを選択、単離し、適当な培地で増殖させ、例えばアフィニティー精製タグを用い、標識されたキメラタンパク質エキソン断片を他の細胞タンパク質から分離する。例えば、アフィニティークロマトグラフィーはFLAGタグなどのペプチドタグに特異的に結合する抗体の使用を含みうる。あるいは、HISタグを用いる場合には融合タンパク質は、イミダゾールを含有するバッファーで溶出した結合ペプチドを選択的に溶出させるNi²⁺ ニトリロ酢酸アガロースカラムを用いて精製される。GSTタグを用いる場合には融合タンパク質はグルタチオン-S-トランスフェラーゼアガロースビーズを用いて精製する。次にこれらの融合タンパク質は遊離グルタチオンの存在下で溶出させることができる。

【0080】

キメラタンパク質の精製後、分析を行って融合タンパク質のアミノ酸配列を決定する。融合タンパク質のアミノ酸配列はエドマン分解とその後のHPLC、質量分析またはアミノ酸分析を用いたアミノ酸解析など、当業者に周知の技術を用いて決定する。同定したところで、そのペプチド配列をGenBankなどのタンパク質データベースで入手できる配列と比較する。部分的なペプチド配列が既知であれば、さらなる分析は行わない。部分的なタンパク質配列が未知であれば、そのタンパク質のより完全な配列決定を行って全タンパク質配列を決定することができる。融合タンパク質は全長タンパク質の一部のみを含む場合には、全長タンパク質をコードする核酸は通常の方法を用いて単離することができる。例えば、cDNAライブラリーをスクリーニングするためのプローブまたはPCRプライマーとして用いるには、部分タンパク質配列に基づいてオリゴヌクレオチドプライマーを生成することができる。

10

【0081】

6. 実施例： トランススプライシング分子の作製

以下の節はPTMの作製およびこのような分子がトランススプライシング反応を媒介してキメラmRNA分子を産生しうる証明について記載する。

【0082】

6.1. 材料および方法

6.1.1. プレ mRNA 分子の構築

野生型ジフテリア毒素サブユニットA(DT-A, 野生型受託番号#K01722)およびDT-A突然変異体(CRM 197, 酵素活性無し)を含有するプラスミドはDr. Virginia Johnson, Food and Drug Administration, Bethesda, Maryland (Uchidaら, 1973 J. Biol. Chem 248:3838)から入手した。in vitro実験では、DT-Aをプライマー：DT-1F (5'-GGCGCTGCAGGGCGCTGATGAT GTTGTG)、およびDT-2R (5'-GGCGAAGCTTGGATCCGACACGATTTCTGCACAGG)を用いて増幅し、PstIおよびHindIIIで切断し、PstIおよびHindIIIで消化したpBS(-)ベクター(Stratagene, La Jolla, CA)へクローニングした。得られたクローンpDTAを用いて個々のPTMを構築した。(1) pPTM+：ターゲッティング構築物。EcoRIおよびPstIで消化したpDTAへIN3-1(5'-AATT CTCTAGATGCTTCACCCGGGCTGACTCGAGTACTAACTGGTACCTCTTCTTTTTTCTTGCA)およびIN2-4(5'-GGAAAAAAAAAGAGGTACCAGTTAGTACTCGAGTCAGGCCCGGGTGAAGCATCTAGAG)プライマーを挿入することにより作製した。(2) pPTM+Sp：BDとBPの間に30bpのスペーサー配列を有すること
 以外はpPTM+と同じ。pPTM+をXhoIで消化し、オリゴヌクレオチド内でスペーサーS(5'-TCG AGCAACGTTATAATAATGTTC)およびスペーサーAS(5'-TCGAGAACATTATT ATAACGTTGC)を連結することにより作製した。in vivo研究では、pcPTM+SpのEcoRIおよびHindIII断片を哺乳類発現ベクターpcDNA3.1(Invitrogen)のCMVプロモーターの制御下にクローニングした。また、コドン14のメチオニンをイソロイシンに変え、翻訳の開始を妨げた。得られたプラスミドをpcPTM+Spと命名した。(3)pPTM+CRM：野生型DT-AをCRM突然変異体DT-A(T. Uchidaら, 1973, J. Biol. Chem. 248:3838)で置換したこと以外はpPTM+Spと同じ。これはプライマーDT-1FおよびDT-2Rを用いてDT-A突然変異体(G52Eにおける突然変異)のPCR増幅により作製した。in vivo研究では、PTM+CRMのEcoRI HindIII断片をpc3.1DNAにクローニングし、pcPTM+ARMを得た。(4)PTM-：非ターゲッティング構築物。PTM+をEcoRIおよびPst Iで消化し、ゲル精製して結合ドメインを除去した後、オリゴヌクレオチドIN-5(5'-ATCTCTAGATCA GGCCCGGGTGAAGCCCGAG)およびIN-6(5'-TGCTTCACCC GGGCCTGATCTAGAG)を連結することにより作製した。(5)PTM-SpはPstI部位に30bpのスペーサー配列を有すること以外はPTM-と同一のバージョンである。同様に、特定の配列を挿入または欠失させることでスプライス突然変異体[Py(-)AG(-)およびBP(-)Py(-)AG(-)]およびセーフティー変異体[PTM+SF-Py1, PTM+SF-Py2, PTM+SFBP3およびPTM+SFBP3-Py1]を構築した(1参照)。

20

30

40

【表1】

表1. 種々のPTM配列としての結合/非結合ドメイン、BP、PPTおよび3'				
PTM構築物	BD/NBD	BP	PPT	3'ss
PTM+Sp(ターゲッティング)	:TGCTTCACCCGGGCCTGA	TACTAAC	CTCTTCTTTTITTC	CAG
PTM-Sp(非ターゲッティング)	:CAACGTTATAATAATGTT	TACTAAC	CTCTTCTTTTITTC	CAG
PTM+Py(-)AG(-)BP(-)	:TGCTTCACCCGGGCCTGA	GGCTGAT	CTGTGATTAATAGCGG	ACG
PTM+Py(-)AG(-)	:TGCTTCACCCGGGCCTGA	TACTAAC	CCTGGACGCGGAAGTT	ACG
PTM+SF	:CTGGGACAAGGACACTGCTT CACCCGGTTAGTAGACCACA GCCCTGAAGCC	TACTAAC	CTTCTGTTTTTCTC	CAG
PTM+SF-Py	PTM+SFに同じ	TACTAAC	CTTCTGTATTATCTC	CAG
PTM+SF-Py	PTM+SFに同じ	TACTAAC	GTTCTGTCCTGTCTC	CAG
PTM+SF-BP3	PTM+SFに同じ	TGCTGAC	CTTCTGTTTTTCTC	CAG
PTM+SFBP3-Py	PTM+SFに同じ	TGCTGAC	CTTCTGTATTATCTC	CAG

10

太字のヌクレオチドは、正常なBP、PPTおよび3'スプライス部位に対する突然変異を示す。分岐部位Aは下線で示す。イタリックのヌクレオチドはPTMのBP配列をマスクするためにセーフティーBDに導入された誤対合を示す。

20

【0083】

また、二重トランススプライシングPTM構築物(DS-PTM)も、PTM+SFの毒素コード配列の3'末端へ、5'スプライス部位とβ HCGプレmRNAの第2のイントロンに相補的な第2の標的結合ドメインとを付加して作製した(図A)。

【0084】

6.1.2. β HCG6標的プレmRNA

in vitro標的プレmRNAを産生するため、β HCG遺伝子6(受託番号#X00266)のSacI断片をpBS(-)にクローニングした。これによりヌクレオチド460~1265に由来し、5'非翻訳領域、開始コドン、エキソン1、イントロン1、エキソン2およびイントロン2の大部分を含む805bpのインサートが産生された。in vivo研究では、EcoRIおよびBamHI断片を哺乳類発現ベクター(pc3.1DNA)へクローニングし、β HCG6を産生した。

30

【0085】

6.1.3. mRNAの調製

in vitroスプライシング実験では、T7 mRNAポリメラーゼ(Pasman & Garcia-Blanco, 1996, Nucleic Acids Res. 24:1638)を用い、それぞれBamHIおよびHindIIIで消化したプラスミドDNAをin vitro翻訳することにより、β HCG6、β -グロビンプレmRNAおよび種々のPTM mRNAを合成した。合成したmRNAを変性ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動により精製し、産物を切り出し、溶出した。

【0086】

40

6.1.4. in vitroスプライシング

PTMおよび標的プレmRNAを、98°Cで加熱した後に30~34°Cまでゆっくり冷却することによりアニーリングした。各反応物には最終量12.5 μlに、アニーリングしたmRNA複合体4 μl(標的100ngおよびPTM200ng)、1Xスプライスバッファー(2mM MgCl₂、1mM ATP、5mM リン酸クレアチニン、および40mM KCl)およびHeLaスプライス核抽出物(Promega)4 μlを含んだ。反応物を30°Cで示された時間の間インキュベートし、同量の高塩バッファー(7M尿素、5% SDS、100mM LiCl、10mM EDTAおよび10mM TrisHCl, pH7.5)を添加することで反応を停止させた。核酸はフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(50:49:1)で抽出した後、エタノール沈殿させることにより精製した。

【0087】

50

6.1.5. 逆転写-PCR反応

RT-PCR解析はEZ-RT PCRキット(Perkin-Elmer, Foster City, CA)を用いて行った。各反応物には、反応量50 μ l中に、シスまたはトランススプライシングmRNA 10ng、または全mRNA 1~2 μ g、3'および5'特異的プライマー各0.1 μ l、各dNTP 0.3mM、1X EZバッファー(50mM ビシン、115mM酢酸カリウム、4%グリセロール、pH8.2)、2.5mM酢酸マグネシウムおよび5UのrTth DNAポリメラーゼを含んだ。60°Cで45分間逆転写を行った後、得られたcDNAのPCR増幅を以下のようにして行った：初期変性94°C 30秒1サイクル、変性94°C 18秒、60°C 40秒でアニーリングおよび伸張の25サイクル、その後70°Cで7分最終伸張。反応産物はアガロースゲルでの電気泳動によって分離した。

【0088】

本研究で用いたプライマーは以下の通りだった：

DT-1F: GGCCTGCAGGGCGCTGATGATGTTGTTG

DT-2R: GGCAGCTTGGATCCGACACGATTCCTGCACAGG

DT-3R: CATCGTCATAATTCCTTGTG

DT-4R: ATGGAATCTACATAACCAGG

DT-5R: GAAGGCTGAGCACTACACGC

HCG-R2: CGGCACCGTGGCCGAAGTGG

Bio-HCG-F: ACCGGAATTCATGAAGCCAGGTACACCAGG

β -グロブリン-F: GGGCAAGGTGAACGTGGATG

β -グロブリン-R: ATCAGGAGTGGACAGATCC

【0089】

6.1.6. 細胞増殖、トランスフェクションおよびmRNAの単離

ヒト肺癌細胞系H1299(ATCC受託番号#CRL-5803)を37°C、5 % CO₂環境下、10%ウシ胎児血清を補足したRPMI培地で増殖させた。リポフェクタミン試薬(Life Technologies, Gaithersburg, MD)を用い、細胞をpcSp+CRM(CRMは非機能的毒素である)、PTMを発現するベクター、またはベクター単独(pcDNA3.1)でトランスフェクトした。アッセイとしてはトランスフェクション2週間後にネオマイシン耐性(neo^r)コロニー形成に関してスコアした。4つのneo^rコロニーが選択され、neo選択の継続下で拡張した。RNAエキソール(BioChain Institute, Inc., San Leandro, CA)を用いて全細胞mRNAを単離し、RT-PCRに用いた。

【0090】

6.1.7. ヌードマウスの腫瘍におけるトランススプライシング

11個体のヌードマウスの背側側腹皮下部に1x10⁷個のH1299ヒト肺腫瘍細胞を左右に注射した(B10、B11およびB12以外は1腫瘍を持っていた)(1日目)。14日目、マウスに適量の麻酔を施し、数方向の電極ポレーション(T820, BTX Inc., San Diego, CA)をかけながら、またはかけずに、pc β HCG6またはpcPTM+Spを含む、または含まないpcSp+CRM 100 μ gを含有する全量100 μ lの生理食塩水を注射した。右側の腫瘍に注射した溶液には針の軌跡をマークするために墨も加えた。48時間後に動物を屠殺し、腫瘍を摘出し、すぐに-80°Cで凍結した。分析に関しては、各腫瘍10mgをホモジナイズし、製造業者の説明書に従ってダイナビーズmRNAディレクトキット(Dynabeads mRNA direct kit)(Dynal)を用いてmRNAを単離した。精製したmRNA(総量10 μ lのうち2 μ l)を、はじめに記載したような β HCG-FおよびDT-5Rプライマーを用いてRT-PCRに供した。全てのサンプルをDT-3R、ネステッドDT-Aプライマーおよびビオチン化 β HCG-Fを用いて再増幅し、これらの産物を2%アガロースゲルでの電気泳動により分析した。バンドを生じたサンプルをM280ストレプトアビジンダイナビーズを用い処理して一本鎖DNAとし、毒素特異的プライマー(DT-3R)を用いて配列決定した。

【0091】

6.2. 結果

6.2.1. PTMの合成

18ntの標的結合ドメイン(β HCG6イントロン1に相補的)、30ヌクレオチドのスペーサー領域、分岐点(BP)配列、ポリピリミジントラクト(PPT)、およびジフテリア毒素サブユニッ

10

20

30

40

50

トA(DT-A)をコードするエキソンのすぐ上流の3'スプライス部位にAGジヌクレオチドを含む原型トランススプライシングmRNA分子pcPTM+Sp(図1A)を構築した(Uchidaら, 1973, J. Biol. Chem. 248:3838)。その後、DT-Aエキソンをコドン14の翻訳開始部位を除去するように改変した。トランススプライシングを証明するためにPTM構築物は最大活性となるようデザインされていることから、それらは効力のある3'スプライスエレメント(酵母BPおよび哺乳類PPT)(Mooreら, 1993, In The mRNA World, R.F. GestelandおよびJ.F. Atkins編(Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press)を含んでいた。β HCG6プレmRNA(Talmadgeら, 1984, Nucleic Acids Res. 12:8415)を、この遺伝子が大部分の腫瘍細胞で発現されることから、モデル標的として選んだ。これは脳下垂体および性腺などいくつかの例外があるが、正常な成体細胞では発現しない(Acevedoら, 1992, Cancer 76:1467; Hoonら, 1996, Int J. Cancer 69:369; Belletら, 1997, Cancer Res. 57:516)。図1Cに示されているように、pcPTM+Spは、β HCG6イントロン1の3'末端を有するその結合ドメインにより、通常のワトソン・クリック塩基対を形成して標的のイントロン3'スプライスシグナルをマスクする。この特徴は標的とPTMの間のトランススプライシングを促進するようにデザインされている。

10

【0092】

HeLa核抽出物を確立されたスプライシング手順(Pasman & Garcia-Blanco, 1996, Nucleic Acids Res. 24:1638)とともに用い、PTM構築物がβ HCG6プレmRNA標的に侵入することができるかどうかを調べた。in vitroトランススプライシング産物はキメラmRNA分子に特異的なプライマーを用いてRT-PCRにより検出した。トランススプライシング反応が成功したと推定される産物は、β HCG6の最初のエキソンのすぐ後にDT-AをコードするpcPTM+Spに由来するエキソンを含んでなるキメラmRNAである(図1C)。このようなキメラmRNAはプライマーβ HCG-F(β HCG6エキソン1特異的)およびDT-3R(DT-A特異的, 図2Aレーン1~2)を用い、RT-PCRにより容易に検出された。0時間またはATPの不在下では466bpの産物は見られず、このことはこの反応がATPと時間双方に依存的であったことを示す。

20

【0093】

pcPTM+Spの標的結合ドメインはβ HCG6イントロン1プレmRNAに相補的な18個のヌクレオチドを含み、効率的なトランススプライシングを示した(図2Aレーン1~2)。相補的でない18個のヌクレオチドの「非結合ドメイン」を含む非ターゲティングPTM-Spを用いた場合には、トランススプライシング効率は少なくとも8倍低下した(図2レーン3~4)。結合ドメインとBPの間にスペーサーを含む、または含まないPTM mRNAのトランススプライシング効率も比較した。この実験から、スペーサーの付加によりトランススプライシング効率が有意に上昇することが証明された(図2Bレーン2+5)。効率的なトランススプライシングに必要なスプライシング因子の補充を容易にするためには、3'スプライス部位と、結合ドメイン/標的相互作用によって生じた二本鎖二次構造の間にスペースがいくらか必要であると思われる。

30

【0094】

トランススプライシング特異性におけるPTM長の影響を検討するため、AccIで切断したPTMプラスミドからより短いPTMを合成した(図1参照)。これによりDT-Aコード配列の3'末端から479個のヌクレオチドが除去された。図2Bは非ターゲティングの短いPTM(-)(レーン14~17)に比較した場合のターゲティングの短いPTM(+)(レーン10~12)のトランススプライシング能力を示している。短いPTM+は他方、非ターゲティングの短いPTM(図2Bレーン17)よりも実質的により多くのトランススプライシング産物(図2Bレーン12)を産生した。これらの実験から、より長いPTMほどトランススプライシングを非特異的に媒介する能力が高い可能性があることを示す。

40

【0095】

6.2.2. PTMスプライセオソームにより媒介されるトランススプライシングの精度

pcPTM+Spとβ HCG6標的との間のトランススプライシングが正確かどうかを確認するため、5' ビオチン化β HCG-Fおよび非ビオチン化DT-3Rプライマーを用いてRT-PCR増幅産物を産生した。この産物を一本鎖DNAに変換し、MitchellおよびMerril(1989, Anal. Biochem. 1

50

78:239)の方法を用い、プライマー-DT-3R(DT-A特異的リバープライマー)で直接配列決定した。トランススプライシングは推定されるスプライス部位の間で正確に起こっており(図3)、スプライシングの際、従来のプレmRNAが操作されたPTM構築物の侵入を受けることができ、さらにこの反応が正確なものであることが確認された。

【0096】

さらに、二重スプライシング PTM(DS-PTM)の選択的トランススプライシングが見られた(図8B)。DS-PTMは3'または5'いずれかのスプライス部位に寄与することでトランススプライシングをもたらす。また、3'および5'の両部位で同時に二重トランススプライシングしてエキソン置換を可能とするであろうDS-PTMも構築することができる。図8Bはこの構築物で5'スプライス部位が標的β HCGプレmRNA:DS-PTMが1:1の濃度の際に最も活性があることを示している。1:6の比率では3'スプライス部位がより活性がある。

10

【0097】

6.2.3. 3'スプライス部位はPTMのトランススプライシングに不可欠である

一般に3'スプライス部位は1)受容部位の5'側に位置するBP配列、2)ピリミジン残基の短い連なりからなるPPT、および3)イントロン-エキソン境界のYAGトリヌクレオチドスプライス部位アクセプターの3つのエレメントを含む(Senapathyら, 1990, Cell 91:875; Mooreら, 1993)。これらの配列エレメントのうちの1つが欠失または変更されるとスプライシングが低下または起こらないことが知られている(Aebiら, 1986; Reed & Maniatis 1988, Genes Dev. 2:1268; Reed, 1989, Genes Dev. 3:2113; Roscignoら, 1993, J. Biol. Chem. 268:11222; Coolidgeら, 1997, Nucleic Acids Res. 25:888)。これらの保存されたエレメントの標的トランススプライシングにおける役割に実験的に取り組んだ。1つの場合[(BP(-)Py(-)AG(-))]は、3つのシスエレメントを全て(BP、PPTおよびAGジヌクレオチド)をランダムな配列で置換した。PPTおよび3'スプライス部位アクセプターが突然変異され、ランダム配列で置換されたもう1つのスプライシング突然変異体[(Py(-)AG(-))]を構築した。in vitroトランススプライシングを支持しうる構築物はなく(図2Aレーン5~8)、このことは通常のスプライシングの場合と同様、PTMトランススプライシングプロセスも3'スプライス部位に機能的BP、PPTおよびAGアクセプターを必要とすることを示唆するものである。

20

【0098】

6.2.4. 特異性を高めるための「セーフティー」スプライス部位の開発

結合ドメインの包摂またはPTMの短縮によって達成される標的特異性のレベルを改善するため、いくつかのPTM構築物の標的結合ドメインを、3'スプライス部位をマスクする分子内システムを作り出すよう改変した(「セーフティーPTM」と呼ぶ)。PTM 3'スプライス部位領域またはそれらに隣接する配列と部分的に塩基対合し、それにより標的捕捉の前にPTM 3'スプライス部位に対するスプライセオソーム成分の接近を遮断する結合ドメインの一部によってセーフティシステムが形成される(図4A, PTM+SF)。PTM結合ドメインとβ HCG6標的領域の自由な部分間の塩基対合はセーフティシステムを解除し、U2AFなどのスプライシング因子をPTM 3'スプライス部位へ結合させ、トランススプライシングを開始する(図4B)。

30

【0099】

この概念をPTM+SF(セーフティー)またはpcPTM+Sp(線状)のいずれか、および標的(β HCG6)および非標的(β -グロビン)プレmRNAの両者を含有するスプライシング反応において試験した。これらのスプライシング産物は次にRT-PCRおよびゲル電気泳動により解析した。β HCG-FおよびDT-3Rプライマーを用いたところ、β HCG標的および線状PTM(pcPTM+Sp, 図5レーン2)またはセーフティーPTM(PTM+SF, 図5レーン8)のいずれかを含む反応において特異的196bpトランススプライシングバンドが示された。線状PTM(図5レーン2)とセーフティーPTM(図5レーン8)の間の標的トランススプライシングの比較により、セーフティーPTMの方が線状PTMよりもトランススプライシングが効率的でなかったことが示された。

40

【0100】

非ターゲティング反応物はβ -グロビン-F(β -グロビンのエキソン1に特異的)および DT

50

-3Rプライマーを用いて増幅した。 β -グロビンプレmRNAによる非特異的PTMトランススプライシングによって産生された推定産物は189bpである。非特異的トランススプライシングは線状PTMと β -グロビンプレmRNAの間のものであることが明らかであった(図5レーン5)。これに対し、非特異的トランススプライシングはセーフティーPTMを用いることで事実上なくなった(図5レーン11)。線状PTMはスプライセオソームにより媒介されるトランススプライシングの概念を証明するために最大活性となるようにデザインされていることから、このことは予期されないことではなかった。その効力のある3'スプライス部位と組み合わせた線状PTMの開環構造はスプライシング因子の結合を強く促進する。一度結合すれば、これらのスプライシング因子は、トリパノソーマにおけるトランススプライシングと同様のプロセスでいずれかの5'スプライス部位でトランススプライシングを潜在的に開始することができる。セーフティーステムはU2AFなどのスプライシング因子が標的捕捉の前にPTMに結合するのを防ぐようにデザインされた。この結果は結合ドメインの自由な部分と β HCG6標的の間の塩基対合がセーフティーステムを解除し(mRNA-mRNA相互作用による)、3'スプライス部位のカバーが除かれ、スプライシング因子の補充およびトランススプライシングの開始を可能とするというモデルと一致する。 β -グロビンと β HCG6プレmRNAの間ではトランススプライシングは検出されなかった(図5レーン3、6、9および12)。

10

【0101】

6.2.5. セーフティーPTMおよび変異体のin vitroトランススプライシング

トランススプライシングにおける3'スプライス部位でのシスエレメントの役割をよりよく理解するために、プリンで置換することによりPPTを弱め、かつ／または塩基置換によりBPを改変した一連のセーフティーPTM変異体を構築した(表I参照)。セーフティー(PTM+SF)のin vitroトランススプライシング効率を3つのセーフティー変異体と比較したところ、トランススプライシング能の低下が示された。最も大きな作用は変異体2 (PTM+SFPy2)で見られ、トランススプライシング不能であった(4Cレーン5~6)。このトランススプライシングの障害はPPTを弱めたこと、かつ／またはセーフティーステムのT_mがより高いことによるものと思われる。これに対し、BP配列中の変異(PTM+SFBP3)はトランススプライシングに著しい作用はなかった(図4Cレーン7~8)。導入された改変は哺乳類分岐点共通領域YN YURAC(ここでY=ピリミジン、R=プリン、およびN=任意のヌクレオチド)(Mooreら, 1993)内であったことから、このことは驚くことではなかった。この知見は、分岐点配列がスプライシング効率に影響を及ぼすことなく除去できることを示す。PPTの変更(PTM+SF-Pyl)はトランススプライシングレベルを低下させた(レーン3~4)。同様に、BPとPPTの両者を変更した場合(PTM+SFBP3-Pyl)、トランススプライシングにさらなる低下を引き起こした(図4Cレーン9~10)。これらのセーフティー変異体のトランススプライシング効率の順は、PTM+SF>PTM+SFBP3>PTM+SFPy1>PTM+SFBP3-Pyl>PTM+SFPy2である。これらの結果から、PPTおよびBPの双方がin vitroトランススプライシングの効率に重要なものである(Roscignoら, 1993, J. Biol. Chem. 268:11222)ことが確認される。

20

30

【0102】

6.2.6. シスおよびトランススプライシング間の競合

PTMの濃度を引き上げるによりプレmRNAシススプライシングが遮断できるかどうかを調べるために、反応をトランススプライシングへ向ける実験を行った。スプライシング反応は一定量の β HCG6プレmRNA標的および種々の濃度のトランススプライシングPTMを用いて行った。シススプライシングは、 β HCG-F(エキソン1)および β HCG-R2(エキソン2)に対するプライマーを用いるRT-PCRによりモニタリングした。これにより、予測された125bpのシススプライシング産物と478bpの非スプライシング産物が増幅された(図6A)。プライマー β HCG-FおよびDT-3Rを用いてトランススプライシング産物を検出した(図6B)。より低いPTM濃度では、シススプライシング(図6Aレーン1~4)はトランススプライシング(図6Bレーン1~4)よりも優勢であった。シススプライシングは標的よりも1.5倍高いPTM濃度でおよそ50%低下した。標的濃度3倍までPTM mRNA濃度を高めると、シススプライシングが90%を超えて阻害され(図6Aレーン7~9)、これに伴いトランススプライシング産物が上昇した(図6Bレーン6~10)。1回の反応で3つのプライマー(β HCG-F、HCG-R2およびDT-3R)全てを

40

50

含むことでシスおよびトランス双方のスプライシング産物を同時に増幅させるために競合的RT-PCRを行った。この実験は図6で見られる同様の結果を示し、*in vitro*条件下でPTMは標的プレmRNAのシススプライシングを効率的に遮断し、それを操作されたトランススプライシングキメラmRNAの産生に置き換えることを示している。

【0103】

6.2.7. 組織培養におけるトランススプライシング

細胞培養モデルにおいてトランススプライシング機構を証明するために、ヒト肺癌系H1299(β HCG6陽性)をSP+CRM (非機能的ジフテリア毒素)を発現するベクターまたはベクター単独(pcDNA3.1)でトランスフェクトし、ネオマイシンの存在下で増殖させた。14日後に4つのネオマイシン耐性コロニーを個別に回収し、引き続きネオマイシンの存在下で拡張した。各クローンから全mRNAを単離し、プライマー β HCG-FおよびDT-3Rを用いRT-PCRにより分析した。これにより、選択された4クローンのうち3クローンで推定される196bpのトランススプライシング産物が得られた(図7Aレーン2、3および4)。クローン#2由来の増幅産物を直接配列決定したところ、PTMにより駆動されるトランススプライシングがヒト細胞において内因的に発現した β HCG6標的エキソン1とDT-Aの最初のヌクレオチドの推定スプライス部位で正確に起こったことが確認された(図7B)。

10

【0104】

6.2.8. *in vivo*モデルにおけるトランススプライシング

トランススプライシングの*in vivo*機構を証明するために、以下の実験を無胸腺(ヌード)マウスで行った。腫瘍は背側側腹皮下部位に 10^7 個のH1299細胞を注射することにより確立した。14日目、PTM発現プラスミドを腫瘍に注射した。次に大部分の腫瘍をエレクトロポレーションに供し、プラスミドの送達を促進した(以下の表2参照)。48時間後、腫瘍を摘出し、ポリ-A mRNAを単離し、RT-PCRにより増幅した。19のPTM処理腫瘍のうち8つでトランススプライシングが検出された。1回目のRT-PCRの後、2サンプルでmRNAから推定されるトランススプライシング産物(466bp)が生じた。続いてネスティッドプライマーセットを用いた2回目のPCR増幅によりさらに6つの腫瘍がトランススプライシング陽性となり、これらは推定196bpの産物を生じた(表2)。各陽性サンプルを配列決定したところ、 β HCG6エキソン1は推定スプライス部位でDT-A(野生型またはCRM突然変異体)のコード配列へと正確にトランススプライシングされたことが示された。6つの陽性サンプルは、同時トランスフェクションプラスミドpcPTM+CRMおよびpcHCG6を受容した処理群に由来し、標的プレmRNA濃度を高めた。これはトランススプライシング事象を検出できる確率を高めるために行った。他の2つの陽性腫瘍は、pcPTM+Sp(野生型DT-A)のみを受容した群に由来するものであった。これらの腫瘍は β HCG6発現プラスミドでトランスフェクトされたものではなく、ここで再び、第6.2.7節に記載された組織培養モデルと同様に、PTMと腫瘍細胞によって産生された内因性 β HCG6プレmRNAの間でトランススプライシングが起こったことが示された。

20

30

【表2】

表2. ノードマウスの腫瘍におけるトランススプライシング

マウス	プラスミド	左 右	エレクトロポレーション	RT-PCR 左 右	ネステッドPCR	ヌクレオチド配列
B1	PCMV-Sport	B1-1 B1-2	-	- -	- -	- -
B2	PCMV-Sport	B1-3 B1-4	^a 1000V/cm	- -	- -	- -
B3	pcSp+CRM	B3-1 B3-2	^a 1000V/cm	- -	- -	- -
		B3-3 B3-4	^a 1000V/cm	- -	- -	- -
B4	pcSp+CRM	B4-1 B4-2	^b 50V/cm	- -	- -	- -
		B4-3 B4-4	^c 25V/cm	- -	- -	- -
B5	PcSp+CRM/ pcHCG6	B5-1 B5-2	^a 1000V/cm	+ -	+ +	ATGTTCCAG GGCGTGATGA (配列番号53)
		B5-3 B5-4	^a 1000V/cm	+ -	- +	ATGTTCCAG GGCGTGATGA (配列番号53)
B6	PcSp+CRM/ pcHCG6	B6-1 B6-2	^b 50V/cm	- -	- -	- -
		B6-3 B6-4	^c 25V/cm	- -	+ +	ATGTTCCAG GGCGTGATGA (配列番号53)
B7	pc PTM+Sp	B7-1	^a 1000V/cm	-	-	-
B8	Pc PTM+Sp	B8-1	^b 50V/cm	-	+	ATGTTCCAG GGCGTGATGA (配列番号53)
B9	Pc PTM+Sp	B9-1	-	-	+	ATGTTCCAG GGCGTGATGA (配列番号53)

^a: 99 μ s の3パルスセットを6パルス直交印加

^b: 10ms の4パルスセットを8パルス直交印加

^c: 50ms の4パルスセットを8パルス直交印加

⁺: RT-PCRトランススプライシング産物陽性

¹: エレクトロポレーションを受けず

【0105】

7. 実施例: lacZトランススプライシングモデル

特異的プレmRNA標的とPTMの間の、スプライセオソームにより媒介される標的トランススプライシングの機構の普遍性を証明および評価するために、 β -ガラクトシダーゼ酵素の発現に基づく簡単なモデル系を開発した。以下の節では特異的標的とPTMの間の、スプライセオソームにより媒介される標的トランススプライシングの成功を示す結果について記載する。

【0106】

7.1. 材料および方法

7.1.1. プライマー配列

以下のプライマーをlacZモデル系の試験に用いた:

5' Lac-1F

GCATGAATTCGGTACCATGGGGGGTTCTCATCATCATC

5' Lac-1R

CTGAGGATCCTCTTACCTGTAAACGCCATACTGAC

3' Lac-1F

GCATGGTAACCCTGCAGGGCGGCTTCGTCTGGGACTGG

3' Lac-1R

CTGAAAGCTTGTTAACTTATTATTTTTGACACCAGACC
 3'Lac-Stop
 GCATGGTAACCCCTGCAGGGCGGCTTCGTCTAATAATGGGACTGGGTG
 HCG-In1F
 GCATGGATCCTCCGGAGGGCCCCCTGGGCACCTTCCAC
 HCG-In1R
 CTGACTGCAGGGTAACCGGACAAGGACACTGCTTCACC
 HCG-Ex2F
 GCATGGTAACCCCTGCAGGGGCTGCTGCTGTTGCTG
 HCG-Ex2R
 CTGAAAGCTTGTTAAACCAGCTCACCATGGTGGGGCAG
 Lac-TR1(ビオチン): 7-GGCTTTCGCTACCTGGAGAGAC
 Lac-TR2 GCTGGATGCGGCGTGCGGTGCG
 HCG-R2: CGGCACCGTGGCCGAAGTGG

10

【0107】

7.1.2. lacZ プレ mRNA 標的分子の構築

lacZ 標的 1 プレ mRNA (pc3.1 lacT1) は以下 3 つの PCR 産物: (i) lacZ の 5' 断片、その後 (ii) β HCG6 イントロン 1、および (iii) lacZ の 3' 断片をクローニングすることにより構築した。lacZ 遺伝子の 5' および 3' 断片を、以下のプライマー: 5' Lac-1F および 5' Lac-1R (5' 断片用) と 3' Lac-1F および 3' Lac-1R (3' 断片用) を用い、鋳型 pcDNA3.1/His/lacZ (Invitrogen, San Diego, CA) から PCR 増幅した。増幅された lacZ 5' 断片は 1788bp の長さであり、開始コドンを含み、増幅された 3' 断片は 1385bp の長さであり、分岐点、ポリピリミジントラクトおよび β HCG6 イントロン 1 の他、天然型の 5' および 3' スプライス部位を有する。 β HCG6 イントロン 1 は以下のプライマー: HCG-In1F および HCG-In1R を用いて PCR 増幅した。

20

【0108】

lacZ 標的 2 は、フレーム内の 3' スプライス部位の 4 コドン後に 2 つの停止コドン (TAA TAA) を含むこと以外は lacZ 標的 1 と同じバージョンである。これは、以下のプライマー: 3' Lac-Stop および 3' Lac-1R を用いて 3' 断片 (lacZ) を PCR 増幅し、lacZ 標的 1 の機能的 3' 断片を置き換えることによって作製した。

【0109】

7.1.3. pc3.1 PTM1 および pc3.1 PTM2 の構築

プレトランススプライシング分子 pc3.1 PTM1 は、pPTM+Sp を PstI および HindIII で消化し、DT-A 毒素をコードする DNA 断片を lacZ の機能的 3' 末端をコードする DNA 断片で置き換えることによって作製した。この断片は以下のプライマー: 3' Lac-1F および 3' Lac-1R を用いて PCR 増幅により生成した。細胞培養実験については、HCG イントロン 1 に対する結合ドメイン、30bp のスペーサー、酵母分岐点 (TACTAAC)、および強力なポリピリミジントラクトの後にクローニングされた lacZ を含む pc3.1 PTM2 の EcoRI および HindIII 断片を pcDNA3.1 へクローニングした。

30

【0110】

プレトランススプライシング分子 pc3.1 PTM2 は、pPTM+Sp を PstI および HindIII で消化し、DT-A 毒素をコードする DNA 断片を β HCG6 エキソン 2 で置き換えることによって作製した。 β HCG6 エキソン 2 は以下のプライマー: HCG-Ex2F および HCG-Ex2R を用いる PCR 増幅により生成した。細胞培養実験については、HCG イントロン 1 に対する結合ドメイン、30bp のスペーサー、酵母分岐点 (TACTAAC)、および強力なポリピリミジントラクトの後にクローニングされた β HCG6 エキソン 2 を含む pc3.1 PTM2 の EcoRI および HindIII 断片を用いた。

40

【0111】

7.1.4. 293T 細胞への lacZ スプライス標的 プレ mRNA と PTM の同時トランスフェクション

ヒト胚性腎細胞 (293T) を 37°C、5% CO₂ 下、10% FBS を補足した DMEM 培地で増殖させた。製造業者の説明書に従い、リポフェクタミンプラス (Life Technologies, Gaithersburg, MD) を用い、pc3.1 LacT1 と pc3.1 PTM2、または pc3.1 LacT2 と pc3.1 PTM1 で細胞を同時トラン

50

スフェクトした。トランスフェクションの24時間後に細胞を回収し、全RNAを単離し、標的およびPTM分子に特異的なプライマーを用いてRT-PCRを行った。また、 β -gal染色キット(Invitrogen, San Diego, CA)を用いて細胞を染色することにより β -ガラクトシダーゼ活性をモニタリングした。

【0112】

7.2. 結果

7.2.1. lacZスプライス標的は機能的 β -ガラクトシダーゼを産生するために効率的にシススプライシングする

スプライス標的プレmRNAの効率的シススプライス能を調べるため、リポフェクタミンプラス(Life Technologies, Gaithersburg, MD)を用い、pc3.1 lacT1を293T細胞へトランスフェクトした後、全RNAのRT-PCR解析を行った。シススプライシングRT-PCR産物の配列解析により、スプライシングが正確であり、かつ、推定されるスプライス部位で正確に起こったことが示された(図12B)。さらに、標的プレmRNA分子の正確なシススプライシングの結果、 β -ガラクトシダーゼの加水分解を触媒する活性型 β -ガラクトシダーゼ、すなわち、X-galをコードしうるmRNAが形成され、顕微鏡下で視認できる青色を呈する。標的プレmRNAの正確なシススプライシングは β -ガラクトシダーゼの酵素活性が検出できることでさらに確認された。

10

【0113】

機能的3' lacZ断片(PTM1)のトランススプライシングによる欠陥型lacZ標的2プレmRNAの修復は、 β -ガラクトシダーゼの酵素活性を染色することで測定した。この目的で、293T細胞をlacZ標的2プレmRNA(欠陥型3'断片を含む)およびPTM1(正常3' lacZ配列を含む)で同時トランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後に β -ガラクトシダーゼ酵素活性に関して細胞をアッセイした。PTM1の、lacZ標的2プレmRNAへの効率的なトランススプライシングの結果、機能的 β -ガラクトシダーゼ活性が生じるだろう。図11B~Eで示されているように、PTM1のlacZ標的2へのトランススプライシングの結果、 β -ガラクトシダーゼ酵素活性が対照の5%~10%まで回復する。

20

【0114】

7.2.2. lacZ標的プレmRNAとPTM2の間の標的トランススプライシング

トランススプライシングをアッセイするため、lacZ標的プレmRNAとPTM2を293T細胞にトランスフェクトした。トランスフェクション後、全RNAをRT-PCRを用いて分析した。以下のプライマーをPCR反応に用いた：lacZ-TR1(lacZ 5'エキソン特異的)およびHCGR2(β HCGRエキソン2特異的)。このRT PCR反応は推定される195bpのトランススプライシング産物を産生したが(図11レーン2および3)、これはlacZ標的プレmRNAとPTM2の間の効率的なトランススプライシングを示すものである。レーン1はPTM2を含まない対照を示す。

30

【0115】

また、トランススプライシングの効率は β -ガラクトシダーゼ酵素活性を染色することにより測定した。トランススプライシングをアッセイするため、293T細胞をlacZ標的プレmRNAおよびPTM2で同時トランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後に細胞を β -ガラクトシダーゼ活性に関してアッセイした。標的プレmRNAとPTMの間に効率的なトランススプライシングが存在すれば、lacZ標的プレmRNAの5'断片からなるキメラmRNAが生じ、活性型の β -ガラクトシダーゼをコードすることができない β HCG6エキソン2が形成される。これらの同時トランスフェクション実験の結果から、PTM2の、lacZ標的1へのトランススプライシングの結果、対照に比べて β -ガラクトシダーゼ活性が低下したことが示された。

40

【0116】

lacZ標的プレmRNAとPTM2の間のトランススプライシングが正確であることをさらに確認するために、5'ビオチン化lacZ-TR1および非ビオチン化HCGR2プライマーを用いてRT-PCRを行った。一本鎖DNAを単離し、HCGR2プライマー(HCGエキソン2特異的プライマー)を用いて直接配列決定を行った。スプライシング部位の配列によって明らかのように、トランススプライシングは推定されるスプライス部位の間に正確に起こっており(図12Aおよび12B)、

50

スプライシングの際に通常のpre-mRNAに操作されたPTMが侵入でき、さらにこの反応が正確であることが確認された。

【0117】

8. 実施例： 囊胞性繊維症膜貫通調節タンパク質遺伝子のコレクション

囊胞性繊維症(CF)は世界でも最も一般的な遺伝病の1つである。CFに関連する遺伝子が単離され、そのタンパク質産物が推定されている(Kerem, B.S.ら, 1989, Science 245:1073-1080; Riordanら, 1989, Science 245:1066-1073; Rommansら, 1989, Science 245:1059-1065)。CF関連遺伝子のタンパク質産物は囊胞性繊維症膜貫通コンダクタンス調節タンパク質(CFTR)と呼ばれている。全ての突然変異体対立遺伝子の約70%を占める最も一般的な病因突然変異は508番のフェニルアラニンをコードするエクソン10の3つのヌクレオチドの欠失である($\Delta F508$)。以下の節ではスプライセオソームにより媒介されるトランススプライシングを用いた囊胞性繊維症遺伝子の修復の成功について記載し、モデル系でCFTR修復の実現可能性を示す。

10

【0118】

8.1. 材料および方法

8.1.1. プレトランススプライシング分子

CFTRプレトランススプライシング分子(PTM)はCFTRイントロン9(3'末端、-13~-31)に相補的な23個のヌクレオチドの結合ドメイン、30個のヌクレオチドのスペーサー領域(スプライセオソーム成分の効率的な結合を可能とする)、分岐点(BP)配列、ポリピリミジントラクト(PPT)およびCFTRエクソン10($\Delta F508$ を含む野生型配列)をコードする配列のすぐ上流にある3'スプライス部位のAGジヌクレオチドからなる。この最初のPTMはトランススプライシングを証明するために最大活性となるようにデザインされていることから、従ってPTMはUACUAAC酵母共通BP配列と延長PPTを含んでいた。内因性CFTRではなくトランススプライシング産物の特異的増幅および単離を可能とするため、野生型エクソン10コード配列の後に18個のヌクレオチドのHISタグ(6ヒスタミンコドン)を含んだ。この2つの断片の生成に用いたオリゴヌクレオチドは、増幅されたDNAの哺乳類発現ベクターpcDNA3.1への指向性クローニングを容易にする特有の制限部位を含んでいた(それぞれApalとPstI、およびPstIとNotI)。

20

【0119】

8.1.2. 標的CFTRpre-mRNAミニ遺伝子

CFTRミニ遺伝子標的は図13に示され、CFTRエクソン9、イントロン9の機能的5'および3'領域(それぞれ各末端から260および265ヌクレオチド)、エクソン10[$\Delta F508$]、およびイントロン10の5'領域(96ヌクレオチド)からなる。さらに図16に示されているように、CFTRエクソン1~9および10~24を含むミニ標的遺伝子を用いて囊胞性繊維症突然変異のコレクションに対するスプライセオソームにより媒介されるトランススプライシングの使用を試験できる。図17は囊胞性繊維症突然変異のコレクションに対しても用いることができる二重スプライシングPTMを示す。示されているように、二重スプライシングPTMはCFTR BDイントロン9、スペーサー、分岐点、ポリピリミジントラクト、3'スプライス部位、CFTRエクソン10、スペーサー、分岐点、ポリピリミジントラクト、5'スプライス部位およびCFTR BDエクソン10を含む。

30

40

【0120】

8.1.3. オリゴヌクレオチド

以下のオリゴヌクレオチドを用いてCFTR PTMを作製した：

フォワード CF3

ACCT GGGCCC ACC CAT TAT TAG GTC ATT AT CCGCGG AAC ATT ATA

ApaI 部位 インترون9CFTR, -12~-34

リバーズ CF4

ACCT CTGCAGGTGACC CTG CAG GAA AAA AAA GAA G

PstI. BstEI. PPT.

フォワード CF5

ACCT CTGCAG ACT TCA CTT CTA ATG ATG AT

PstI. エキソン10CFTR, +1~+24

リバーズ CF6ACCT GCGGCCGC CTA ATG ATG ATG ATG ATG ATG CTC TTC TAG TTG GCA
TGC

NotI. ストップ ポリヒスタミンタグ エキソン10 CFTR, +15~+132

10

20

【0121】

以下のヌクレオチドを用いてCFTR標的プレmRNAミニ遺伝子(エキソン9 +ミニイントロン9+エキソン10+5'末端イントロン10)を作製した:

フォワード CF18

GACCT CTCGAG GGA TTT GGG GAA TTA TTT GAG

XhoI エキソン9CFTR, 1~21.

リバーズ CF19

CTGACCT GCGGCCGC TAC AGT GTT GAA TGT GGT GC

NotI. インترون9 5' 末端

フォワード CF20

CTGACCT GCGGCCGC CCA ACT ATC TGA ATC ATG TG

NotI. インترون9 3' 末端

リバーズ CF21

GACCT CTTAAG TAG ACT AAC CGA TTG AAT ATG

AflIII インترون10 5' 末端

30

40

【0122】

以下のオリゴヌクレオチドを用いてトランススプライシング産物を検出した:

リバーズ Bio-His

CTA ATG ATG ATG ATG ATG ATG

ストップ、ポリヒスチジンタグ(5' ビオチン標識)

リバーズ Bio-His(2)

CGC CTA ATG ATG ATG ATG ATG

3' UT ストップ、ポリヒスチジンタグ(5' ビオチン標識)

フォワード CF8

CTT CTT GGT ACT CCT GTC CTG

エキソン9 CFTR .

10

フォワード CF18

GACCT CTCGAG GGA TTT GGG GAA TTA TTT GAG

XhoI. エキソン9 CFTR

リバーズ CF28

AAC TAG AAG GCA CAG TCG AGG

Pc3. 1 ベクター配列(PTM3' UT に存在するが標的には存在しない)

20

【0123】

8.2. 結果

PTMおよび標的プレmRNAをリポフェクタミン(Life Technologies, Gaithersburg, MD)を用いて293胚性腎細胞に同時トランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後に細胞を回収し、RNAを単離した。RT-PCR反応でPTMおよび標的の特異的プライマーを用い、標的プレmRNAの突然変異体エキソン10がPTMの野生型エキソン10で置換されたトランススプライシング産物を検出した(図14)。トランススプライシング産物の配列解析から、3つのヌクレオチド欠失が回復し、そのスプライシングが正確であり、推定されるスプライス部位で起こっている(図15)ことが確認され、嚢胞性繊維症遺伝子CFTRのはじめてのRNA修復が示された(Mansfieldら, 2000, Gene Therapy 7: 1885-1895)。

【0124】

9. 実施例：二重トランススプライシング

以下の実施例は標的プレmRNAと、3'および5'両スプライス部位を含むPTM RNAの間の二重トランススプライシングにより内部エキソンが正確に置換され、機能上活性な全長タンパク質の産生が導かれることを示すものである。

【0125】

本明細書に記載のように、いずれのプレmRNAでも、3'-スプライス部位、5'-スプライス部位の一方または双方を含むトランス反応RNA分子を提供することで再プログラムすることができる。以下の実施例では、5'および3'両スプライス部位を含むプレトランススプライシング分子(PTM)を用いた単一の内部エキソンのターゲティングおよび置換の成功を記載する。このようなPTMはスプライセオソームにより媒介される意図した標的遺伝子との2つのトランススプライシング反応を促進することができる。この機構を試験するため、lacZ 5'「エキソン」-CFTR ミニイントロン9-CFTRエキソン10(ΔF508)-CFTRミニイントロン10、続いてlacZ 3'「エキソン」からなるスプライシングlacZモデル標的遺伝子を作製した。この標的転写物では、β-ガラクトシダーゼORFの124bp中央部がCFTRのエキソン10(ΔF508)に置換されていたことから、従ってそれは非機能的タンパク質を産生する。124bp lacZ「ミニエキソン」の欠失、ならびに標的イントロンおよびエキソンに相補的な結合ドメイン(BD)を含む5'および3'トランススプライシングドメインからなるPTMを作製した

50

。HEK 293T細胞を標的単独またはPTM単独のいずれかでトランスフェクトしたところ、検出可能なレベルの β -gal活性は見られなかった。これに対し、標的+PTMでトランスフェクトした293T細胞は実質的レベルの β -gal活性を生じ、タンパク質機能の回復を示した。標的とPTMの間のトランススプライシングの精度は、推定内部エキソン置換が明らかとなった適当なRT-PCR産物を配列決定することで確認した。疾病モデルでこのアプローチの実現可能性を、嚢胞性繊維症において CFTR Δ F508エキソン10を、F508を含む正常なエキソン10で置換することにより調べた。これらの結果は、トランススプライシング技術が、それらが遺伝子の5'エキソンまたは3'エキソンに関するものであれ、またはいずれかの内部エキソンに関するものであれ、遺伝子欠陥の多くを修正するよう容易に適合させることができることを示す。

10

【0126】

図18はlacZ 5'エキソン-CFTRミニイントロン9-CFTRエキソン10(Δ 508)-CFTRミニイントロン10、続いてlacZ 3'エキソンからなるモデルlacZ標的の模式図である。この標的では、lacZ遺伝子の124bp中央部分を、508番に突然変異を有する(Δ 508)CFTRエキソン10で置換されている。このプレmRNA標的は通常のシススプライシングを受けて、lacZ 5'エキソン-CFTRエキソン10(Δ 508)、続いてlacZ 3'エキソンかなるmRNAを産生する。 β -ガラクトシダーゼORFが破壊されているため、これは機能のない末端切断型タンパク質を産生する。

【0127】

二重トランススプライシングにより β -gal機能を回復させるため、図19に示されるように、124bp lacZ「ミニエキソン」の欠失、ならびに標的イントロンおよびエキソンに相補的な結合ドメインを含む5'および3'トランススプライシングドメインからなる3つのPTMを製作した。これらのPTMは、3'エキソン置換で用いるPTM24(下記参照)由来の120bpの3'結合ドメイン(イントロン9に相補的)、スパーサー配列、酵母分岐点、ポリピリミジントラクト、3'アクセプターAGジヌクレオチド、lacZ「ミニエキソン」、5'スプライス部位、スパーサー配列、続いて5'結合ドメインを有する。これらのPTMは5'結合ドメイン配列のみが異なる。DSPTM5はイントロン10に相補的で、標的の5'スプライス部位だけを遮断する27bpのBDを有する。DSPTM6は120bpの5'BDを有し、標的の5'および3'両スプライス部位にわたり、一方DSPTM7は両スプライス部位(5'および3')をマスクし、また標的のエキソン全体にわたる260bpのBDを有する。

20

【0128】

DSPTM7とDSCFT1.6標的プレmRNAとの結合を示す二重トランススプライシング反応の模式図は図20に示されている。3'BDはミニイントロン9に相補的な120bpの結合ドメイン；5'BD(260bp)はミニイントロン10およびエキソン10に相補的な第2の結合ドメイン；ssはスプライス部位；BPは分岐点；およびPPTはポリピリミジントラクト。

30

【0129】

DSPTM7の重要な構造要素(図21)は以下の通りである：

(1) 3' BD (120 BP):

GATTCACTTGCTCCAATTATCATCCTAAGCAGAAGTGTATATTCTTA
TTTGTAAGATTCTATTAACCTCATTTGATTCAAAATATTTAAAATACTTCCT
GTTTCATACTCTGCTATGCAC

(2) スペーサー配列 (24bp) : AACATTATTATAACGTTGCTCGAA

(3) 分岐点、ピリミジントラクトおよびスプライス受容部位:

3' ss

BP Kpn 1 PPT EcoRV ↓ lacZ ミニエキソン

TACTAAC T GGTACC TCTTCTTTTTTTTTT GATATC CTGCAG |GGC GGC|

(4) 5' 供与部位および第2 スペーサー配列:

5' ss

lacZ ミニエキソン ↓

|TGA ACG| GTAAGT

GTTATCACCGATATGTGTCTAACCTGATTCGGGCCTTC

GATACGCTAAGATCCACCGG

(5) 5' BD (260 BP):

TCAAAAAGTTTTACATAATTTCTTACCTCTTCT
TGAATTCATGCTTTGATGACGCTTCTGTATCTATATTC
ATCATTGGAAACACCAATGATTTTTCTTTAATGGTGCC
TGGCATAATCCTGGAAAACCTGATAACACAATGAAATT
CTTCCACTGTGCTTAAAAAAACCTCTTGAATTCTCCA
TTTCTCCCATAATCATCATTACAACCTGAACCTCTGGAAA
TAAAACCCATCATTATTAACCTCATTATCAAATCACGC

【0130】

β-gal機能の回復がRNAトランススプライシング媒介性のものかどうかを決定するため、突然変異体を図22に示す。DSPTM8は、BPなどの3'スプライスエレメント、ポリピリミジントラクトおよび3'アクセプターAGジヌクレオチドが欠失され、ランダムな配列に置き換えられた3'スプライス突然変異体である。このPTMはなお3'および5'結合ドメインならびに機能的5'スプライス部位を有している。PTM29は第2の結合ドメインおよび5'ssを欠くが、なお3'結合ドメイン3'スプライス部位を有し、一方、PTM30は第1の結合ドメインおよび3'スプライス部位を欠くが、機能的5'スプライス部位および第2の結合ドメインを有している。

【0131】

二重トランススプライシングにより媒介されるβ-gal機能の回復を調べるため、リポフェクタミンプラス試薬を用い、293T細胞を2μgの標的またはPTM単独でトランスフェクトするか、あるいは2μgの標的および1.5μgのPTMで同時トランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、全RNAを単離し、K1-1FおよびLac-6Rプライマーを用いRT-PCRにより解析した。これらのプライマーは一回の反応でシスおよびトランスの両スプライシング産物を増幅し、これらは大きさに基づいて同定した。シススプライシング産物の大きさは295bpであり、一方トランススプライシング産物の大きさは230bpである。DSPTM7とDSCFT1.6プレmRNAの間のトランススプライシングが正確であることを確認するため、RT-PCR増幅産物を切り出し、K1-2FおよびLac-6Rプライマーを用いて再増幅し、K1-2FまたはLac-6Rプライマーを用いて直接配列決定した。図23に示されているように、トランススプライシン

10

20

30

40

50

グは推定スプライス部位で正確に起こっており、2つのトランススプライシング事象による正確な内部エクソン置換が確認された。

【0132】

欠陥型lacZプレmRNAの二重トランススプライシング事象による修復とそれに続く全長β-galタンパク質の産生は同時トランスフェクションアッセイで検討した。293T細胞をDSCFT1.6標的およびDSPTM7発現プラスミドで同時トランスフェクトすると同時に対照としてDSCFT1.6標的またはDSPTM7単独でトランスフェクトした。ポリクローナル抗β-ガラクトシダーゼ抗血清を用いた全細胞溶解物のウエスタンブロット解析はDSCFT1.6標的+DSPTM7プラスミドで同時トランスフェクトした細胞でのみ約120kDaのタンパク質を特異的に認識したが(図24レーン3および4)、DSCFT1.6標的(レーン1)またはDSPTM7プラスミド単独(レーン2)でトランスフェクトした細胞では認識しなかった。同様に、DSCFT1.6標的+3'スプライス突然変異体(レーン5および6)、または3'トランススプライシングドメインもしくは5'トランススプライシングドメインが欠失されたPTM29もしくは30(レーン7)で同時トランスフェクトした細胞では全長タンパク質は検出されなかった。さらに、120kDaのタンパク質バンドはlacZ-T1プラスミドを用いて産生された機能的な全長β-galと同時に移動した(陽性対照、データは示されていない)。これらの結果は標的とPTMの間の二重トランススプライシングによる全長タンパク質の産生を確認するだけでなく、このプロセスには3'スプライス部位および5'スプライス部位の双方が不可欠であることを示した。

【0133】

標的プレmRNAとDSPTM7 RNAの間の二重トランススプライシングにより産生された全長タンパク質が機能的に活性であるかどうかを決定するため、293T細胞をDSCFT1.6ターゲッティング+二重スプライシングPTM5、6または7発現プラスミドの1つで同時トランスフェクトするか、またはDSCFT1.6標的もしくはDSPTM7単独でトランスフェクトした。全細胞抽出液を調製し、ONPGアッセイ(Invitrogen)を用いてβ-gal活性に関してアッセイした。DSCFT1.6標的またはDSPTM7のいずれか単独でトランスフェクトした細胞から調製した抽出液におけるβ-gal活性はモック(mock)トランスフェクションで検出されたバックグラウンドレベルとほぼ同じであった(図25)。これに対し、DSCFT1.6標的およびDSPTM7で同時トランスフェクトした293T細胞はバックグラウンドの約21倍高いレベルのβ-gal活性を生じた(図25)。これらの結果により、標的プレmRNAとPTM RNAの間の正確な二重トランススプライシングと機能的な全長タンパク質の産生が確認された。

【0134】

二重トランススプライシング反応によるβ-gal活性の回復がPTMの3'および5'両スプライス部位の存在に絶対的に依存するものであることを確認するため、本発明者らはいくつかの突然変異体を構築した：(a)DSPTMBは機能的3'スプライスエレメント(分岐点、ポリピリミジントラクトおよび3'アクセプターAGジヌクレオチド)が欠失され、ランダムな配列で置換されていたこと以外はDSPTM7に同じである(詳細は図22を参照)；(b)PTM29は5'スプライス部位ならびに5'結合ドメインを欠くが、3'結合ドメインおよび3'スプライス部位を有する；および(c)PTM30は3'結合ドメインおよび3'スプライス部位を欠くが、5'スプライス部位および5'結合ドメインを有する。DSCFT1.6標的またはDSPTM7のいずれか単独でトランスフェクトした細胞から調製した抽出液におけるβ-gal活性はモックトランスフェクションで検出されたバックグラウンドレベルとほとんど同じであった(図26)。同様に、DSPTM8単独(3'スプライス部位突然変異体)でトランスフェクトした細胞またはDSCFT1.6標的+上記突然変異体PTMの1つでの同時トランスフェクションではβ-gal活性の有意な上昇は検出されなかった。他方、機能的3'および5'スプライス部位を有するDSCFT1.6標的およびDSPTM7で同時トランスフェクトした細胞はバックグラウンドを超える実質的なレベルのβ-gal活性を生じた(図26)。これらの結果によって二重スプライシングPTMには両スプライス部位が必要であることが確認され、また、β-gal活性の回復が末端切断型タンパク質間の相補性によるものであったという可能性が排除された(図26)。

【0135】

種々の濃度の標的およびPTMを同時トランスフェクトしβ-gal活性の回復に関してアッセ

イした。予測されたように、DSCFT1.6標的+DSPTM7で同時トランスフェクトした293T細胞は対照を超える実質的なレベルの β -gal活性(約30倍)を示した。PTM濃度を2および3倍引き上げると、 β -gal活性レベルは上昇するが、有意なものではなかった(図27)。これらの結果によって、二重トランススプライシングにより媒介される β -gal酵素機能の回復がさらに確認された。

【0136】

二重トランススプライシング反応の特異性は、特異的標的(DSCFT1.6)に類似するが、CFTRミニイントロン9-CFTRエキソン10(Δ 508)およびCFTRミニイントロン10の代わりに β HCGイントロン1- β HCGエキソン2および β HCGイントロン2を有する非特異的標的(DSHCGT1.1)を構築することにより調べた(図28)。DSHCGT1.1(非特異的標的)単独またはDSPTM7(DSCFT1.6標的にターゲッティングされている)と組み合わせてトランスフェクトした細胞から単離した全RNAのRT-PCR解析では、予測された314bpの二重トランススプライシング産物を生じなかった。他方、特異的標的+PTMで同時トランスフェクトした細胞から調製した全RNAのRT-PCR解析では予測された314bpの産物が生じた。このことはさらに全細胞抽出液の β -gal活性アッセイによっても確認された。非特異的標的単独またはDSCFT1.6標的にターゲッティングされたDSPTM7と組み合わせてトランスフェクトした細胞で検出される β -gal活性レベルはバックグラウンドレベルとほとんど同じであった。これに対し、特異的標的(DSCFT1.6)+DSPTM7で同時トランスフェクトした細胞では実質的なレベルの β -gal活性が検出された(図27)。これらの結果によって、二重トランススプライシングが高度に特異的であることが確認された。

【0137】

図30の修復モデルは、エキソン1~9、ミニイントロン9、 Δ 508突然変異を含むエキソン10、ミニイントロン10およびエキソン11~24からなる標的CFTRプレmRNAの部分を示す(図30)。図で示されるPTMはエキソン10コード配列(コドン508を含む)、および各々その固有のスプライシングエレメント(受容部位および供与部位、分岐点およびピリミジントラクト)およびイントロン9スプライス部位に相補的な結合ドメインを有する2つのトランススプライシングドメイン、エキソン10の部分(5'および3'末端)およびイントロン10 5'スプライス部位からなる(図31(DS-CF1))。PTMのエキソン10も、PTMのエキソン10と、その固有の、またエキソン配列に相補的な結合ドメインを有するPTMのためでもある結合ドメインとの間のアンチセンス作用を軽減するに至る改変されたコドン利用も有する(図31)。PTMと標的の間の二重トランススプライシング事象は修復された全長mRNAを生じるはずである。

【0138】

図32はPTM20エキソン10へと正確にスプライシングされた標的エキソン9(改変コドンを有する)(上のパネル)、PTMのエキソン10のコドン508(中央のパネル)、および標的エキソン11へと正確にスプライシングされたPTMエキソン10(下のパネル)を示す単一のPCR産物の配列を示す。修復された標的の配列はRT-PCRの後にPCRを行うことで生成した。

【0139】

10. 実施例： 5'エキソン置換を遂行しうるPTMを用いた嚢胞性繊維症遺伝子のトランススプライシング修復

遺伝子修復に5'エキソン置換を用いる重要な利点は、

- (a)遺伝子の5'部分の置換が可能となること、
 - (b)その構築物が全長遺伝子構築物よりも小さな配列およびスペースしか必要としないこと、
 - (c)PTM翻訳を妨げると考えられるポリAシグナルを欠いたPTMが産生できること、および
 - (d)翻訳を増強するために5'末端を改変できること
- である。

【0140】

10.1. 材料および方法

10.1.1. プラスミドの構築

PTM30のCFTRコード配列(エキソン1~10)は、部分cDNAプラスミド鋳型(61160; American T

10

20

30

40

50

ype Culture Collection, Manassas, VA)を用いてPCRにより生成した。トランススプライシングドメイン(TSD)[結合ドメイン、スパーサー配列、ポリピリミジントラクト(PPT)、分岐点(BP)および3'スプライス部位を含む]は、PCR産物(既存のプラスミド鋳型を使用)からオリゴヌクレオチドをアニーリングすることにより生成した。次に種々の断片(TSDおよびコード配列)を適当な制限部位を用いてpcDNA3.1(-)へクローニングした。オリゴデオキシヌクレオチドプライマーはSigma Genosys (The Woodlands, TX)から入手した。PCR産物は全てREDTaq (Sigma, St. Louis, MO)またはクローニングPfu(Stratagene, La Jolla, CA)DNAポリメラーゼのいずれかを用いて生成した。増幅のためのPCRプライマーは指向性クローニングのための制限部位を含んだ。PCR産物を適当な制限酵素で消化し、哺乳類発現プラスミドpc3.1DNA(-)(Invitrogen, Carlsbad, CA)へクローニングした。

10

【0141】

10.2. 細胞培養およびトランスフェクション

リポフェクタミンプラス(Life Technologies, Gaithersburg, MD)を用い、構築物をヒト胚性腎(HEK)293Tまたは293細胞(1.25×10^6 細胞/60mmポリ-d-リジンコーティングディッシュ)に同時トランスフェクトし、トランスフェクションの開始から48時間後に細胞を回収した。製造業者の説明書(Epicenter Technologies, Inc.)に記載のようにして全RNAを単離した。HEK 293T細胞を10%v/vウシ胎児血清(Hyclone, Inc., Logan, UT)を補足したダルベッコ改変イーグル培地(Life Technologies)で増殖させた。細胞は全て37°C、5% CO₂下の加湿インキュベーターで維持した。

20

【0142】

10.1.3. 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(TR-PCR)

RT-PCRはEZ-RT-PCRキット(Perkin-Elmer, Foster, CA)を用いて行った。各反応物には反応量40 µl中に0.03~1.0 µgの全RNAおよび80ngの5'および3'特異的プライマーを含んだ。RT-PCR産物は2% Seakenアガロースゲルで電気泳動に付した。トランススプライシング産物を生成するのに用いたPTM特異的および標的特異的オリゴヌクレオチドはそれぞれ、5'-CGCTGGAACACGAGCTTGTG-3' (プライマーCF93)および5'-ACTCAGTGTGATTCCACCTTCTC-3' (プライマーCF111)である。シススプライシング産物を生成するのに用いたPTM特異的および標的特異的オリゴヌクレオチドはCF1およびCF93であった。オリゴヌクレオチドCF1の配列は、5'-GACCTCTGCAGACTTCACTTCTAATGATGATTATGG-3'である。

30

【0143】

図33の修復モデルは、エキソン1~9、ミニイントロン9、Δ508突然変異を含むエキソン10、ミニイントロン10およびエキソン11~24からなる標的CFTR プレ-mRNA部分を示す(図33)。図に示されているPTMはエキソン1~10コード配列(コドン508を含む)、ならびにその固有のスプライシングエレメント(供与部位、分岐点およびピリミジントラクト)および結合ドメインを有するトランススプライシングドメインからなる。種々の結合ドメインを有するいくつかのPTMを構築した。3つの例を図34に示している。図34Aでは、結合ドメインはイントロン9のスプライス部位およびエキソン10の一部に相補的である(3'末端; CF-PTM11)。図34Bでは、PTMはエキソン10の5'末端およびイントロン9の3'スプライス部位にもわたる延長結合ドメインを有する(CF-PTM20)。最後の例(図34C)では、結合ドメインは、結合ドメインがエキソン10の全長に及んでいること以外はパネルBで示されたものと同じである(CF-PTM30)。最後の場合では、PTMエキソン10は、その固有の結合ドメインによるアンチセンス作用を軽減するために改変されたコドン利用を有する(図34)。結合ドメインのさらなる例は図35に示されている。

40

【0144】

図36はシスおよびトランススプライシング産物の配列を示している。図36Aの上のパネルはその3つのヌクレオチド(CTT)が欠失した標的エキソン10を示し、一方下のパネルはともに正確にスプライシングされた標的のエキソン10および11を示す。図36Bは1つのPCR産物の部分配列であり、PTMのエキソン10における改変コドン(上のパネル)、PTMのエキソン10のコドン508(中央のパネル)、および標的エキソン11へと正確にスプライシングされたPTMエキソン10(下のパネル)を示し、これはトランススプライシングが正確であることを示す

50

。修復された標的の配列はRT-PCR、その後にPCRを行うことにより生成した。

【0145】

11. 実施例： 長い結合ドメイン(不連続であってもよい)を有するPTMはトランススプライシング効率および特異性を増大させる

11.1. 材料および方法

11.1.1. 細胞培養

ヒト胚性腎細胞(293または293T)はthe University of North Carolina tissue culture facility at Chapel Hill (Chapel Hill, NC)に由来した。細胞は37°C、5% CO₂の加湿インキュベーターにて、10%v/vウシ胎児血清(Hyclone, Logan, UT)を補足したダルベッコ改変イーグル培地(Life Technologies, Bethesda, MD)に維持した。0.5%トリプシンを用いて2〜3日毎に細胞を継代し、所望の密度で再プレーティングした。内因性の突然変異体lacZ プレ mRNA(lacZCF9)を発現する安定した細胞を0.5mg/ml G418(Calbiochem, San Diego, CA)の存在下で維持した。

【0146】

11.1.2. 組換えプラスミド

標的： pc3.1lacZCF9、pc3.1lacZCF9m、およびpc3.1lacZHCG1m。pc3.1lacZCF9は通常のlacZプレmRNAをコードしており、5'エキソンとしてlacZコード配列であるヌクレオチド1〜1788、CFTRミニイントロン9、それに続くlacZコード配列であるヌクレオチド1789〜3174を3'エキソンとして用いて構築された。これは、lacZ 3'エキソンにおける停止コドンを含まず、β HCG6イントロン1の代わりにCFTRミニイントロン9を有すること以外はpc3.1lacZ-T2と同様のものである(図37A)。CFTRミニイントロン9は鋳型としてのプラスミドT5およびプライマーCFIN-9F(5'-CTAGGATCCCGTTCTTTTGTTCCTTCACT ATTA)とCFIN-9R(5'-CTAGGGTTACCGAAGTAAAACCATACTTATTAG、下線は制限部位)を用いてPCR増幅し、BamHIおよびBstEIIで消化し、pc3.1lacZ-T2プラスミドのBHCG6イントロン1の代わりにクローニングした。pc3.1lacZCF9mは欠陥型のlacZプレmRNAを発現するが、3'エキソン内に2つのナンセンスコドンを含むこと以外はpc3.1lacZCF9と同一である(図37A)。pc3.1lacZHCG1mはキメラ標的であり、lacZ 5'エキソン、それに続くβ HCG6のイントロン1およびエキソン2を含む。これは変異型lacZ 3'エキソンの代わりにβ HCG6のエキソン2を含むこと以外はpc3.1lacZCF9mと同様のものである。β HCG6エキソン2は、鋳型DNAとしてのβ HCG6プラスミド(アクセッション番号X00266)およびプライマーHCGEx-2F(5'-GCATGGTTACCCTGCAGGGGCTGCTGCTGTGCTG)とHCGEx-2R(5'-CTGAAAGCTTGTTAACCAGCTCACCATGGTGGGGCAG、下線は制限部位)を用いてPCR増幅し、BstEIIおよびHindIIIで消化し、pc3.1lacZCF9mのlacZ 3'エキソンに代えるようにクローニングした。プラスミドpcDNA3.1/HisB/lacZ(Invitrogen, Carlsbad, CA)をDNA鋳型として用いて5'および3' lacZエキソンを作製した。lacZ 5'エキソンは1788bpの長さであり、ATG開始コドンを含み、lacZ 3'エキソン(停止コドンを含まない)は1385bpの長さであり、3'エキソンの末端に転写終結シグナルを有する。CFTRミニイントロン9およびβ HCG6イントロン1はそれぞれ548bpおよび352bpの長さであり、両者とも5'および3'スプライスシグナルを有する。β HCG6のエキソン2は162bpの長さであり、エキソンの末端に転写終結シグナルを有する。

【0147】

プレトランススプライシング分子(PTM)： PTM-CF14はトランススプライシングドメインのマイナーな改変を有する、pcPTM1と同様の形態のものである(図37B)。PTM-CF14は線状形態であり、CFTRミニイントロン9に相補的な23bpのアンチセンス結合ドメイン(BD)(5'-ACCCATCATTATTAGGTCATTAT)、18bpのスペーサー、標準的な分岐点配列(UACUAAC; BP)および延長されたポリピリミジントラクト(PPT)、それに続き通常のlacZ 3'エキソンを含む。PTM-CF22、PTM-CF24、PTM-CF26およびPTM-CF27はBDの長さが異なること以外はPTM-CF14と同一である(図37B)。sPTM-CF18は32bpのBDを有し、またsPTM-CF22およびsPTM-CF24はそれぞれPTM-CF22およびPTM-CF24と同じBDを含む。これらのPTMでは、PTMの3'スプライス部位をマスクするために分子内ステムループ構造(「セーフティー」)を作り出すように結合ドメインを改変した。種々の結合ドメインは、特異的プライマー(唯一のNheIおよびSacII部

位を含む)および鋳型としてCFTRミニイントロン9を含むプラスミドを用いるPCR増幅によって作製した。PCR産物はNhe IおよびSac IIで消化し、そしてそれを、スパーサー配列、3'スプライスエレメント(BP、PPTおよびアクセプターAGジヌクレオチド)、それに続く通常のlacZ 3'エキソンからなるPTMプラスミド中へクローニングした。

【0148】

11.1.3. プラスミドDNAの293T細胞へのトランスフェクション

トランスフェクション前日に 1×10^6 個の293T細胞を、細胞の接着を高めるためにポリ-D-リジンでコーティングした60mmプレート(Sigma, St. Louis, MO)にプレーティングし、37°Cで24時間増殖させた。標準的なプロトコールに従い、リポフェクタミンプラス試薬(Life Technologies, Bethesda, MD)を用い、細胞を発現プラスミドでトランスフェクトした。典型的な同時トランスフェクションでは、2 μ gのpc3.1lacZCF9m標的および1.5 μ gのPTM発現プラスミドを細胞中にトランスフェクトし、また対照(標的およびPTM単独トランスフェクション)としてはpcDNA3.1ベクターを用い、全DNA濃度を3.5 μ gに標準化した。

10

【0149】

トランスフェクションの48時間後、プレートをPBSですすぎ、細胞を回収し、マスターピュア(Master Pure) RNA/DNA精製キット(Epicenter Technologies, Madison, WI)を用いて全RNAまたは全DNAを単離した。RNA調製物中の夾雑DNAはDNアーゼIで処理することによって除去し、一方、DNA調製物中の夾雑RNAは37°Cで30~45分間RNアーゼAで消化することによって除去した。

【0150】

11.1.4. 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)

EZrTth RNA PCRキット(Perkins-Elmer, Foster City, CA)を用い、製造業者が示したようにしてRT-PCRを行った。典型的な反応(50 μ l)には25~500ngの全RNA、100ngの5'標的特異的プライマー(シスおよびトランススプライシング産物に共通)(Las-9F, 5'-GATCAAATCTGTCGATCCTTCC)および100ngの3'プライマー(Las-3R, 5'-CTGATCCACCCAGTCCCATTA、シススプライシングのための標的特異的プライマー; およびLac-5R, 5'-GACTGATCCACCCAGTCCCA、トランススプライシングのためのPTM特異的プライマー)、1 $\times$ 逆転写バッファー(100mM Tris-HCl, pH8.3, 1 mM MnCl₂を含む900mM KCL)、200 μ M dNTPsおよび10単位のrTth DNAポリメラーゼを含めた。RT反応では、60°Cにて45分の後、94°Cにて30秒の予熱、次いで94°Cにて18秒と60°Cにて1分のアニーリングおよび伸長とのPCR増幅25~35サイクル、その後70°Cにて7分の最終伸長を行った。反応生成物はアガロースゲル電気泳動によって解析した。

20

30

【0151】

11.1.5. タンパク質の調製および β galアッセイ

発現プラスミドでトランスフェクトした細胞から、凍結解凍法にて全細胞タンパク質を単離し、 β -galアッセイキット(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて β -ガラクトシダーゼ活性をアッセイした。タンパク質濃度は、Bio-Radタンパク質アッセイ試薬(BIO-RAD, Hercules, CA)を用いた色素結合アッセイによって測定した。

【0152】

11.1.6. ウェスタンブロット

約5~25 μ gの全タンパク質を7.5% SDS-PAGEゲル上で電気泳動に付し、さらにPVDF-P膜(Millipore)へエレクトロブロッティングした。室温で1時間ブロッキングした後(ブロッキングバッファー: 1 $\times$ PBS中、5%のドライミルクおよび0.1%のTween-20)、そのブロットを室温で1時間、ポリクローナルウサギ抗 β -ガラクトシダーゼ抗体(Research Diagnostics Inc., NJ)の1:2500希釈液とともにインキュベートし、ブロッキングバッファーで3回洗浄し、次に、1:5000希釈の抗ウサギHRPコンジュゲート二次抗体とともにインキュベートした。室温で1時間インキュベートした後、ブロッキングバッファー中で3回洗浄し、ECL Plusウェスタンブロッティング試薬(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)を用いて呈色させた。

40

【0153】

50

11.1.7. in situ β -gal染色

β -gal染色キット(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用い、細胞の機能的 β -ガラクトシダーゼの発現をモニタリングした。 β -gal陽性細胞のパーセンテージは、無作為に選択した5~10個の視野で染色細胞対非染色細胞を算出することによって求めた。

【0154】

11.1.8. 内因性欠陥型lacZプレmRNA標的を発現するネオマイシン耐性クローンの選択

1日目に 1×10^6 個の293細胞を60mmプレートにプレーティングして37°Cで24時間増殖させた。2日目、上記のようにリポフェクタミンプラス・トランスフェクション試薬を用い、2 μ gのpc3.1lacZCF9mで細胞をトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、0.5mg/mlのG418を含有する培地中に細胞を希釈し(1:20の比率)、増殖させた。2週間終了時、ネオマイシン耐性コロニーを選択し、プールして増殖させて、常にG418の存在下で維持した。

10

【0155】

11.2. 結果

細胞におけるスプライセオソームにより媒介されるRNAトランススプライシングについての容易で用途の広い解析を可能とするモデル系を開発した。細菌lacZ遺伝子を囊胞性繊維症膜貫通コンダクタンス調節タンパク質(CFTR)遺伝子由来の末端切断型イントロン9で分断した(図37A)。この分断lacZ遺伝子は、それをヒト293T細胞へ導入したところ、適切なスプライシングが可能なlacZプレmRNAの合成を誘導した。このlacZ遺伝子のオープンリーディングフレームを、第2のエキシソンの5'末端付近に2つのナンセンスコドンイン・フレームで挿入することにより変異させた(図37A)。このlacZ遺伝子はlacZCF9mと呼ぶ。293T細胞においてlacZCF9mは、酵素活性を持たない末端切断型 β -ガラクトシダーゼ(β -gal)タンパク質をコードするlacZCF9mプレmRNAの合成を誘導した。lacZCF9m遺伝子を有する細胞は、機能喪失型突然変異によって引き起こされる遺伝病のモデル系となる。

20

【0156】

プレトランススプライシング分子(PTM)は、lacZCF9mプレmRNAとのトランススプライシングを起こして、2つのナンセンスコドンによって引き起こされる突然変異を修復するように、デザインした。23、91および153個のヌクレオチド(nt)にわたる結合ドメインを有するPTMを構築し、これらをPTM-CF14、PTM-CF22およびPTM-CF24と呼称した(図37B)。PTM-CF24結合ドメインは、標的CFTR遺伝子イントロン9の153個の連続するヌクレオチドとは結合せず、むしろ27および126個のヌクレオチドの相補領域間に存在する標的において47個のヌクレオチドのループを作る(図37B)。これらのPTMはlacZCF9mによって作り出された欠陥を修復するものと推定された(図37C)。

30

【0157】

半定量的RT-PCR解析を用い、長い標的結合ドメインを有するPTMによって媒介されるトランススプライシングの効率を調べた。トランススプライシングによるlacZCF9m転写物の修復は、PTMと標的(lacZCF9m)プラスミドとの同時トランスフェクション、または内因性プレmRNAとして標的を発現するよう改変された細胞のトランスフェクションという、2つの異なる方法で調べた。PTMをコードするプラスミドをlacZCF9mプラスミドと同時トランスフェクトすることは、前者をその効率についてスクリーニングするための容易な方法であった。半定量的RT-PCRアッセイにおいてPTM-CF22およびPTM-CF24はPTM-CF14よりもおよそ3倍および10倍効率がよく、このことはmRNA修復の著しい向上を示している(図38)。RT-PCR産物の配列決定を行ったところ、トランススプライシングは正確であり、その結果として標的およびPTMに由来するエキソンが適切に連結されることが示された。さらに、PTMの3'スプライス部位における重要なシス作用エレメントの突然変異は、トランススプライシングを妨げた。これらのアッセイおよび本明細書に記載のその他の全てのアッセイでは、DNAレベルの組換えを除外するために対照実験を行った。このように、lacZCF9m転写物の修復は、標的RNAトランススプライシングの結果であった。

40

【0158】

PTM-CF14、PTM-CF22またはPTM-CF24の、内因性lacZCF9m遺伝子を有する293細胞へのトラ

50

ンスフェクションにより、標的結合ドメインが長いほど効率の高いPTMとなることが確認された(図38B)。同等レベルのRT-PCRトランススプライシング特異的産物が、PTM-CF24およびPTM-CF14のそれぞれについて30サイクルおよび35サイクルのPCRの後に得られた。従ってこのデータは、長い結合ドメインを有するPTMが、これまでに報告されたPTMよりも少なくとも1桁は高いレベルでlacZCF9m転写物を修復したことを示している。

【0159】

10個のlacZCF9mのうち1を超えるものがトランススプライシングによって修復されうる。定量的リアルタイムPCRを用いて、長い結合ドメインを有するPTMによって修復されたlacZCF9m転写物の割合を測定した。これらの実験において上記の同時トランスフェクションアッセイを用いた。23ヌクレオチドの結合ドメインを含むPTM-CF14は、293T細胞では1.2~1.6%、H1299ヒト肺癌細胞では2.1%のlacZCF9m RNAを修復することが示された。153ヌクレオチドの長い結合ドメインを有するPTM-CF24は、著しく効率が高く、293T細胞では12.1~15.2%、H1299細胞では19.7%のlacZCF9m RNAを修正した。結果としてこれはlacZCF9m mRNAのレベルにおける測定可能な低下をもたらした。また、これらのデータから、このRT-PCRアッセイの、シススプライシング産物であるlacZCF9m mRNAと、トランススプライシング産物である修復されたlacZCF9m mRNAとを識別することができる顕著な能力も確認された。これは、トランススプライシングにより媒介されるmRNA修復効率のRNAレベルでののはじめての真の定量である。これらのデータから、上記に示された半定量的RT-PCR解析の示唆が確認される。同様の実験を内因性lacZCF9mプレmRNA標的を発現する293細胞を用いて行った。上記で示されたデータと一致するように、PTM-CF24はPTM-CF14よりも10倍効率がよく、このPTM-CF24は内因性lacZCF9m転写物の1.3~4.1%を修正する。これらのデータから、PTMの長さを増大させるとトランススプライシング効率に著しい増加がもたられることが確認される。

【0160】

トランススプライシングにより媒介されるmRNAの修復は活性β-ガラクトシダーゼの合成をもたらす。細胞レベルでのmRNAの修復の成功の最終的な基準は活性タンパク質の産生である。ウェスタンアッセイを用い、トランススプライシングの結果として全長β-galが産生されたことを確認した。lacZCF9mまたはPTM-CF24をコードするプラスミドで293T細胞をトランスフェクトした後には、全長β-galは認められなかった。しかし、両プラスミドの同時トランスフェクションの結果、全長β-galタンパク質が活発に産生され、このことは抗β-gal抗血清を用いて容易に検出された(図39)。この結果は酵素活性データを補完するものであり、その酵素活性データが末端切断型β-galタンパク質の補充によるものではなかったことを示唆している。ウェスタンブロット解析では、293T細胞において全長β-galタンパク質はトランススプライシングによって生成されたものであることが明らかになり、さらに、長い結合ドメインを有するPTMが効率的にスプライシングされたことも確認された。

【0161】

β-gal mRNAの適切な修復および全長β-galタンパク質の合成は活性酵素の産生をもたらすはずである。実際、lacZCF9mおよびPTM-CF24で同時トランスフェクトされた293T細胞はin situ(図40A)または抽出物(図40B)のいずれかで測定した場合にβ-gal活性を有することが示された。この活性は標的プレmRNAおよびPTMの間のトランススプライシングによるものであることが示された。さらに定量的液相アッセイでは、上記に示されたデータがさらに確認され、すなわち、PTM-CF22およびPTM-CF24はPTM-CF14よりもそれぞれ2.9倍および9.3倍効率が高かった。しかし、最も顕著であったのは、安定な内因性遺伝子としてlacZCF9mを有する293T細胞を用いた場合の結果であった。これらの細胞をPTM-CF14でトランスフェクトした際、得られたβ-gal活性のレベルはかろうじてバックグラウンドを超えるものであった。しかし、PTM-CF24でのトランスフェクションは相当なレベルのβ-gal活性をもたらした(図40C)。これは全長β-galタンパク質の出現と並行して行った。これらのデータは、突然変異したプレmRNAを修復するトランススプライシング効率の大幅な上昇を示す。実際、グループIリボザイムまたはトランススプライシングのいずれかによる哺乳

動物細胞における内因性RNAの修復についての先行する報告は全て、RT-PCRを用いて低レベルの修復の徴候を記載しているに過ぎない。

【0162】

極めて長い結合ドメインを有するPTMは特異性が高い。結合ドメイン内の二次構造はHeLa核抽出物においてPTMの特異性を高めうることを示された。トランススプライシング反応の特異性をin vivoにて確認するため、非特異的反応のリポーターとして機能しうる第2の標的遺伝子を調製した。この遺伝子はlacZHCG1mと呼ばれ、lacZCF9mと第1エクソンを共有している。lacZHCG1mのイントロンはヒト絨毛性ゴナドトロピン遺伝子6(β hCG6)の β -サブユニットのイントロン1であり、第2エクソンは同じ遺伝子のエクソン2である。lacZHCG1mは、正確にスプライシングされることにより全長 β -galをコードしないキメラmRNAを生じるプレmRNAの合成を駆動する(下記参照)。PTM-CF14、PTM-CF22およびPTM-CF24は、これらのPTMおよび標的遺伝子中の結合ドメイン間に相補性が認められないため、lacZHCG1mプレmRNAへはターゲティングされない。ゆえに、これらのPTMとlacZHCG1mプレmRNAとの間のトランススプライシングはいずれも非特異的である(図41A)。

10

【0163】

293T細胞をPTM-CF14、PTM-CF22またはPTM-CF24でトランスフェクトし、非特異的トランススプライシングのレベルをRT-PCRおよび液相 β -galアッセイにより測定した。半定量的RT-PCRにより、PTM-CF24は、lacZHCG1mプレmRNAとのトランススプライシングを、PTM-CF14と比べて非常に起こしにくいことが示唆された。 β -gal活性の測定から確認されることであるが、lacZHCG1mとPTM-CF24とで同時トランスフェクトされた細胞は、lacZHCG1mとPTM-CF14で同時トランスフェクトされたものよりも3.7倍低減された β -galしか生じなかった(図41C)。これらのデータを基に、PTM-CF24は非特異的標的よりもその標的に対してトランススプライシングを起こす頻度が50倍高いと見積もられた。PTM-CF24の「セーフティー」形態であるsPTM-CF24はそれ以上の特異性をもたらさなかった(図41C)。しかしやはり、より短い結合ドメインを有するPTMに関しては、結合ドメインを含む「セーフティー」システムはin vivoにおける特異性を高めることが分かった(図41C)。これらのデータから、長い結合ドメインは効率が高いだけでなく特異性も高いPTMをもたらすものと結論された。

20

【0164】

長い結合ドメインがPTMの特異性を高めたという観察結果は、極めて長い結合ドメイン(>200nt)が識別能もさらに高めうることを示唆した。それぞれ200ヌクレオチドおよび411ヌクレオチドにわたる結合ドメインを有するPTM-CF26および-CF27をコードするプラスミドを構築し、lacZHCG1mプラスミドとともに同時トランスフェクトした。これら2つのPTMの非特異的トランススプライシングは、RT-PCRでかろうじて検出される程度のものであった(図41B)。 β -galアッセイによって測定した場合、PTM-CF26およびPTM-CF27は非特異的トランススプライシング活性を最小限しか有していなかった(図41C)。液相 β -galアッセイによって測定した場合のlacZCF9mとの特異的トランススプライシング反応では、PTM-CF26はPTM-CF14と同等の活性であった(図41B)。PTM-CF26は非特異的標的(lacZHCG1m)に対するよりも特異的標的(lacZCF9m)に対してトランススプライシングを起こす頻度が80倍高いと見積もられた。ゆえに、極めて長い結合ドメインを含むことにより、これらのPTMには極めて高い特異性が付与される。

30

40

【0165】

12. 実施例： 3'エクソン置換を用いた因子VIII遺伝子の修復

血友病は血液凝固因子の1つが欠損することによって起こる出血性疾患である。血友病Aは全症例の約80%を占め、凝固因子VIIIの欠損である。以下の節ではスプライセオソームにより媒介されるトランススプライシングを用いた凝固因子VIII遺伝子の修復の成功について記載し、遺伝子治療を用いた因子VIIIの修復の実現可能性を示す。

【0166】

マウス因子VIII PTMのコード領域(エクソン16~24)を、指向性クローニングのための唯一の制限部位を含むプライマーを用いてcDNAプラスミド鋳型からPCR増幅した。PCR産物は全て、クローン化Pfu DNAポリメラーゼ(Stratagene, La Jolla, CA)を用いて作製した。Eco

50

RVおよびPmeI制限部位を用いてコード配列をpc3.1DNA(-)へクローニングした。結合ドメイン(BD)は、鋳型としてゲノムDNAを用い、PCRにより作製した。プライマーは指向性クローニングのための唯一の制限部位を含んでいた。このPCR産物を、NheIおよびSacII制限部位を用いて既存のPTMプラスミド(PTM-CF24、pc3.1DNA)へクローニングした。このプラスミドはすでに、スパーサー配列、ポリピリミジントラクト(PPT)、分岐点(BP)および3'受容部位を含む残りのTSDエレメントを含んでいた。次にこのTSD全体を因子VIII PTMコード配列を含有するベクター(上記のもの)へサブクローニングした。最後に、別個のプラスミドクローンに由来するウシ成長ホルモン3'非翻訳配列を、PmeIおよびBamHI制限部位を用いて上記PTMへサブクローニングした。

【0167】

この構築物全体を配列決定した後、ありうる多義的スプライシングをRT-PCRによってアッセイし、次に、XhoIおよびBamHI制限部位を用いてAAVプラスミドpDLZ20-M2へサブクローニングした(Chaoら, 2000, Gene Therapy 95:1594-1599; FlotteおよびCarter, 1998, Methods Enzymol., 292:717-32)。いくつかのウイルス(および非ウイルス)送達系では、治療薬のサイズが重要となる。アデノ随伴ウイルスなどのウイルスベクターは、(i)広範な宿主範囲を有する非病原性ウイルスであること、(ii)アデノウイルスベクターに比べて炎症性応答が低いこと、および(iii)分裂中の細胞にも非分裂細胞にも感染可能であることから好ましい。しかし、rAAVのパッケージング能は野生型ゲノムの大きさのおよそ110%、すなわち約4.9kBに限られていることから、プロモーターおよびエンハンサーなどの大きな調節エレメントの余地が小さい。B-ドメイン欠失ヒト因子VIIIがAAVのパッケージングサイズに近いことから、トランススプライシングはより小さな導入遺伝子を送達する可能性を付与するとともに調節エレメントの付加を可能とする。

【0168】

XhoI PTMクローニング部位の上流にあるプレmRNAの多義的供与部位を除去するため、エキソン1の一部およびイントロン1配列の全体を含むオリジナルAAV構築物からおよそ170bpの配列を除去した(図44C参照)。

【0169】

図44Dの修復モデルはエキソン1~14、イントロン14、エキソン15、イントロン16、およびネオマイシン遺伝子インサートを含むエキソン16~24からなるマウス因子VIIIプレmRNA標的(内因性遺伝子)の単純化モデルを示す。図に示されているPTMは、エキソン16~24コード配列、ならびにそれ自身のスプライシングエレメント(供与部位、分岐点およびピリミジントラクト)および結合ドメインを有するトランススプライシングドメインからなる。結合ドメインの詳細は図44Aおよび44Bに示されている。この結合ドメインはイントロン15のスプライス部位およびエキソン16の一部(5'末端)に相補的である。

【0170】

遺伝子修復に3'エキソン置換を用いることの重要な利点は、(i)構築物が全長遺伝子構築物より小さな配列およびスペースしか必要とせず、それにより調節エレメントのためのスペースがより大きく残ること、(ii)SMaRTの修復が標的遺伝子を発現する細胞でしか起こらないことから、修復されたRNAの異所発現に関連する潜在的な問題がなくなるということである。

【0171】

因子VIII欠損マウスはノースカロライナ大学チャペルヒル校(University of North Carolina at Chapel Hill)の動物施設で維持した。プラスミドの注入に関しては、各マウスに鎮静剤を投与し、解剖顕微鏡下に置き、1cm垂直正中線腹部切開を行った。およそ100マイクログラムのPTMプラスミドDNAを含むリン酸緩衝生理食塩水を、肝臓門脈へ注入した。注入後1、2、3および20日の間隔で眼窩後方叢から採血し、コアテストアッセイ(Coatest assay)を用いて因子VIII活性をアッセイした。

【0172】

マウスから採取した血液サンプルにおける因子VIIIの活性をコアテストアッセイと呼ばれる標準的な試験を用いてアッセイした。アッセイは製造業者の説明書に従って行った(Chr

10

20

30

40

50

omgenix AB, Milan, Italy)。因子VIIIノックアウトマウスにおける因子VIIIの修復を示すデータは図46に示されている。

【0173】

ヒトにおける血友病Aの欠陥は、DNA全体の再配列、単一のDNA塩基の置換、欠失および挿入を含むいくつかのカテゴリに大まかに分類される。エキソン1~22(イントロンを含む)の逆位およびエキソン23~26から離れた転座を伴うDNAの再配列は重篤な血友病Aの全症例の約40%の原因であることが確認されている。イヌ血友病Aモデルもまた、全体の再配列が非常に似ている。この突然変異は本発明者らのヒトおよびイヌ因子VIII PTMデザインの基礎として用いられる。

【0174】

ヒト因子VIII PTMの構築方法は、異なるコード領域(エキソン23~26)がヒトcDNAから増幅され、結合ドメインがヒトゲノム配列鋳型(全ゲノムDNAまたはゲノムクローン)から増幅され、さらに、修復された因子VIIIタンパク質を検出するのに用いるPTMではC末端FLAGタグが遺伝子工学的に操作されること以外は、マウスPTMに関して上記したものとよく似ている。スパーサー配列、ポリピリミジントラクト(PPT)、分岐点(BP)および3'受容部位を含むトランススプライシングドメインの残りのエレメントは既存のプラスミドから得る。必要があれば、PTM内の多義的スプライシングを排除するために結合ドメイン配列に変化を加える。最終的なPTMを同じマウスAAVプラスミドベクターpDLZ20-M2へサブクローニングし、このプラスミドからウイルスを調製した。イヌ因子VIII PTMはイヌcDNAおよびゲノムプラスミドを用いる以外は同様にして作製した。

13. 実施例： パピローマウイルスRNAの標的トランススプライシング

大多数の子宮頸癌は発癌性ヒトパピローマウイルス(HPV)に関連し、E6およびE7発癌タンパク質をコードするウイルスmRNAを発現する。下記のように、PTMはHPV-16のE6領域へターゲティングされ、226番のヌクレオチドに位置する5'スプライス部位を用いて、TMエキソンをE6 ORFの5'末端へとスプライスする。

【0175】

13.1 材料および方法

PTM効率を調べるため標的DNA(p1059)を用いたが、これはSV40初期プロモーターおよび複製起点の後ろにクローニングされた全HPV-16初期領域(nt79~4468)を含む。特異性は標的として異種発現ベクター-lacZCF9mを用いて評価した(Puttarajuら, 2001. Mol Ther 4:105-14)。プラスミドはQuiagen maxi prepキットを用いて調製した。

【0176】

293細胞がほぼ集密的な6cmプレートを、リポフェクタミン2000(Life Technologies)を用い、2μgの標的DNAおよび2μgのPTM DNAでトランスフェクトした。トランスフェクション2日後、プレート上の細胞をPBSで洗浄し、300μlの溶解バッファーを用いてプレート上で溶解した。Ambion RNAqueousキットを用いて全細胞RNAを調製した。トランスフェクトしたDNAを、LiCl沈殿と、その後のAmboin DNA-freeTM DNase処理を用いたDNアーゼI処理および除去試薬によって、RNAから除去した。

【0177】

High Capacity cDNA Archive Kit (PE Applied Biosystems)からのRTを製造業者の指示に従って用い(ただし、以下のような改変を伴った：ランダムプライマーの量は半分にし、反応物100μl当たり5μlの50μMオリゴ(dT16)原液および5μlの20単位/μlのRNアーゼ阻害剤原液を加えた)、RNAをcDNAへ変換した。リアルタイム定量的PCR(QPCR)解析のため、RT反応物を50ng/μlおよび5ng/μl(もとのRNA含量に対して)まで希釈した。特異的シスおよびトランススプライスmRNAの量をリアルタイム定量的PCRを用いて定量した。これらのアッセイはリアルタイムQRT-PCRと呼ばれる。これらの反応は本質的にこれまで記載されているように(Puttarajuら, 2001 Mol Ther 4:105-14)、PE Applied Biosystems製のSYBRグリーンキットを用い、Bio-Rad iCycler iQ Real Time PCR装置にて行った。

【0178】

全HPV-16 RNAレベル(シスおよびトランススプライシングされたもの)をE6エキソン1(HPV-

16 nt152~204; 53bp)中の共通のアンプリコンを用いて評価した。このアッセイはHPV-16プライマーoJMD-15(ACAGAGCTGCAAACAACACTAT)およびoJMD-16(TTGCAGTACACATTCTAA)を用いる。各PCR反応に用いるRT反応物の量は5ngとした。HPV-16の nt226 5'スプライス部位からのPTM lacZエキソンへのトランススプライシングは53bpのキメラアンプリコンを用いて評価した。このアッセイはHPV-16センスプライマーoCCB-348(GCAAGCAACAGTTACTGCGA; HPV-16 nt201~220)およびlacZアンチセンスプライマーoCCB-322(ATCCACCCAGTCCCAGA)を用いる。各PCR反応に用いるRT反応物の量は50ngとした。両アッセイとも、定量のための標準曲線を作成するために同じプラスミド(p3671)を用いた。HPV-16の nt880 5'スプライス部位からPTM lacZエキソンへのトランススプライシングは50bpのキメラアンプリコンを用いて評価した。このアッセイはHPV-16センスプライマーoCCB-366(ATCTACCATGGCTGATCCTG; HPV-16 nt858~877)およびlacZアンチセンスプライマーoCCB-322を用いる。各PCR反応に用いるRT反応物の量は50ngとした。このアッセイの標準曲線を作成するため、プラスミドp3672を用いた。

10

【0179】

リアルタイムQPCRの標準として用いるプラスミドは以下のようにしてクローニングした。293T細胞におけるp1059およびHPV-PTM1の同時トランスフェクションからのRT反応をPCR反応の鋳型として用いた。プライマーoCCB-257(HPV-16 nt127~147; ACCCAGAAAGTTACCACAGTT)およびoCCB-322は127bpのバンドを示し、これをpCRII-TOP0(Invitrogen)中にTOP0クローニングして、p3671を得た。配列決定から、このDNAはHPV-16 nt226からPTMの3'スプライス部位へのトランススプライシングに相当することが示された。プライマーoJMD-17(HPV-16 nt689~708; GACAAGCAGAACCGGACAGA)およびoCCB-322は219bpのバンドを示し、これをpCRII-TOP0にTOP0クローニングしてp3672を得た。配列決定から、このDNAはHPV-16 nt880からPTMの3'スプライス部位へのトランススプライシングに相当することが示された。プラスミド原液(1ng/ μ l)については、標準曲線のために用いる前にPicoGreen(Molecular Probes)を用いて定量した。

20

【0180】

PTMおよび標的lacZCF9mでの同時トランスフェクションに関するシスおよびトランススプライシングの定量はまさにこれまでに記載のように行った(Puttarajuら, 2001. Mol. Theor. 4:105-14)。各PCR反応に用いるRT反応物の量は5ngとした。

【0181】

30

13.2 結果

HPVおよびCF PTMを、トランススプライシング効率を評価するためにHPV-16発現ベクターp1059とともに、またはトランススプライシングの特異性を評価するためにlacZCF9m(CFイントロンを含む)とともに、293細胞へ同時トランスフェクトした。上記のようにリアルタイムQRT-PCRアッセイを行い、各標的のシススプライシングに対するトランススプライシングのレベルを評価した。結果は表1に示されている。全RNAレベルをDNA標準のfgとして表す。標準 p3671およびp3672は同じサイズに近く、従ってこれらの値を用い、各アッセイにつき相対RNAレベルで表すことができる。HPV-PTM1、2、5および6はHPV-16の nt226 5'スプライス部位へと効率的にトランススプライシングされた。HPV-PTM1では最大70%のトランススプライシングが見られた。予測されたように、HPV-PTM5トランススプライシングはPTMの分岐点およびポリピリミジントラクトにおける突然変異によって無効になった。これらのPTMはnt 880 5'スプライス部位へのトランススプライシングを1%未満で示した。このデータは、ヌクレオチド409および526 3'スプライス部位に相補的な結合ドメインを有するこれらのPTMのデザインと一致する。880 5'スプライス部位の下流のHPV-PTM-8およびHPV-PTM-9トランス結合ドメインは5'スプライス部位に対する効率的なトランススプライシング(HPV-PTM8では37%、HPV-PTM9では22%)を示し、nt226 5'スプライス部位に対するトランススプライシング効率はいく分低い。HPV-PTM9は、nt880 5'スプライス部位へのスプライシング因子の結合を立体障害により妨害する。また、 HPV-PTM1、2、5および6の特異性も、CFイントロンを有する標的プレmRNAに対するトランススプライシング能によって評価した。特異性は274から606倍の範囲であった。

40

50

【表 3】

特異性アッセイ

MSP 同時トランスフェクション 8/2/01

293 細胞

標的: p3514 (LacZCF9m) (全細胞が標的を有する)

6cm プレート; リポフェクタミン 2000; 2 μ g 標的および 2 μ g PTM

シススプライシング標準曲線には p3517

トランススプライシング標準曲線には p3519

10

サンプル 番号	トランスフェクション番号/PTM	標準曲線: プライマー:	p3517 324/323 fg cis	p3519 327/322 fg trans	トランスの割合%
1	#1A HPV-PTM1		1,200.00	1.44	0.1%
2	#1B HPV-PTM1		1,380.00	3.60	0.3%
3	#2A HPV-PTM2		2,840.00	4.10	0.1%
4	#2B HPV-PTM2		2,090.00	3.17	0.2%
5	#3A HPV-PTM5		1,820.00	1.85	0.1%
6	#3B HPV-PTM5		1,750.00	1.82	0.1%
7	#4A HPV-PTM6		772.00	0.69	0.1%
8	#4B HPV-PTM6		1,720.00	2.05	0.1%
9	#5A HPV-PTM8		2,570.00	5.06	0.2%
10	#5B HPV-PTM8		1,800.00	3.46	0.2%
11	#6A HPV-PTM9		2,300.00	2.29	0.1%
12	#6B HPV-PTM9		2,690.00	2.74	0.1%
13	#7A CF14		1,350.00	22.20	1.6%
14	#7B CF14		1,320.00	21.50	1.6%
15	#8A CF24		1,520.00	93.90	5.8%
16	#8B CF24		1,500.00	72.00	4.6%
17	#9A CF27 (PCR により確認)		1,410.00	3.83	0.3%
18	#9B CF27 (PCR により確認)		1,370.00	4.53	0.3%
21	#11A pcDNA3.1		1,520.00	0.04	0.0%
22	#11B pcDNA3.1		1,370.00	0.07	0.0%
23	p3517 (10pg)		-----	0.17	
24	p3519 (10pg)		0.00	-----	---

20

30

注: CF PTM の同定はプラスミドおよび RNA サンプル (DNアーゼ処理前) の双方の PCR によって再確認し、問題がなかった。

40

【0182】

14. 実施例: 標的パピローマウイルス PTM のデザイン

最初の治療薬前駆体 RNA 分子 (「PTM」) は HPV mRNA の存在量およびスプライシングパターンを基にして開発する。良性感染における HPV-16 の転写マップが図 48 に示されている。この最初の PTM についてシスおよびトランススプライシングアッセイを行い、それらのアッセイから得られたデータを用いてスプライセオソームにより媒介される RNA トランススプライシング反応において至適効率を有する特定の PTM を作出する。

50

【0183】

最も効率的なPTMは、感染した細胞を死滅させる毒性産物をコードするPTMによりHPV標的転写物をトランススプライシングするものである。最もよく用いられるHPV標的スプライス部位のターゲッティングにおいては、2つの活性のある5'スプライス部位標的および2つの活性のある3'スプライス部位標的が使用できる。より高い頻度で用いられる部位を遮断するようにPTMをデザインする場合には、低い頻度で用いられるスプライス部位も十分な標的となりうる。多くの子宮頸癌ではHPV-16の組み込みがこれらの癌においてE6およびE7領域の発現しかもたらさないことから、標的スプライス部位の選択はその強度が癌治療を目的とするかどうかでさらに制限される。

【0184】

10

毒性産物の発現をもたらす最初のPTMの開発に以下の標的スプライス部位を用いる。

【0185】

i) 5' スプライス部位標的：

nt226：このスプライス部位は全E6*種の合成に用いられる。大部分の腫瘍および細胞株では、P97プロモーター転写物の大多数はこの5' スプライス部位を用いてスプライシングされる。

【0186】

nt880：このスプライス部位は全E6US(非スプライシング)、およびE6*IIIを除くE6*種の合成に用いられ、両スプライス部位とも増殖性感染および癌の双方で好適な標的となる。

【0187】

20

ii) 3' スプライス部位標的：

nt409：この 3' スプライス部位は、一般にE6*II種よりも存在量の多いE6*I種のスプライシングに用いられる。このスプライス部位は癌および増殖性HPV感染に用いられる。

【0188】

nt3358：この標的はウイルスDNAが染色体外にある場合に限り、ほとんどのmRNAのスプライシングに用いられる。このスプライス部位は大部分の癌の治療にとっては良好な標的というわけではない。

【0189】

さらに、増殖性感染組織または癌において内部エキソンnt409～880またはnt526～880を置換するように二重トランススプライシングPTMが開発される。

30

【0190】

あるいは、最初のPTMは、トランススプライシングが、PTMによりコードされる部分ウイルスおよび部分外来ペプチドである融合タンパク質をコードするmRNAを生じるようにデザインされる。この融合タンパク質は必須のウイルス機能を阻害するようウイルスタンパク質の機能を変化させる。上記のスプライス部位は次の3つのウイルス融合タンパク質を生じるようターゲッティングされる：

(i)標的として226 5' スプライス部位を用いるE6のN末端

(ii)標的としてnt409(最良)またはnt526 3' スプライス部位を用いるE6のC末端

(iii)標的としてnt3358 3' スプライス部位を用いるE2のC末端。

【0191】

40

この融合タンパク質は染色体外ウイルスDNAを含む増殖性感染および癌で産生される。E2のC末端ドメインはDNA結合・二量化ドメインであり、融合タンパク質をP97プロモーターへターゲッティングし、転写を遮断するのに使用できる。高濃度ではE2ウイルスタンパク質はP97プロモーターのすぐ上流に結合し、結合をめぐって転写因子 SP1およびTFIIDと競合することで転写を阻害する。しかし、これらのE2結合部位は長い制御領域(LCR)の上流のものよりも弱く、ウイルスE2タンパク質が高濃度の場合にのみ飽和する。E2が低濃度の場合、このタンパク質は上流LCRのE2結合部位に結合し、転写を活性化する。このように、融合タンパク質に「リプレッサー」ドメインを付加すると、いずれかのE2結合部位と結合することにより転写を遮断することができる。この融合タンパク質はまた、E1/E2複合体が複製起点と結合することから、ウイルスDNAの複製を遮断するのにも有用である。

50

しかし、E2 DNA結合ドメインとE1の複合体はこの起点には結合しないことが示されている。E2は二量体であるので、E2融合タンパク質と全長E2タンパク質とのヘテロ二量体化によりおそらくDNA複製におけるE2の機能が失われるであろう。

【0192】

上記で挙げた図48に示されるHPV標的スプライス部位に対するターゲッティングおよびトランススプライス能に基づいたPTMを構築し、スプライシングによって、感染細胞を死滅させるか、または容易に検出できるマーカー遺伝子を発現するジフテリア毒素サブユニットA(DT-A)産物の発現がもたらされるようにスクリーニングする。他のペプチドまたはタンパク質毒素をもコードしてもよい。典型的な原型PTM(3'トランススプライシング)はHPV配列に相補的なアンチセンス標的結合ドメイン(25以上)、スパーサー配列、標準的な分岐点配列(UACUAAC)、延長ポリピリミジントラクト(12~15U)、3'スプライス部位のAGジヌクレオチド、それに続く送達される遺伝子からなる。PTMはまた、HPV 3'スプライス部位を用いてPTMにより媒介されるトランススプライシングが起こるよう構築する(図66B)。PTMのトランススプライシングドメイン(TSD)はモジュール方式で構築する。各PTMエレメントの間に個々のエレメントの置換を容易にする唯一の制限部位を組み込む。3'エクソン置換および5'エクソン置換モデルの模式図がそれぞれ示されている(図66A~B)。トランススプライシングの効率および特異性の双方は、結合ドメインの長さ、スパーサー配列、PPTの強度をはじめとするTSDにおけるいくつかの配列の変更により実質的に調節することができるということがこれまでに実証されている。

10

【0193】

「線状」PTMはトランススプライシング効率を最大にし、それにより、非常に高いトランススプライシング効率を与えるPTM配列を同定するように、最初にデザインされる。線状PTMは一本鎖形態としてのPTMの結合ドメインをさす。高度のターゲッティング特異性を達成するには、「セーフティシステム」と呼ばれるもう1つに形態のTSDを構築することができる。これらのPTMでは、PTMのスプライス部位は折りたたみ構造において、自身と結合することにより他のプレmRNA標的との反応から保護される。特異的標的との接触により、セーフティシステムの解除、スプライセオソーム形成のためのPTMの3'スプライス部位の露出および活性化が促進される。

20

【0194】

また、トランススプライシングの特異性をさらに高めるために、予測される治療効果を得るのに2つのトランススプライシング事象を必要とするPTMも構築される(図65)。このPTMはHPV 5'スプライス部位へとトランススプライシングする上流3'スプライス部位を有し、それにより単独のトランススプライシング産物を生じる。この産物は必要なポリアデニル化シグナルを含まず、核細胞質輸送およびmRNAの翻訳ができないことから不活性であろう。HPV 3'スプライス部位を用いる第2のスプライシング事象はポリアデニル化に必要なシグナルを伴うPTMを提供する必要がある(図65)。ポリアデニル化は、3'および5'両結合ドメインが線状である線状結合ドメインを有するPTM、あるいは、3'セーフティー+5'線状結合ドメインを有するPTMに必要であり、ウイルス発現の阻害のためにもデザインされる。さらに、PTMは、3'および5'両セーフティースプライス部位、または3'線状もしくは5'セーフティー部位を有する「二重セーフティー」PTMとしてもデザインされる。

30

40

【0195】

これらPTMの試験はin vitroスプライシングアッセイおよび細胞培養に基づくアッセイを用いて行われる。PTMのトランススプライシング能を調べるためにはHPV-16含有細胞系を用いる。W12細胞(80263細胞)は染色体外HPV-16 DNAを含み、全HPV-16初期領域を発現しており、PTMターゲッティングを試験するのに用いることができる。SiHaおよびCaSki細胞系は組み込まれたHPV-16を含み、ウイルスのE6/E7/5'E1領域のみを発現する。これらの細胞系は、子宮頸癌で発現されるものに特徴的なウイルスプレmRNAを発現するので、有用である。しかし、それらは3358 3'スプライス部位をターゲッティングするPTMを試験するために有用な細胞系とはいえない。CaSki細胞は試験した他のいずれの細胞系よりも著しく高いレベルのHPV-16 mRNAを発現することから、他のPTMをアッセイする上で最良の細胞とな

50

る。

【0196】

細胞培養に基づく、PTM発現ベクターとHPV-16初期領域発現ベクターでの同時トランスフェクション実験では、PTMの発現に関してアッセイする。HPV-16の発現を駆動するいくつかのプラスミドを構築した。例えば、同時トランスフェクション実験で利用できる2つのプラスミドとしては、SV40初期プロモーター(p1059)またはK14プロモーター(p2571; pK14-1203)のいずれかの指令下でHPV-16を発現するものが挙げられる。

【0197】

イソ型特異的(すなわち、スプライステ異的)プライマーと定量的リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(QRT/PCR)を併用して選択的スプライシングについてアッセイする。このアッセイは極めてイソ型特異的であり、RNA分解に対しては比較的感受性が低く、一分子のcDNAに対しては感受性がよく、広いダイナミックレンジを有し(少なくとも70桁の規模)、かつ、各イソ型の絶対量が得られる。各PTM/標的プレmRNAの組合せに特異的なプライマー対を用いる。このアッセイの配列特異性により、トランススプライシング反応の特異性をモニタリングすることができる。アッセイの感受度および定量性ならびにアッセイを開発・実施する上での迅速性はパピローマウイルスプレmRNAへターゲッティングされるPTMの最適化に有用である。

10

【0198】

また、PTMにより誘導されるトランススプライシングの特異性(すなわち、HPV標的プレmRNAへの標的トランススプライシングの特異性を調べるためのもの)も、標準的な手法に従い、cDNA末端の5'および/または3'迅速増幅(RACE)によって評価する。この方法は従来のcDNAライブラリーの構築に比べて比較的迅速であり、5'および/または3' cDNA末端の完全配列を与えることから、特異的および非特異的スプライシング事象の数を求めることができる。まず、(i)線状PTM+HPVミニ遺伝子標的、および(ii)セーフティーPTM+HPVミニ遺伝子標的の同時トランスフェクトされた細胞から単離したRNAからなる2つのcDNAライブラリーを構築する。例えば、トランススプライシングされたRNAの5'末端(3'エキソン置換)を同定するために、PTMアンチセンスプライマーを用いて5' RACEアッセイを行う。同様に、トランススプライシングされたRNAの3'末端(5'エキソン置換)を同定するために、PTMセンスプライマーを用いて3' RACEアッセイを行う。このcDNAをPCRにより増幅し、制限酵素で消化し、プラスミドベクターへクローニングする。これらのcDNAクローンをまず、PTM特異的プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーションによってスクリーニングする。各cDNAライブラリーから陽性クローンを選択して配列決定し、その配列情報を用いて線状PTMとセーフティーPTMの特異性を比較する。これにより高頻度でトランススプライシングする非特異的標的の同定が可能となる。これらの標的を解析すると、非特異的トランススプライシングを引き起こす配列についての有用な情報が得られ、特異的PTMの構築に役立つ。

20

30

【0199】

トランススプライシングアッセイにおける最初の候補PTMの解析から得られたトランススプライシング効率および特異性のデータを用い、最適なトランススプライシング能を有するPTMを考案・開発する。これらの最適なPTMは上記のトランススプライシングアッセイを用いて解析する。

40

【0200】

器官典型的な「ラフト/異種移植片」技術を用いたパピローマウイルス感染のマウスモデル。パピローマウイルスは一般に種および細胞型特異的である。増殖性感染はウシケラチノサイトとウシパピローマウイルスを用いてヌードマウスで確立したものである。この系では、まず、ケラチノサイトを、繊維芽細胞を含むコラーゲン「ラフト」上にプレーティングし、組織培養にて集密的になるまで増殖させる。次に、ケラチノサイトにパピローマウイルスを感染させるか、またはケラチノサイトをウイルスゲノムDNAでトランスフェクトし、数日間培養して増殖させる。次に、これらのラフトをヌードマウスの背に移植し、そこでそのラフトは増殖的に感染したウシ組織へと発達する。ヒトパピローマウイルス感

50

染はヒトパピローマウイルスとケラチノサイトを組み合わせる同じ技術を用いても確立することができる。この系は抗パピローマウイルスPTMのin vivo効率を調べるのに有用である。さらに、子宮頸癌組織または子宮頸癌細胞系のヌードマウスへの移植も用いられる。また、ウシパピローマウイルス(BPV-1)、イヌ口腔パピローマウイルス(COPV)、およびワタオウサギパピローマウイルス(CRPV)を含むいくつかの動物モデルを用いて試験を行うこともできる。COPVは特にワクチンの開発の良好なモデルとして役立つ。

【0201】

本発明は本明細書に記載の特定の実施形態に範囲を限定されるものではない。実際、当業者には以上の記載および添付の図面から、本明細書に記載されているものの他にも本発明の様々な改変が明らかになる。このような改変も添付の特許請求の範囲内に入るものとする。本明細書には種々の参考文献が挙げられているが、それらの開示の全体が参照により本明細書に組み入れられるものとする。

【図面の簡単な説明】

【0202】

【図1A】 プレトランススプライシングRNAのモデル。

【図1B】 モデルPTM構築物および標的トランススプライシング戦略。第一世代PTMの模式図(PTM+SpおよびPTM-Sp)。BD, 結合ドメイン; NBD, 非結合ドメイン; BP, 分岐点; PPT, プリミジントラクト; ss, スプライス部位; およびDT-A, ジフテリア毒素サブユニットA。PTMS内のユニーク制限部位は一文字で示されている: E, EcoRI; X, XhoI; K, KpnI; P, PstI; A, AccI; B, BamHIおよびH, HindIII。

【図1C】 従来のワトソンクリック塩基対合によるPTM+Spとβ HCG6標的プレmRNAとの結合、ならびに提案されるシスおよびトランススプライシング機構を示した模式図。

【図2A】 β HCG6標的に対する種々のPTM構築物のin vitroトランススプライシング効率。標的とされた結合ドメインおよび活性スプライス部位はPTMトランススプライシング活性と相関する。全長標的(pcPTM+Sp)、非標的(PTM-Sp)およびスプライス変異体[Py(-)AG(-)]およびBP(-)Py(-)AG(-)]PTM RNAを、β HCG6 標的プレmRNAを含有するスプライシング反応物に加えた。これらの産物をプライマーβ HCG-F(標的β HCG6エキソン1に特異的)およびDT-5R(DT-Aに相補的)を用いてRT-PCR増幅し、1.5%アガロースゲルでの電気泳動によって分析した。

【図2B】 種々のPTM構築物のin vitroトランススプライシング効率。結合ドメインとスプライス部位の間にスペーサーを有する全長PTM(PTM+Sp)、スペーサー領域を持たないPTM(PTM+)および標的結合ドメイン(short PTM+)または非標的結合領域(PTM-)を含むshort PTMを、β HCG標的プレmRNAを含有するスプライシング反応物に加えた。これらの産物をプライマーβ HCG-FおよびDT-3を用いてRT-PCR増幅した。short PTMを含有する反応物については、DT-3の結合部位がPTAから除かれていることから、リバーサPCRプライマーをDT-4とした。

【図3】 PTMと標的プレmRNAの間でin vitroトランススプライシングされた産物を示すヌクレオチド配列。図2(レーン2)から466bpのトランススプライシングRT-PCR産物を、5' ビオチン標識したフォワードプライマー(β HCG-F)およびネステッド非標識リバーサプライマー(DT-3R)を用いて再増幅した。一本鎖DNAを精製し、毒素特異的DT-3Rプライマーを用いて直接配列決定した。矢印は標的β HCG6エキソン1の最後のヌクレオチドとDT-Aをコードする最初のヌクレオチドの間にあるスプライス部位を示す。

【図4A】 スプライシング因子からBPおよびPPTをマスクすることを意図した、PTM分子内塩基対合システムを示す「セーフティー」PTMおよび変異体の模式図。下線の配列はβ HCG6イントロン1相補的標的結合ドメインを表し、イタリックの配列はBPと相同な標的誤対合を示す。

【図4B】 標的に結合した際のオープン配置のセーフティーPTMの模式図。

【図4C】 in vitroトランススプライシング反応を、セーフティーPTMまたはセーフティーPTM変異体をβ HCG6標的とともにインキュベートすることで行った。スプライシング反応物を、β HCG-FおよびDT-3Rプライマーを用いたRT-PCRによって増幅し、産物を2.0%アガ

10

20

30

40

50

ロースゲルで分析した。

【図5】標的トランススプライシングの特異性は、PTMにセーフティー配列を含めることで増強される。 β HCG6プレmRNA(250ng)と β -グロビンプレmRNA(250ng)を、PTM+SF(セーフティー)またはpcPTM+Sp(線状)RNA(500ng)のいずれかとともにアニーリングした。in vitroトランススプライシング反応およびRT-PCR解析は実験手順に記載したように行い、産物を2.0%アガロースゲルで分離した。RT-PCRに用いたプライマーは示したとおりである。

【図6】漸増するPTM濃度の存在下において、シススプライシングはトランススプライシングにより阻害され、置き換わる。一定量の β HCG6標的プレmRNA(100ng)の存在下、PTM (pcPTM+Sp)RNAの濃度を上昇させつつ(52~300ng)、in vitroスプライシング反応を行った。シススプライシング産物および非スプライシング産物のRT-PCRにはプライマー β HCG-F(エキソン1特異的)および β HCG-R2(エキソン2特異的-パネルA)を用い、RT-PCRトランススプライシング産物に対してはプライマー β HCG-FおよびDT-3Rを用いた(パネルB)。反応産物をそれぞれ1.5%および2.0%アガロースゲルで分析した。パネルAでレーン9は300ngのPTMの存在下での60分時点を表し、これはパネルBのレーン10に相当する。

【図7A】PTMは培養したヒト癌細胞においてトランススプライシングが可能である。pcSp+CRMでトランスフェクトした4つのネオマイシン耐性H1299肺癌腫コロニー(無毒なDT-Aを発現する)各々から全RNAを単離し、全RNA 1 μ gおよび5'ビオチン化 β HCG-Fおよび非ビオチン化DT-3Rプライマーを用いてRT-PCRを行った。一本鎖DNAを精製し、配列決定した。

【図7B】内因性 β HCG6標的とCRM197変異体毒素の間でトランススプライシングされた産物のヌクレオチド配列(センス鎖)を示す。2つの矢印はスプライス部位の位置を示している。

【図8A】二重スプライシングプレ治療mRNAの模式図。

【図8B】二重スプライシングPTMの選択的トランススプライシング。PTM濃度を変えることで、PTMを標的の5'スプライス部位か3'スプライス部位のいずれかにトランススプライシングすることができる。

【図9】エキソンのタグ付けのためのPTM分子の使用を示した図。2例のPTMを示す。左側のPTMは標的プレmRNAの3'スプライス部位へ非特異的にトランススプライシングする能力がある。他方、右側のPTMは標的プレmRNAの5'スプライス部位へ非特異的にトランススプライシングするようにデザインされている。PTMにより媒介されるトランススプライシング反応の結果、エキソンの5'または3'側のいずれかに特定のタグを含んでなるキメラRNAが得られる。

【図10A】lacZノックアウトモデルで用いる構築物の模式図。標的lacZプレmRNAはlacZの5'断片を含み、次に β HCG6イントロン1とlacZの3'断片(標的1)が続く。このモデル系で用いるPTM分子は、pPTM+SPをPstIおよびHindIIIで消化し、DT-A毒素を β HCG6エキソン2で置き換えることにより作製した(pc3.1PTM2)。

【図10B】スプライセオソームにより媒介されるRNAトランススプライシングによる β -Gal活性の回復を示した模式図。lacZノックインモデル(pc.3.1 lacZ T2)で用いる構築物の模式図。このlacZ標的プレmRNAは、3'スプライス部位の4コドン後に2つの停止コドン(TAA TAA)をインフレームで含むこと以外は、ノックアウト実験に用いる標的プレmRNAと同じである。このモデル系で用いるPTM分子は、pPTM+SPをPstIおよびHindIIIで消化し、DT-A毒素をlacZの機能性3'断片で置き換えることにより作製した。

【図11A】lacZノックアウトモデルを用いた場合のシスおよびトランススプライシングを示したもの。LacZスプライス標的1プレmRNAおよびPTM2を293T細胞へ同時トランスフェクトした。次に全RNAを単離し、適当な特異的プライマーを用いてシススプライシング産物およびトランススプライシング産物に関してPCRにより分析した。増幅したPCR産物を2%アガロースゲルで分離した。

【図11B】 β -ガラクトシダーゼ活性の分析。293細胞をlacZ標的2 DNA単独でトランスフェクトした。

【図11C】 β -ガラクトシダーゼ活性の分析。293細胞をlacZ標的2 DNAとPTM1でトランスフェクトした。

【図 1 2 A】正確なトランススプライシングを示すトランススプライシングされた分子のヌクレオチド配列。

【図 1 2 B】シススプライシング産物およびトランススプライシング産物のヌクレオチド配列。これらのヌクレオチド配列は異なるスプライシング反応の各々について期待される配列であった。

【図 1 3】嚢胞性繊維症膜貫通調節タンパク質 (CFTR) 遺伝子の修復に関する遺伝子修復モデル。

【図 1 4】外因的に加えられた CFTR ミニ遺伝子標的と PTM の間のトランススプライシングの RT-PCR を示したもの。プラスミドを 293 胚性腎細胞へ同時トランスフェクトした。RT-PCR 反応に用いたプライマー対は各レーンの上に示されている。各レーンの下方のバンド (471bp) はトランススプライシング産物を示す。レーン 1 の下方のバンド (471bp) を 2% Seakem アガロースゲルから精製し、そのバンドの DNA 配列を決定した。

【図 1 5 A】トランススプライシング産物 (図 14 に示されているレーン 1 の下方のバンド) の DNA 配列。この DNA 配列は F508 コドン (CTT) の存在を示し、エキソン 9 配列はエキソン 10 配列および His タグ配列と連続している。

【図 1 5 B】図 15A に示されるトランススプライシング産物の DNA 配列の続き。

【図 1 6】エキソン 10 に F508 の欠失を有する外因的に加えられた CFTR 標的分子の修復に関する模式図。

【図 1 7】二重スプライシング PTM を用いたエキソン 10 置換による内因性 CFTR 転写物の修復。二重スプライシング PTM を用いることで、極めて短い PTM 分子による $\Delta 508$ 変異の修復が可能となる。

【図 1 8】lacZ 5' エキソン-CFTR ミニイントロン 9-CFTR エキソン 10 ($\Delta 508$)-CFTR ミニイントロン 10、続いて lacZ 3' エキソンからなるモデル lacZ 標的。PTM の結合ドメインを括弧でくくってある。

【図 1 9】 β -gal 機能を回復するようにデザインされた二重トランススプライシング PTM の模式図。

【図 2 0】DSPTM7 と DSCFT1.6 標的 プレ mRNA の結合を示す二重トランススプライシング反応の模式図。

【図 2 1】DSPTM7 の重要な構造エレメント。二重スプライシング PTM は 3' および 5' 双方の機能的スプライス部位ならびに結合ドメインを有する。

【図 2 2】変異型二重スプライシング PTM の模式図。

【図 2 3】二重トランススプライシング反応の精度。

【図 2 4】標的 プレ mRNA と DSPTM7 の間の二重トランススプライシングは全長タンパク質をもたらす。ポリクロール抗 β -ガラクトシダーゼ抗血清を用いた全細胞溶解物のウエスタンブロット分析。

【図 2 5】二重トランススプライシングによる DSCFT1.6 標的 プレ mRNA と DSPTM7 RNA の間の正確な内部エキソン置換は、機能的に活性な β -gal タンパク質をもたらす。全細胞抽出物を調製し、ONPG アッセイにより β -gal 活性を調べた。

【図 2 6】3' および 5' スプライス部位は二重トランススプライシング反応による β -gal 機能の回復に不可欠である。

【図 2 7】二重トランススプライシング：標的および PTM のタイトレーション。種々の濃度の標的および PTM を同時トランスフェクトし、 β -gal 活性の回復を分析した。

【図 2 8】二重トランススプライシング反応の特異性を調べるためにデザインされた構築物。

【図 2 9】二重トランススプライシング反応の特異性。

【図 3 0】二重トランススプライシング事象を媒介する PTM を用いる嚢胞性繊維症遺伝子のトランススプライシング修復。

【図 3 1】ミニ遺伝子標的の 2 つのスプライス部位およびエキソン 10 の一部をマスクする長い結合ドメインを有する PTM。

【図 3 2】PTM エキソン 10 (コドンの改変を伴う) へと正確にスプライシングされた標的エ

キソン9(上のパネル)、PTMのエキソン10中のコドン508(中央のパネル)、および標的エキソン11へと正確にスプライシングされたPTMエキソン10(下のパネル)、を示す単一のPCR産物の配列。修復された標的の配列はRT-PCR、続いてPCRにより作製した。

【図33】5'エキソン置換を行いうるPTMを用いた嚢胞性繊維症のトランススプライシング修復。

【図34】異なる結合ドメインを有する3つの異なるPTM分子の模式図。

【図35】それ自体の結合ドメインによるアンチセンス効果を軽減するように改変されたコドン利用頻度を有するPTMエキソン10の模式図。

【図36】シスおよびトランススプライシングされた産物の配列。

【図37A】トランススプライシングによるメッセンジャーRNA修復のモデル系。本研究で用いた欠陥型lacZCF9mスプライス標的の模式図(詳細については「材料および方法」を参照)。BP, 分岐点; PPT, ポリピリミジントラクト; ss, スプライス部位およびpA, ポリアデニル化シグナル。 10

【図37B】トランススプライシングドメインの重要な成分を示すプロトタイプPTM、ならびに結合ドメインの長さおよびそれらが標的プレmRNAに結合するおよその位置を示す種々のPTMの図。トランススプライシングドメイン内のユニーク制限部位はN, Nhe I; S, Sac II; K, Kpn IおよびE, EcoR Vである。

【図37C】アンチセンス結合によるPTMの結合および標的RNAトランススプライシングによる欠陥型lacZプレmRNAの修復を示す模式図。予測されるシスおよびトランススプライシングされた産物、ならびにLac-9F、Lac-3RおよびLac-5Rのプライマー結合部位が示されている。 20

【図38A】lacZメッセンジャーRNAの効率的修復。標的の特異的プライマーLac-9F(5'エキソン)およびLac-3R(3'エキソン)を用いてシススプライシング産物を増幅し、一方、標的およびPTM特異的プライマーLac-9F(5'エキソン)およびLac-5R(3'エキソン)を用いてトランススプライシング産物を増幅した(レーン7~15)。全RNA 25~50ngを用いて標的シススプライシングを測定し(レーン1~6)、全RNA 50~200ngを用いてPTMにより誘導されたRNAトランススプライシングを測定した(レーン7~12)。レーン13~15は、トランススプライシングに対する対照lacZCF9でトランスフェクトした細胞に由来する全RNA25~50ng。

【図38B】トランススプライシングによる内因性mRNAの修復。レーン1~3はPTM-CF14、レーン4~6はPTM-CF22、レーン7~9はPTM-CF24、でそれぞれトランスフェクトした細胞由来のRNA。レーン10はモックトランスフェクト細胞由来のRNAであり、レーン11は逆転写反応を省いた対照である。 30

【図39】メッセンジャーRNAの修復は全長β-ガラクトシダーゼの合成をもたらす。レーン1はlacZCF9(陽性対照、5μg)、レーン2はlacZCF9m標的の単独(25μg)、レーン3はPTM-CF24単独(25μg)、およびレーン4はlacZCF9m標的+PTM-CF24(25μg)。

【図40A】SmaRTによるメッセンジャーRNAの修復は機能的β-ガラクトシダーゼをもたらす。トランススプライシングにより作製された機能的β-ガラクトシダーゼのin situ検出。上記のように、293T細胞を、lacZCF9m標的の単独(パネルA)でトランスフェクトするか(一過性アッセイ)、またはlacZCF9m標的+PTM-CF24(パネルB)発現プラスミドで同時トランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後に細胞をPBSですすぎ、β-gal活性についてin situ染色した。 40

【図40B】欠陥型lacZ mRNAの修復は機能的β-ガラクトシダーゼをもたらす。標的およびPTM、lacZCF9m標的またはPTM-CF24プラスミド単独のいずれかでトランスフェクトした細胞由来の抽出物、残りはlacZCF9m標的および示したPTMの1つで同時トランスフェクトした細胞由来のものであった。

【図40C】トランススプライシングによる内因性mRNAの修復は機能的β-ガラクトシダーゼをもたらす。内因性lacZCF9mプレmRNA標的を発現する安定した細胞を、上記した「線状」PTM (PTM-CF14、PTM-CF22またはPTM-CF24)でトランスフェクトした。トランスフェクション後、全細胞溶解物を調製し、β-gal活性をアッセイした。示されている結果は2回の独立したトランスフェクションの平均値である。 50

【図 4 1 A】メッセンジャーRNAの修復は特異的である。lacZHCg1mプレmRNAと「線状」PTMの間の非特異的トランススプライシングを評価するための実験的戦略。

【図 4 1 B】結合ドメインの延長はトランススプライシングの特異性を増強する。レーン1~3はPTM-CF14、4~6はPTM-CF22、7~9はPTM-CF24、10~12はPTM-CF26および13~15はPTM-CF27。

【図 4 1 C】極めて長い結合ドメインを有するPTMが特異性を増強しうる。全細胞抽出物(5 μ l)を液相で β -gal活性に関してアッセイし、比活性を算出した。 β -gal活性をモックに対して正規化した。なお、示された結果は2回の独立したトランスフェクションの平均値である。対照、lacZHCg1m標的の単独でトランスフェクトした細胞由来の抽出物、他はlacZHCg1m標的および線状PTMの1つで同時トランスフェクトしたものであった。

10

【図 4 2】トランススプライシングドメイン(下線)およびCFTR遺伝子のエキソン1~10のコード配列を示すCFTR PTM30(5'エキソン置換PTM)の全配列。エキソン10で改変されたコドンは下線を引き、太字で示されている。

【図 4 3 A】153塩基対のPTM24結合ドメイン。

【図 4 3 B】トランススプライシングドメイン(下線)およびCFTR cDNAのエキソン10~24のコード配列を示すCFTR PTM24(3'エキソン置換PTM)の全配列。コード配列の末尾にヒスチジンタグと翻訳停止コドンがある。

【図 4 4 A】エキソン16~26の正常マウス配列を含むマウス因子VIII PTMの詳細な構造。BGH=ウシ成長ホルモン3'UTR(非翻訳配列); 結合ドメイン=125bp; クリプティック部位を除去するための塩基の変更を円で囲んである:F5、F6、F7、F8=プライマー部位。

20

【図 4 4 B】マウス因子VIII遺伝子における結合ドメインの範囲を示す模式図。

【図 4 4 C】PTM結合ドメインの上流の配列でクリプティックドナー部位を除去するためのAAVベクターpDLZ20およびpDLZ20-M2のプロモーターの変更。

【図 4 4 D】因子VIII修復モデル。マウス因子VIII遺伝子のイントロン15の3'スプライス部位に結合するPTMの模式図。

【図 4 5】トランススプライシングドメインが除去されたF8 PTMの模式図。これは修復がトランススプライシングの結果であるかどうかを調べるための対照PTMに相当する。

【図 4 6】因子VIIIノックアウトマウスにおける因子VIIIの修復を示すデータ。コアテストアッセイを用いて、血液を因子VIII活性に関して調べた。

【図 4 7 A】エキソン16~26の正常配列およびC末端FLAGタグを含むマウス因子VIII PTMの詳細な構造。BGH=ウシ成長ホルモン3'UTR; 結合ドメイン=125bp。

30

【図 4 7 B】エキソン23~26の正常配列を含むヒトまたはイヌ因子VIII PTMの詳細な構造。

【図 4 8】HPV-16の転写マップ。

【図 4 9】PTMによる16型ヒトパピローマウイルス発現の破壊。16型HPV標的プレmRNAの3'スプライス部位に結合するHPV-PTM2の模式図。

【図 5 0】複数のPTMがHPV E7にターゲットされる、E7ターゲティング戦略。

【図 5 1】結合ドメイン、分岐点およびポリピリミジントラクトを示すPTMデザイン。

【図 5 2】(A) 409位の3' ssにターゲティングされる80bp結合ドメインを有するHPV-PTM1。(B) 409位の3' ssにターゲティングされる149bp結合ドメインを有するHPV-PTM2。

40

【図 5 3】HPV-PTM3および4の結合ドメイン。

【図 5 4】HPV-PTM5および6の結合ドメイン。太字のヌクレオチドはPTMのクリプティックスプライシングを避けるために改変されている。

【図 5 5】HPV-PTMターゲティングドメインの位置。

【図 5 6】293T細胞におけるHPV-PTMのトランススプライシング効率。293T細胞を、2 μ gのp1059標的および1.5 μ gのPTM発現プラスミドで同時トランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、全RNAを単離し、RT-PCRによって分析した。標的特異的プライマーoJMD15およびJMD16を用いてトランススプライシング産物を増幅し(上のパネルのレーン1~11)、一方、標的およびPTM特異的プライマーoJMD15およびLac-6Rを用いてトランススプライシング産物を増幅した(下のパネルのレーン1~12)。従って、レーン13~14(上のパネル

50

)で、lacZCF9ならびにHPV-PTM1および2でそれぞれトランスフェクトした細胞から単離されたRNAは、HPV-PTMの特異性を評価するための対照として利用できる。

【図57】 HPV標的プレmRNAとPTMの間のトランススプライス部位を示すヌクレオチド配列。RT-PCR産物を精製し、プライマーLac5R(PTMの3'エキソンに結合する)を用いて直接配列決定した。矢印はHPVプレmRNA標的のE6とPTMのlacZ 3'エキソンの間のトランススプライス部位を示す。

【図58】 293細胞におけるトランススプライシング(同時トランスフェクション)。トランススプライシング効率はリアルタイムQRT-PCRを用いて定量した。

【図59】 内因性プレmRNA標的へのHPV-PTMのトランススプライシング効率。SiHaおよびCaSki細胞を、1.5 μ gのHPV-PTM1、2またはCFTR標的PTM14または27発現プラスミドでトランスフェクトした。トランススプライシングの48時間後、全RNAを単離し、RT-PCRにより分析した。内因性HPV標的とPTMの間のトランススプライシングを、標的およびPTM特異的プライマーoJMD15およびLac-16Rを用いて検出した。HPV-PTMでトランスフェクトした細胞では、予測されるトランススプライシング産物(418bp)が明らかに見られるが(レーン2~3および5~7)、対照では見られない(レーン1および4)。さらに、レーン8でも非特異的トランススプライシングのためトランススプライシングが検出される。

【図60】 SiHa細胞におけるHPV-PTM1の正確なトランススプライシング。標的プレmRNAは内因性mRNAであった。トランススプライシングされたキメラRNAの配列解析は、トランススプライシングが正確であることを示している。

【図61】 リアルタイムQRT-PCRを用いたSiHa細胞におけるトランススプライシング効率の定量。

【図62】 SiHa細胞におけるHPV-PTM1、HPV-PTM5、およびHPV-PTM6のトランススプライシング効率。全RNAの分析をRT-PCRにより行った。

【図63】 ポリピリミジントラクトの欠失はトランススプライシングを無効にする。レーン1および2は変異型HPV-PPTでトランスフェクトした細胞由来のRNAを示す。レーン3および4はHPV-PTM5プラスミドでトランスフェクトした細胞由来のRNAを示す。トランススプライシングから得られた269bpの産物が検出される。

【図64】 HPVミニ遺伝子標的の5' スプライス部位に結合するPTMおよび得られるトランススプライシングされたキメラRNAの模式図。

【図65】 二重トランススプライシング。HPVミニ遺伝子標的の3' および5' スプライス部位に結合する二重トランススプライシングPTMの模式図。得られるトランススプライシングされたmRNAを示す。

【図66】 (A) 3' エキソン置換によるトランススプライシング。HPVミニ遺伝子標的の3' スプライス部位に結合するPTMの模式図。(B) 5' エキソン置換によるトランススプライシング。HPVミニ遺伝子標的の5' スプライス部位に結合するPTMの模式図。

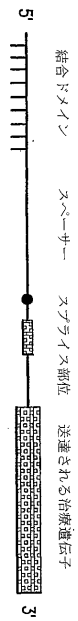
【図67】 内部エキソン置換のためにデザインされた二重スプライシングHPV-PTMの模式図。

10

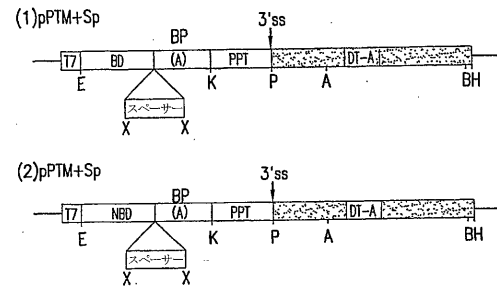
20

30

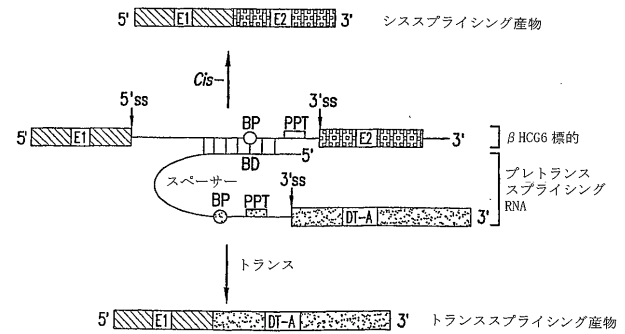
【図 1 A】



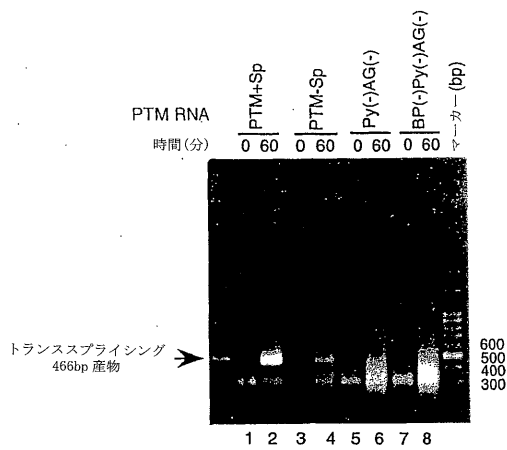
【図 1 B】



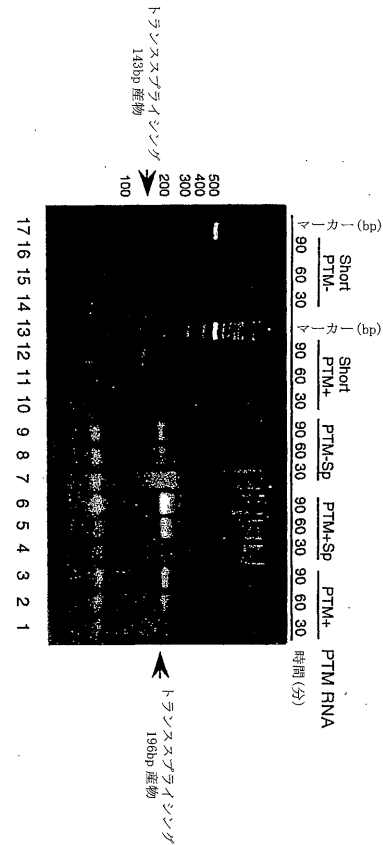
【図 1 C】



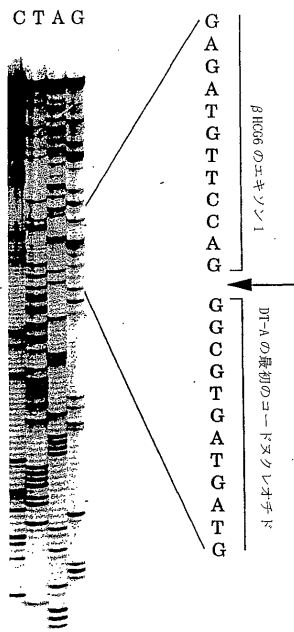
【図 2 A】



【図 2 B】



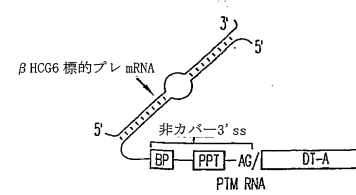
【図 3】



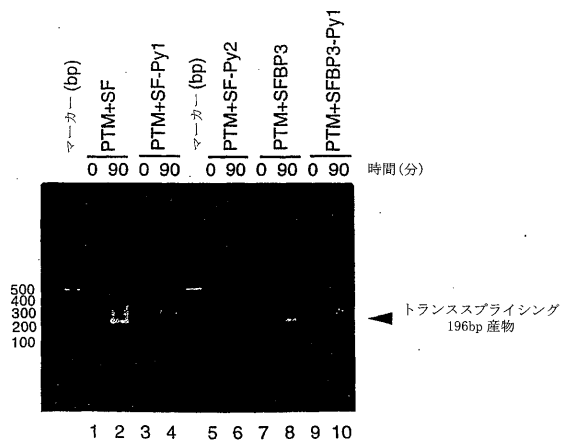
【図 4 A】



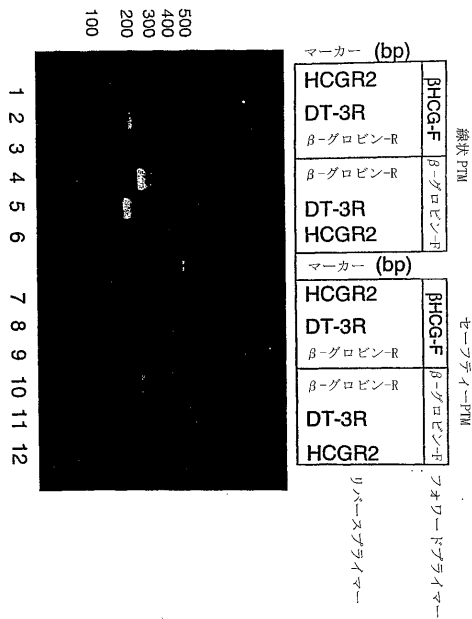
【図 4 B】



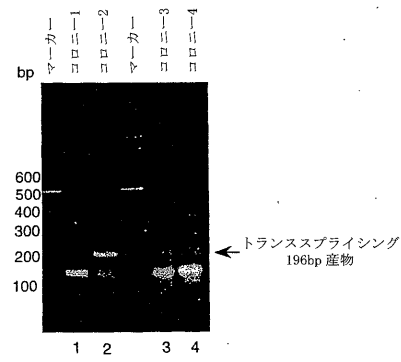
【図 4 C】



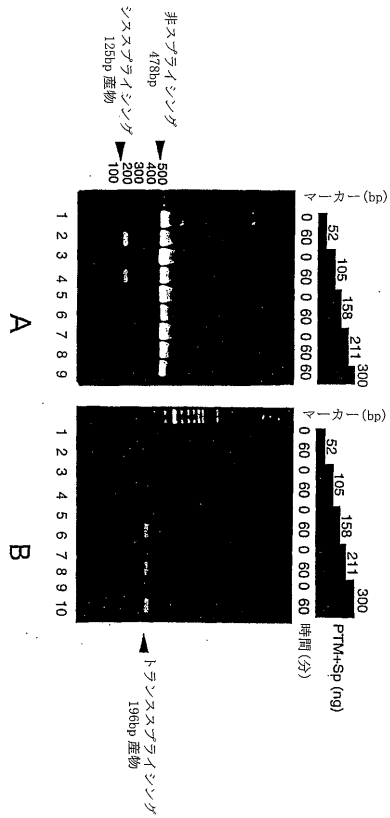
【図 5】



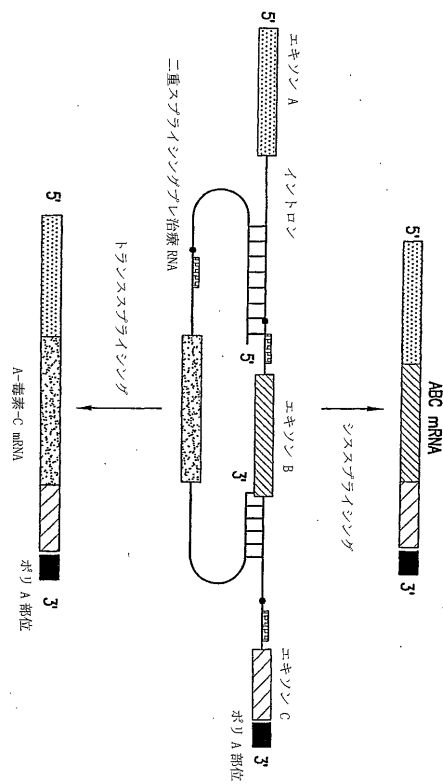
【図 7 A】



【図 6】



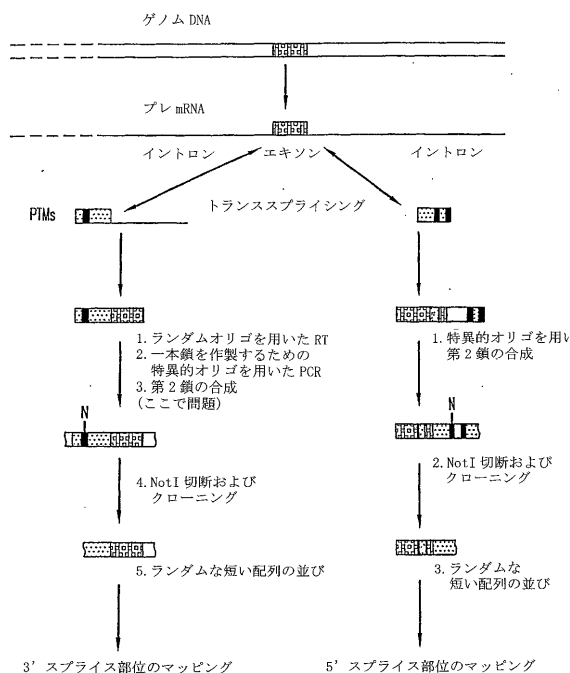
【図 8 A】



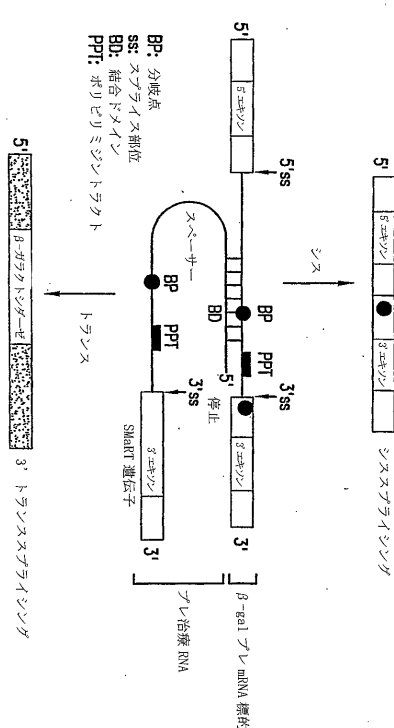
【図 7 B】

β HCG のエキソン 1 ↓
 5'-GAGGGAGCCACGACGATGGATGTCAC-6GCGCTGATGATGTT
 ↓ DT-A の最初のコードストロオチド
 GATCTCTTAATCTTTGATGAGAACTTTCTGACCAAGGACTA
 AACCTGGTTATGATTCATTCAAAA-3'

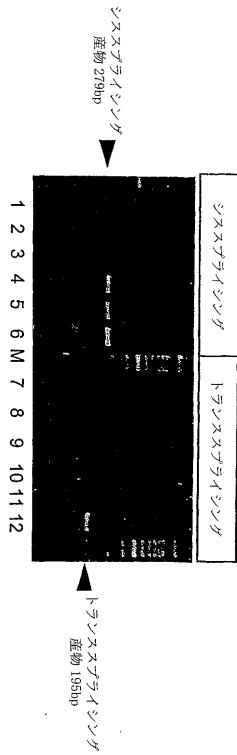
【图 9】



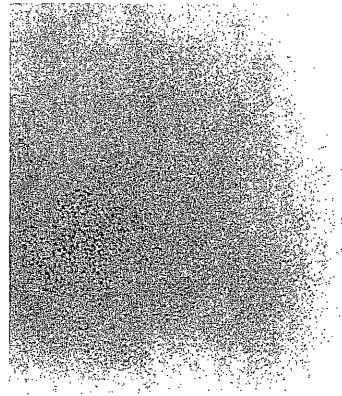
【 ㄨ 1 0 B 】



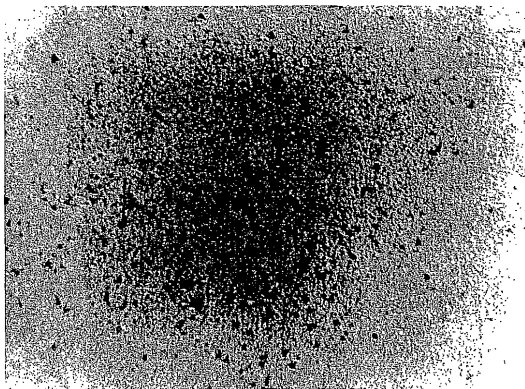
【図 1 1 A】



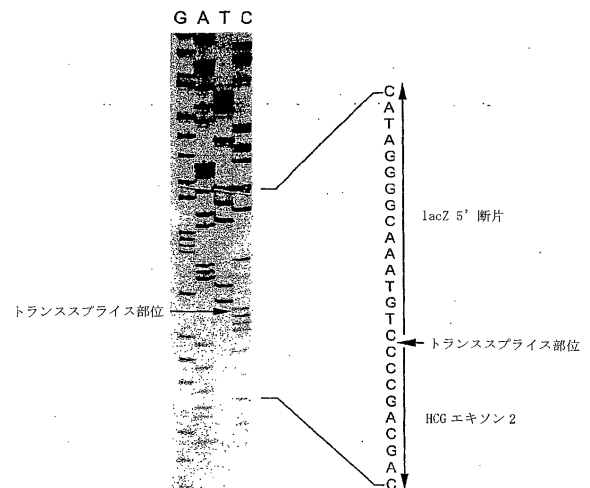
【図 1 1 B】



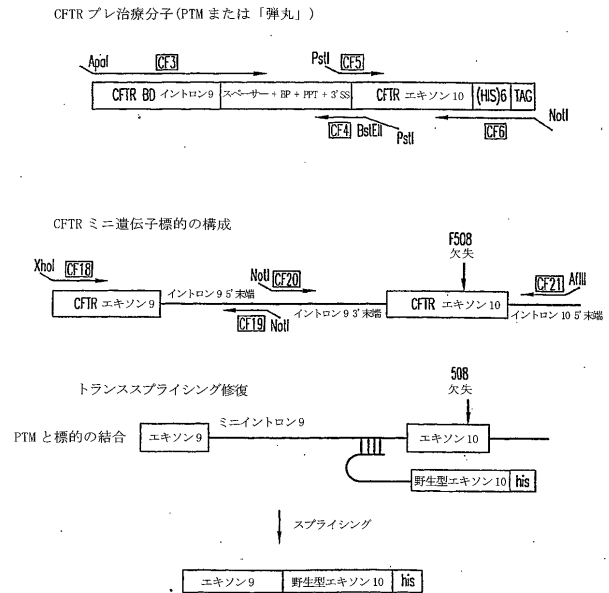
【図 1 1 C】



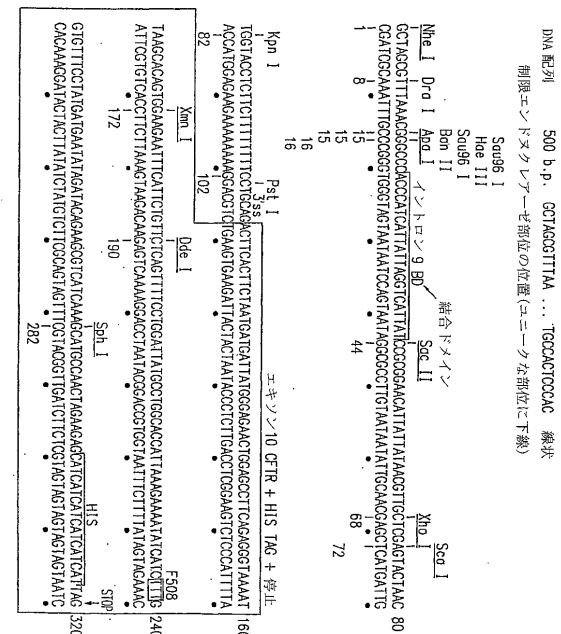
【図 1 2 A】



【 図 1 3 】



【図 1 5 A】



【 図 1 2 B 】

1. シスヌアラインツシ産物のヌクレオチド配列 (238bp) :

Biolac-IR1

GGCTTTTTCGCTACCTGGAGAGAGCGGCGCGCTGATCTCTTTGGGAAATAGGCCCAATGGGTAAACAGTCTTG
CGGCTTTTTCGCTAAATACCTGGCAAGCGGCTTTGCTGATATCTCCCGTTTACAG/66GCGGCTTTCGCTAAATATG
GGACCTGGGTGGATCAGTCGCTGATTAATATGATGAAAGACCGGCMACCGGTGGCTTCGCTTTACGGCGCGGATTCGAG
TTGGGCAATACGGCGGCAAGCATGCGCAGCTTCCTGATGAGACGGCTTCGCTTTTGGCGCAAGCGCATCGGAGATCGAG
Lac-IR2

2. トランスヌアラインツシ産物のヌクレオチド配列 (195bp)

Biolac-IR1

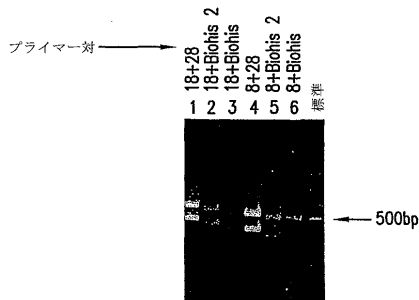
GGCTTTTTCGCTACCTGGAGAGAGCGGCGCGCTGATCTCTTTGGGAAATAGGCCCAATGGGTAAACAGTCTTG
CGGCTTTTTCGCTAAATACCTGGCAAGCGGCTTTGCTGATATCTCCCGTTTACAG/66GCGGCTTTCGCTAAATATG
GGACCTGGGTGGATCAGTCGCTGATTAATATGATGAAAGACCGGCMACCGGTGGCTTCGCTTTACGGCGCGGATTCGAG
TTGGGCAATACGGCGGCAAGCATGCGCAGCTTCCTGATGAGACGGCTTCGCTTTTGGCGCAAGCGCATCGGAGATCGAG
Lac-IR2

ヌアライン産物
ヌアライン産物

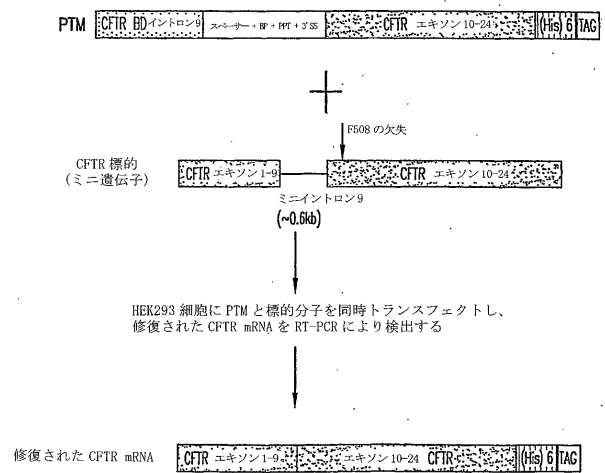
HCGR2

GGACGATGGGCGGGACGATGGGCAATCGAAGGAGCGGACCTTTCGGCGCAAGGATGGCGT

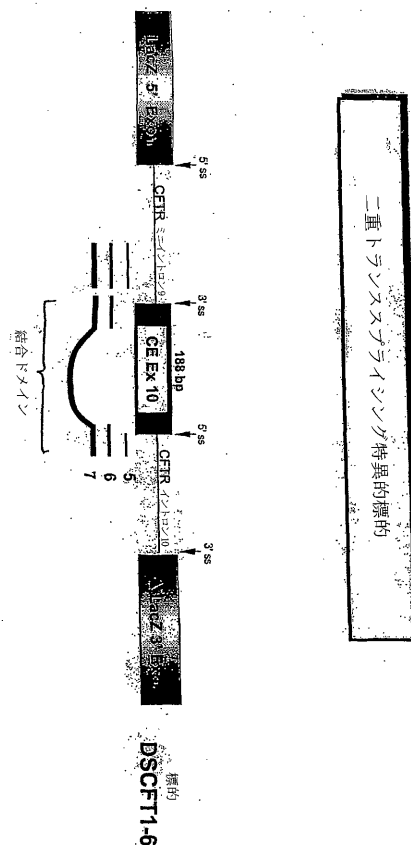
【 図 1 4 】



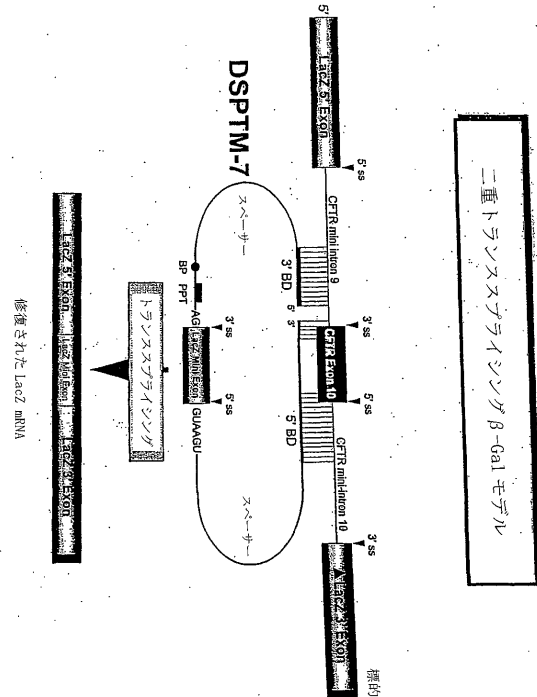
【図 16】



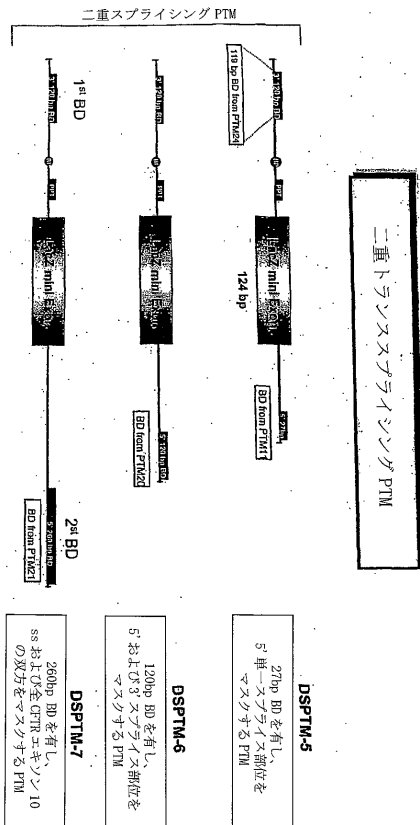
【 図 1 8 】



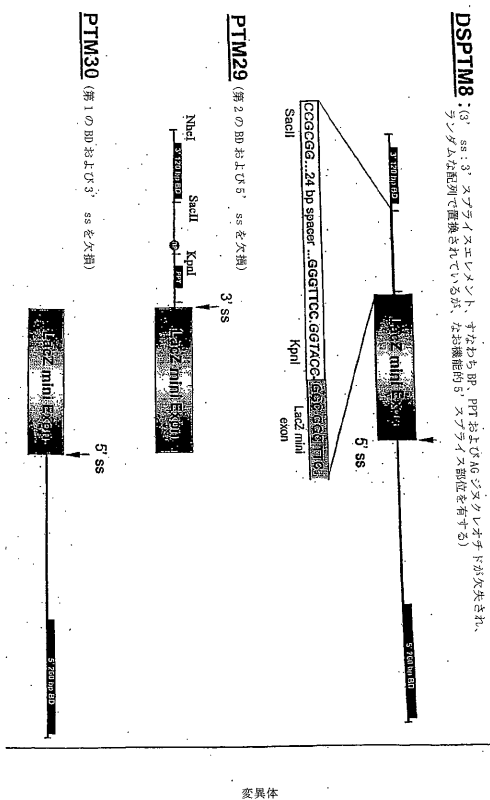
【図 20】



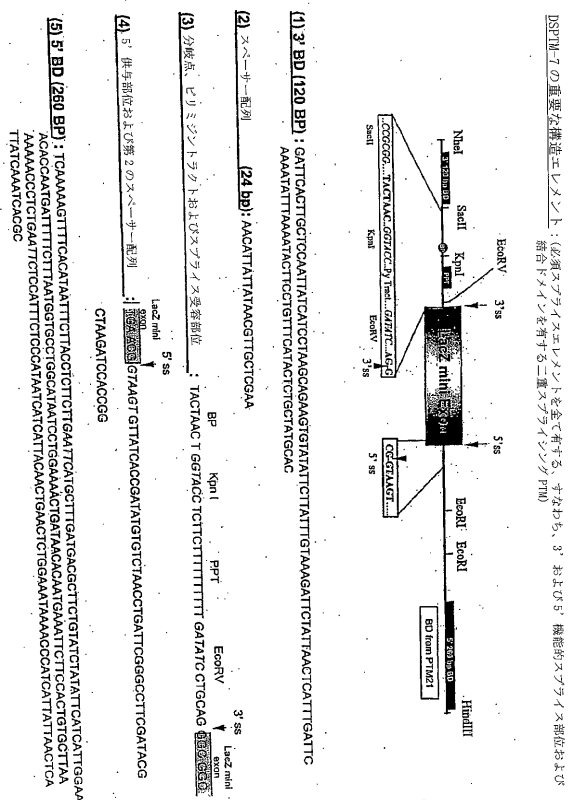
【図 19】



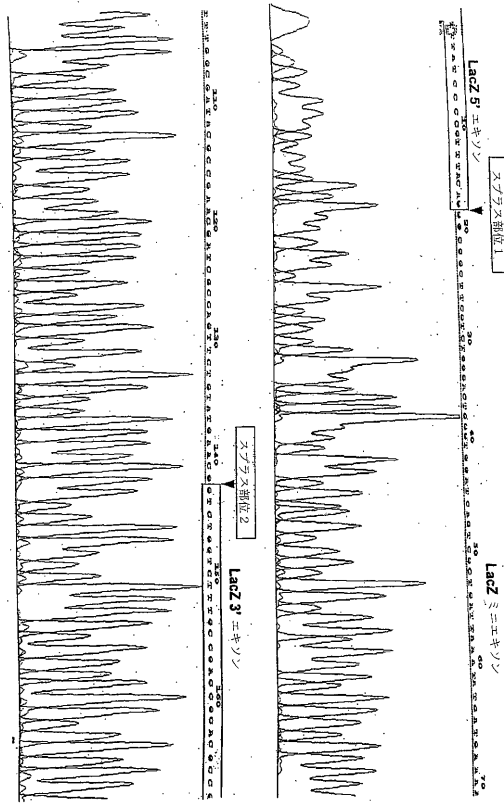
【図 2 2】



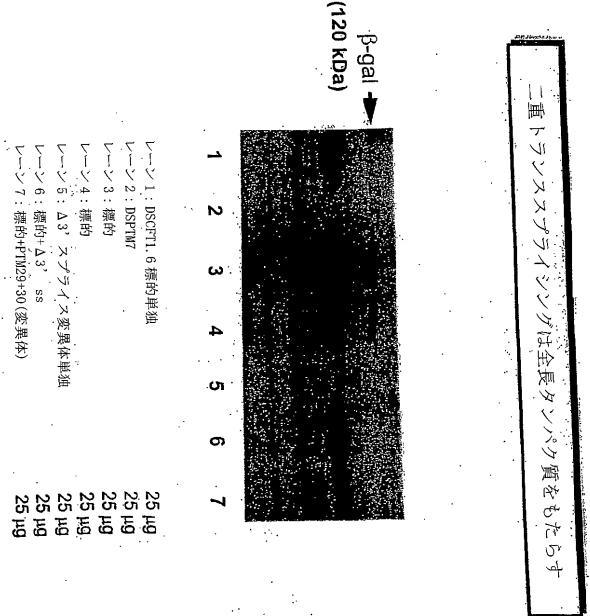
【図 2 1】



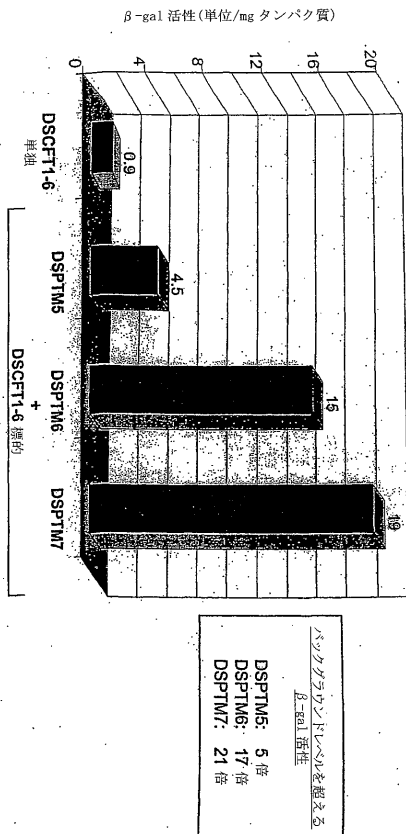
【図 23】



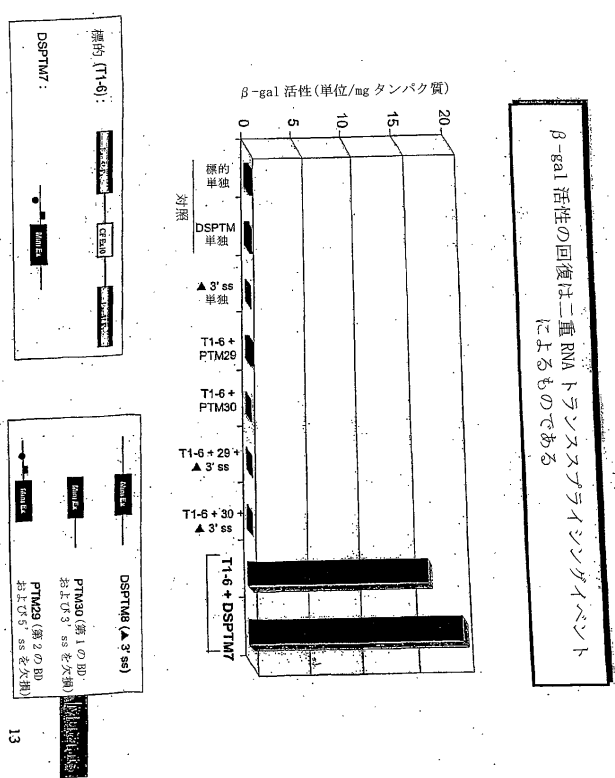
【図 24】



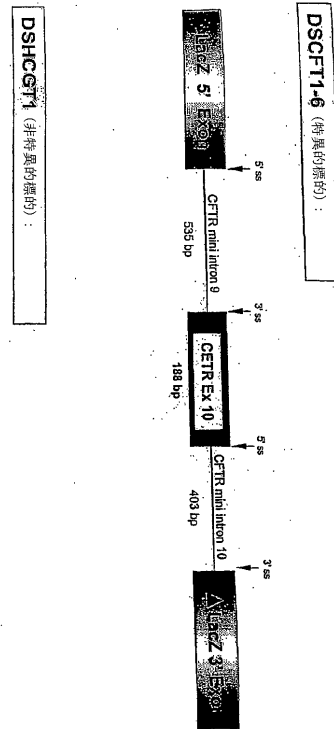
【図 25】



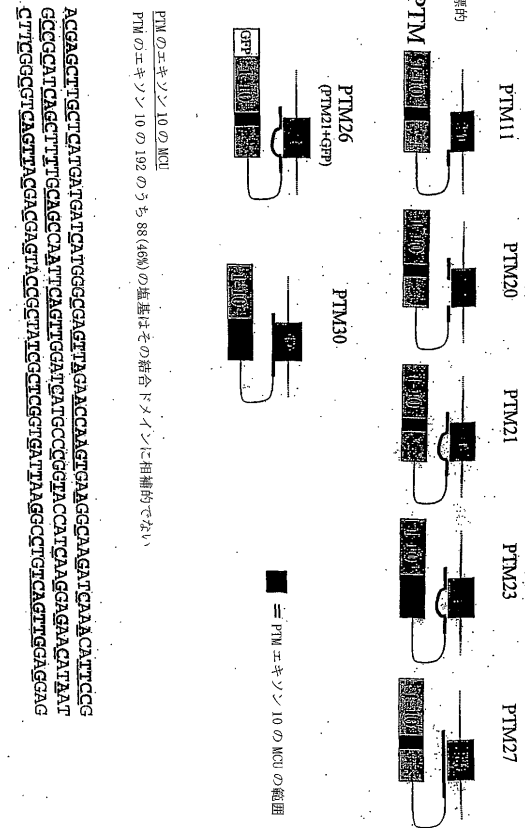
【図 26】



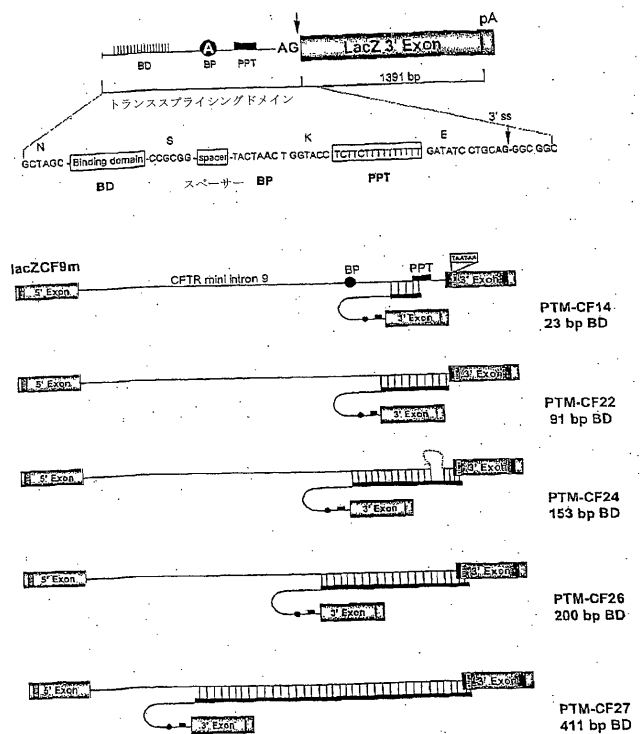
【図 28】



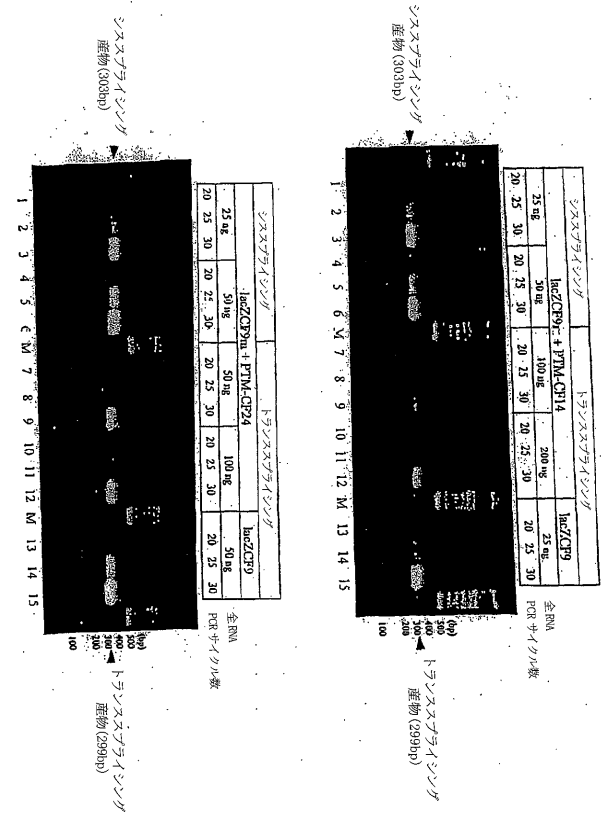
【図 3 5】



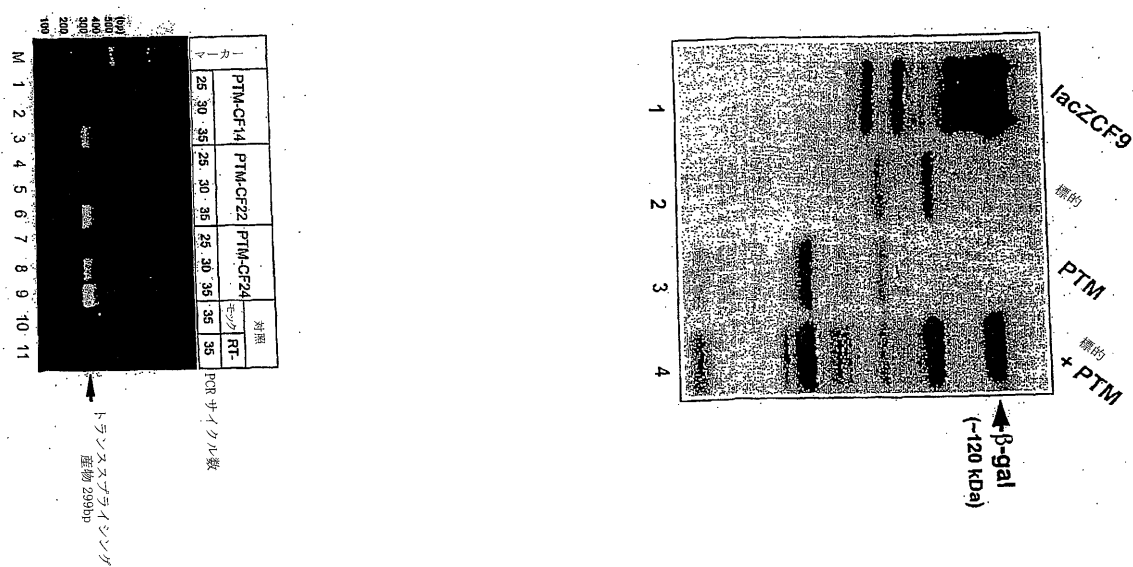
【図 3 7 A】



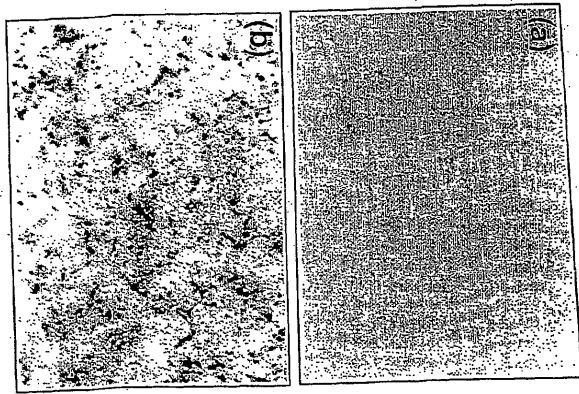
【 図 3 7 C 】



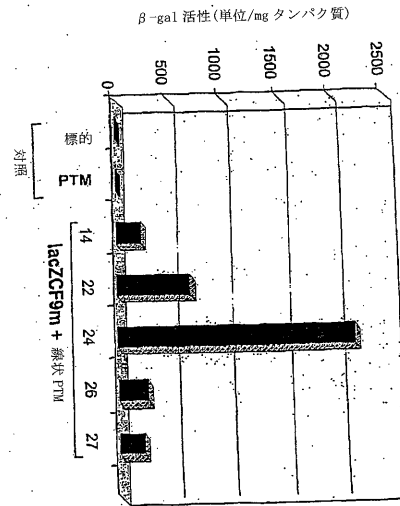
【 図 3 8 B 】



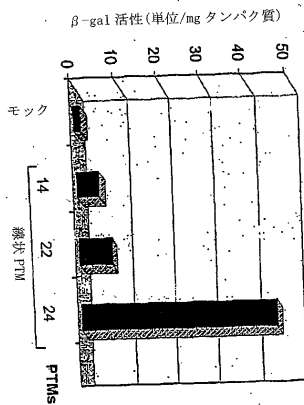
【図 40 A】



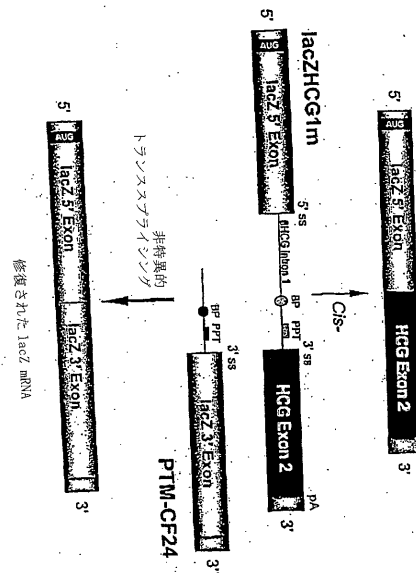
【図 40 B】



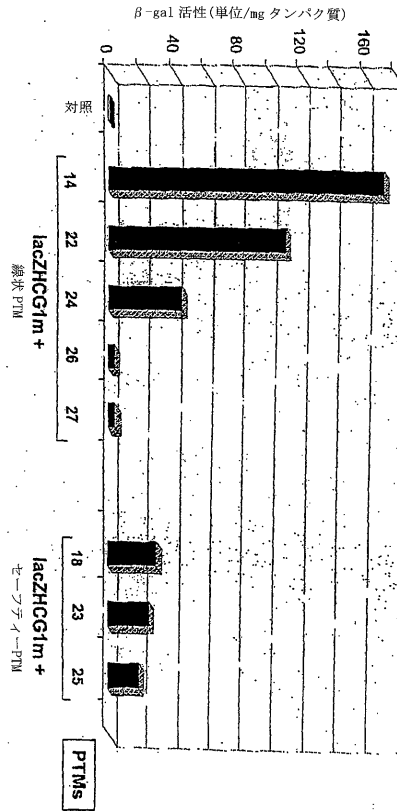
【図 40 C】



【図 41 A】



【图 4 1 C】



【図 4 3 A】

158bp の F12.4 結合ドメイン:
 Gcne 1 T 鎖は 158bp の BD
 5'-GATGAC-~~GGGAGAGAG~~AGACGAAGCCGCGCCCTTCACGCTGACGAGTTCACCTTGCCCAATATATCATCTCTAAGACGAAGTGTATATG
 TTCTGATTTGAGAAAGATCTCATTTATACGATTTGATTTGCAAAATATTTAAATATCTTCCGTTTACGTAAGCTGCGTAGTGG

トランススプライシングドメイン

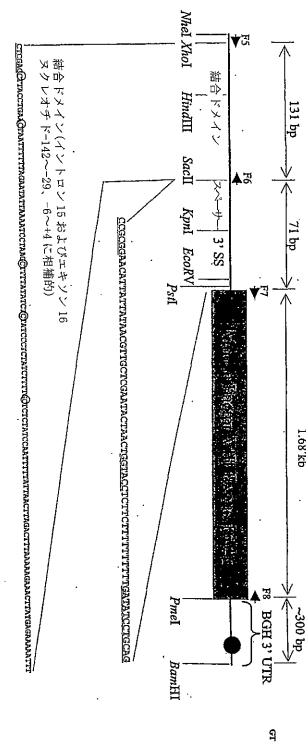
GTAAATATATACACCGATATGTCTTAACCTGATTGGGGCTTGGATACGCTAAGATCCACGG
CTAGAAAGTTTTCACATAATTTCTTACTCTCTGAATCATGCTTGGATGACGCTCTGTATCTATATCATCATTTG
GAACACCAATGATGATTTTCTTTATGTGTCTTGGCATATTCCTGGAAACATGATAACACATGAAATCTTCCACTGT
GCTTAACTTTATCCCTCGAATCTCCATTTCTCCCATATCATCTATCAACTGAACTCTGGAAATAAACCCATCTT
ATTAACTCTATTCAATCAACGCT

【 図 4 4 A 】

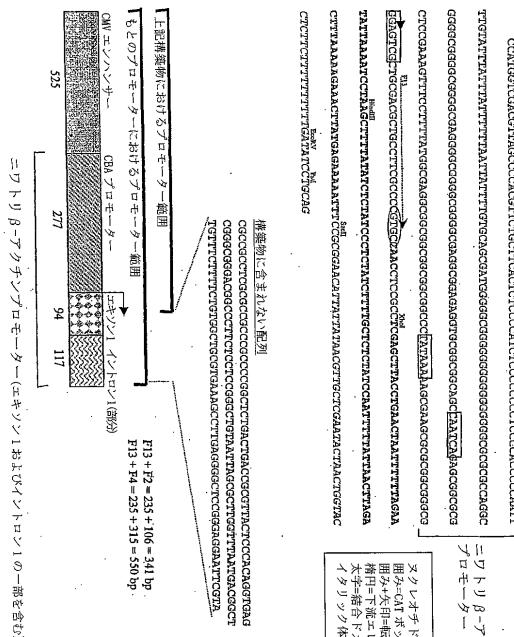
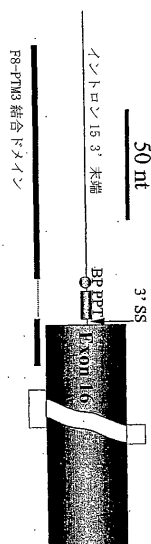
トランススプライシングドメイン

ATAATGACGAAGCCGCCCCACGCTCAGGATTCACCTGCCCCCAATTATCATCCTAAGCAGAAGTGATATTCCTTA
TTGTAAAGATTCTATTAACTCATTGATTCAAAATATTTAAATACTTCCTGTTTCACCTACTCTGCTATGCACCCGC
GGACATTATTATAAGTTGCTCGAATACTAACTGGTACCTCTCTTTTTTTTTTGATATCTGCG

エキソン 10-24

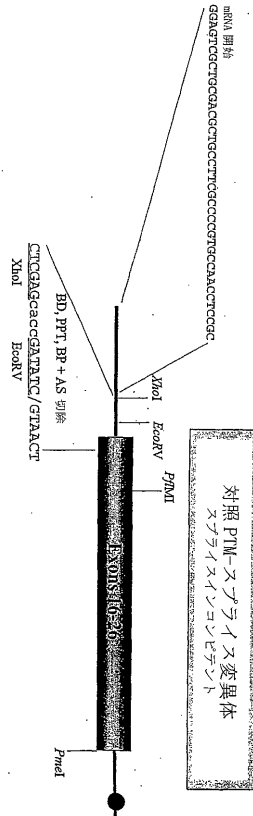
[illegible]

【図 4 4 C】



スケレオチド変異は音で示す。
 読み=CAT ボツクス、TATA ボツクス
 読み+矢印=転写開始
 精円=下流エノキソト
 太字=結合ドメイン
 イタリイ体=スベークーサー+PT+BP+AG ジスレオチド

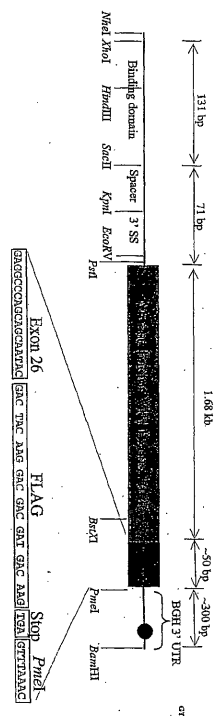
【 図 4 4 D 】



方法: TSD およびエキソン 16 の一部を XhoI および PfuMI で切除し、以下のような PCR 産物において連結する。

- 1) TSD およびスプライス受容部位を除去する
- 2) エキソン 16 の位置に EcoRI を挿入する
- 3) エキソン 16 のコードを回復する

【図 4 7 A】



エキソン16~26の正常配列およびC末端FLAGタグを含むマウス因子VIII PTMの詳細な構造。BGH=ウシ成長ホルモン3' UTR; 結合ドメイン=125bp

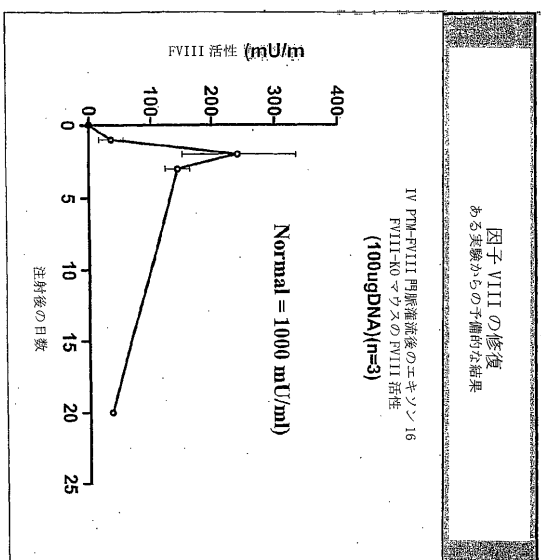
FLAG タグの導入のための参考文献

Brunn T, Kaye D, Lyons PM, Shirley P, Roy S, Kaido M, Smith T.
Adenoviral vector-mediated expression of physiological levels of human factor VIII in nonhuman primates.
Hum Gene Ther 1999 Dec 10;10(18):2293-301.

Genetic Therapy, Inc., a Novartis Company, Gaithersburg, MD 20878, USA.

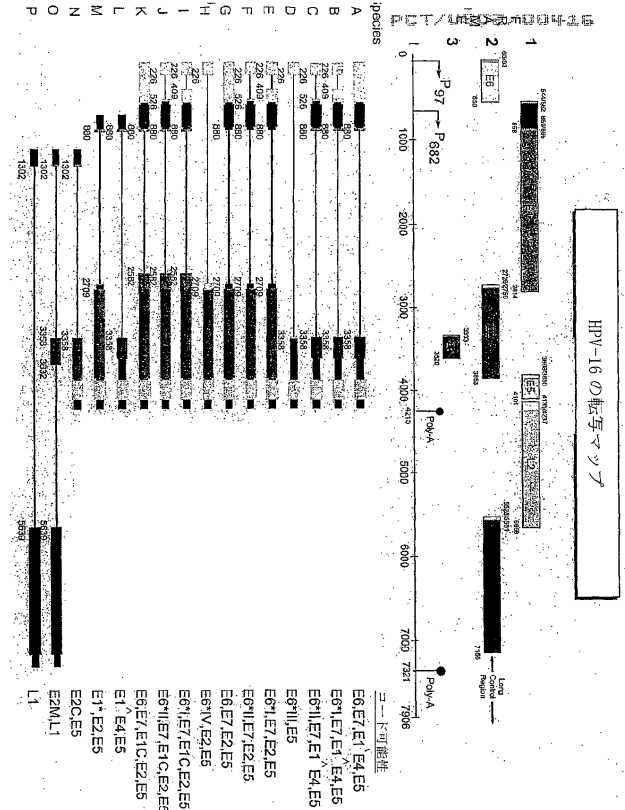
Epitope-tagged B domain-deleted human factor VIII cDNA (Flagged FVIII) was evaluated in nonhuman primates.

【图 4 6】

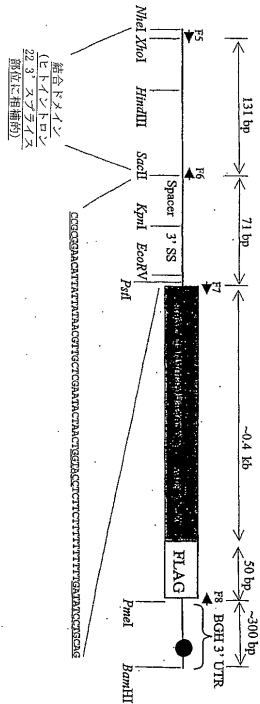


方法
 ナスミドの門脈注射
 ↓
 採血(1、2、3、20日目)
 ↓
 因子VIII活性のアッセイ

【 図 4 8 】

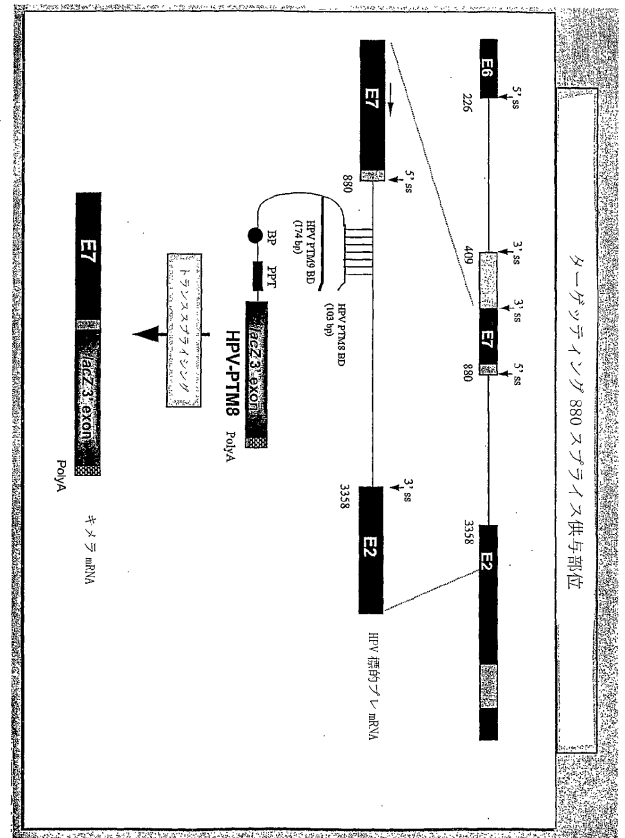


【图 4 7 B】

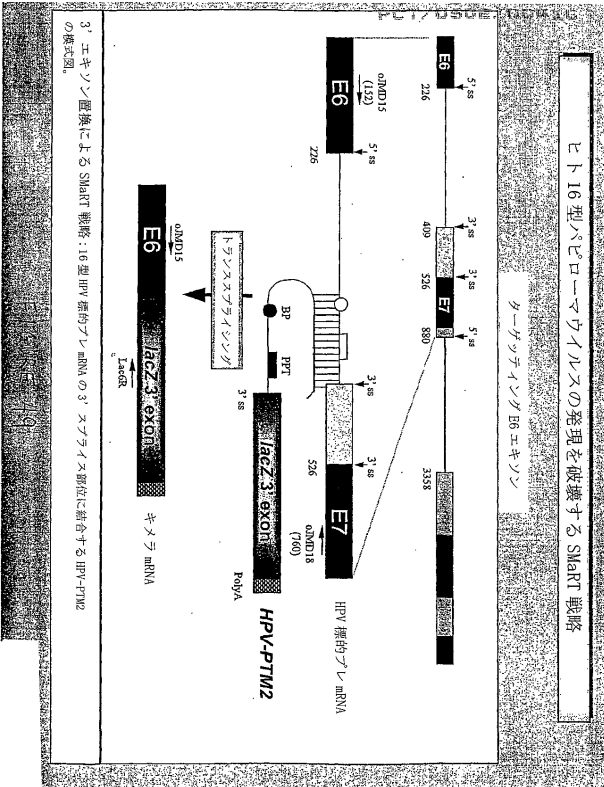


FLAG=修復された因子 VIII タンパク質の検出に用いる C 末端タグ

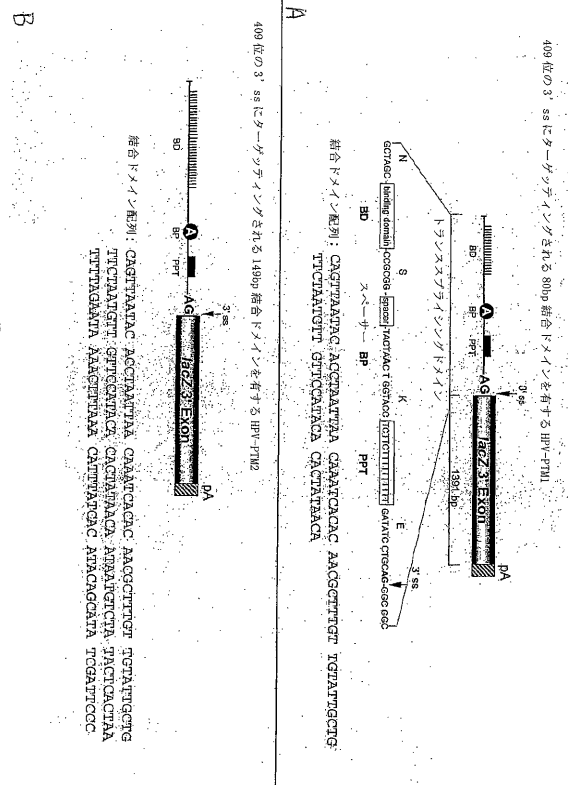
【 図 5 0 】



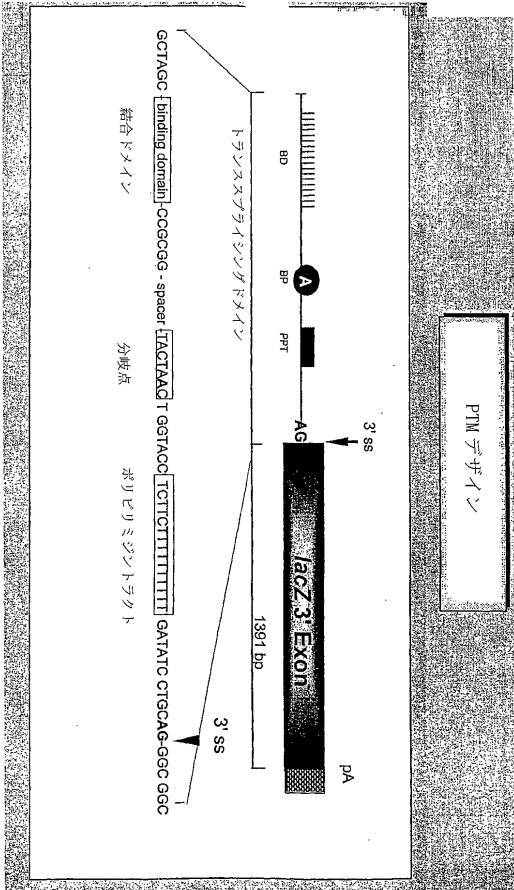
【図 4 9】



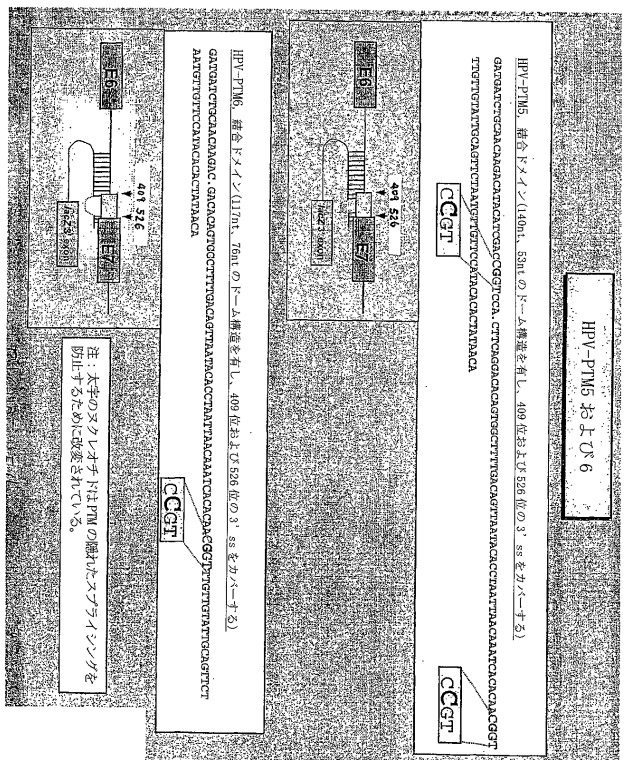
【図 5 2】



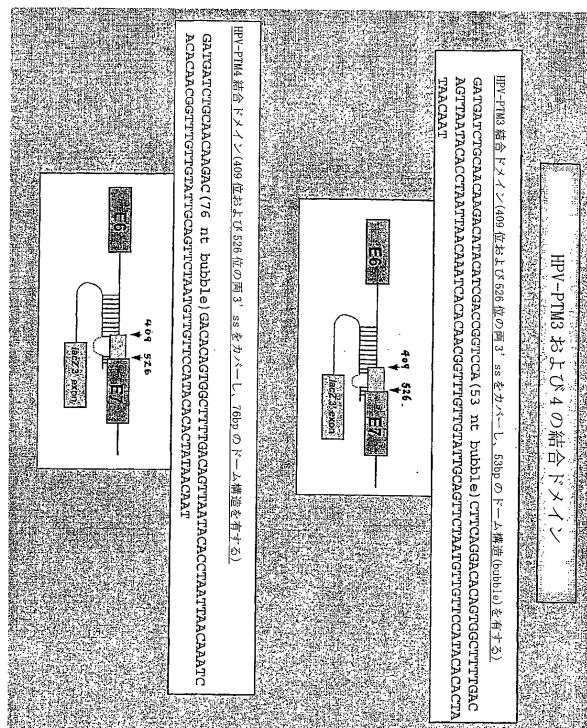
【图 5 1】



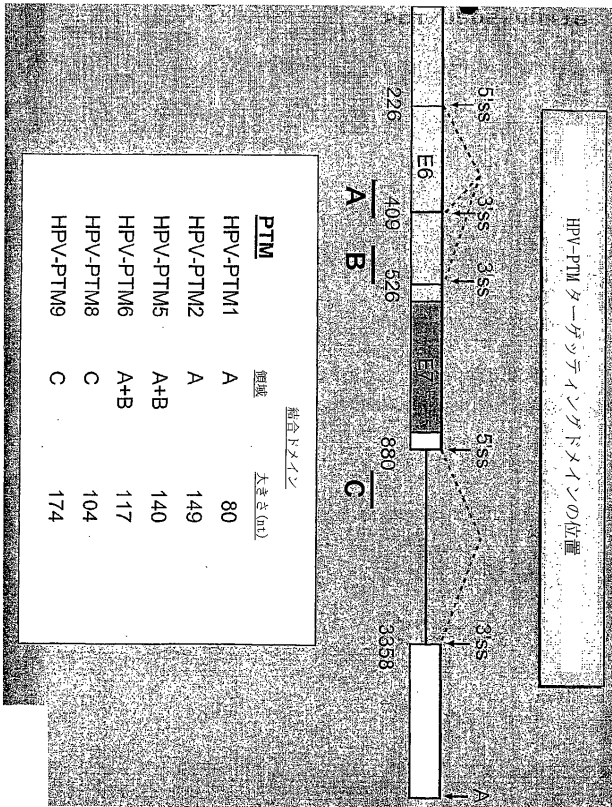
【図 5 4】



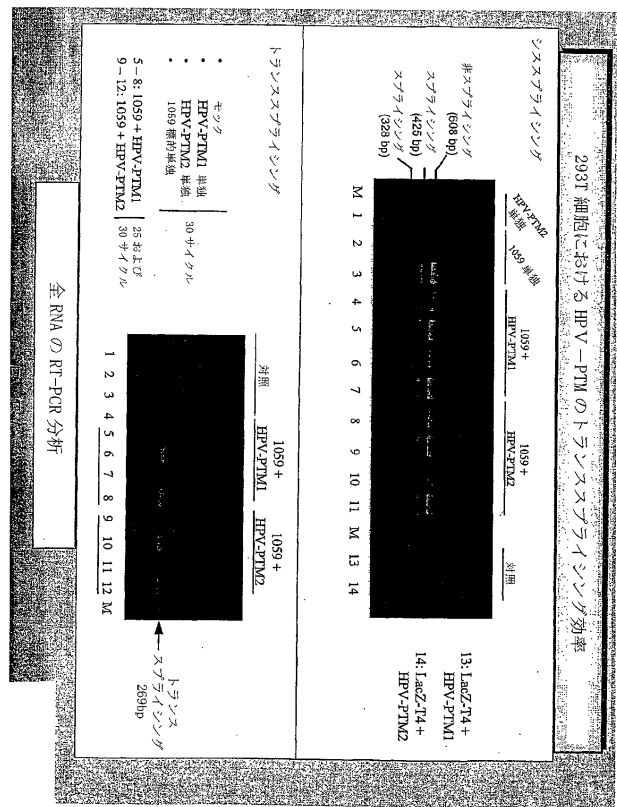
【 図 5 3 】



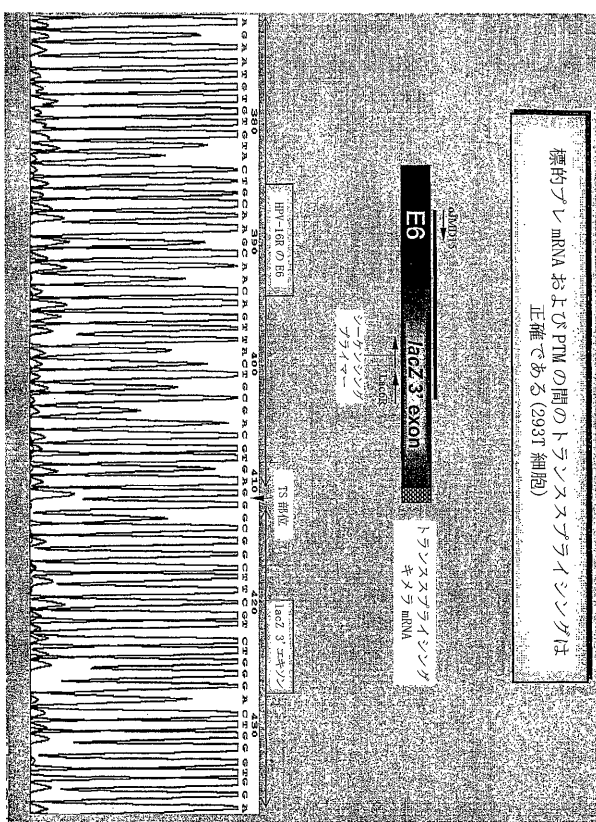
【図 55】



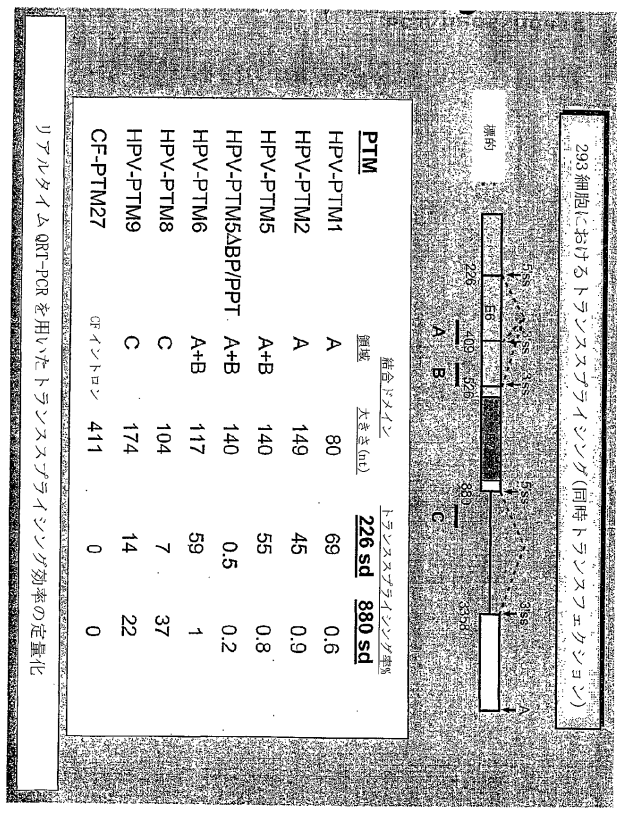
【図 56】



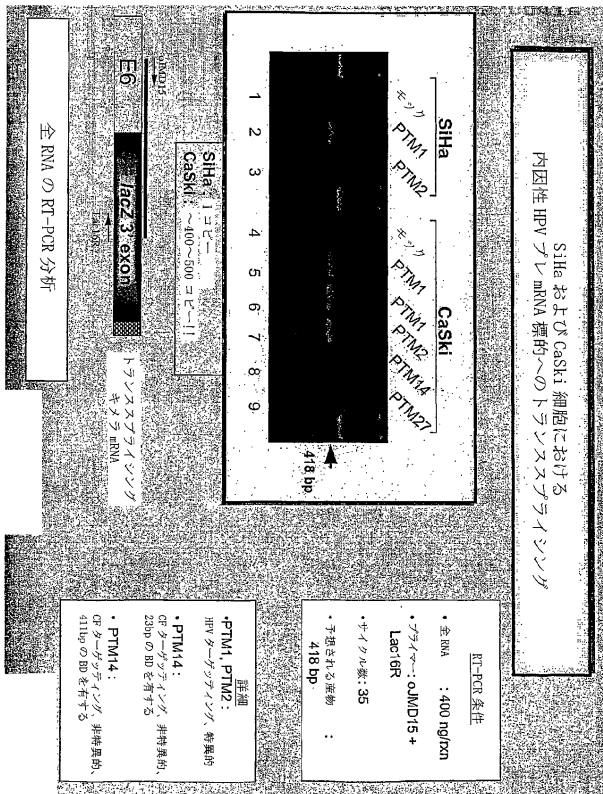
【図 57】



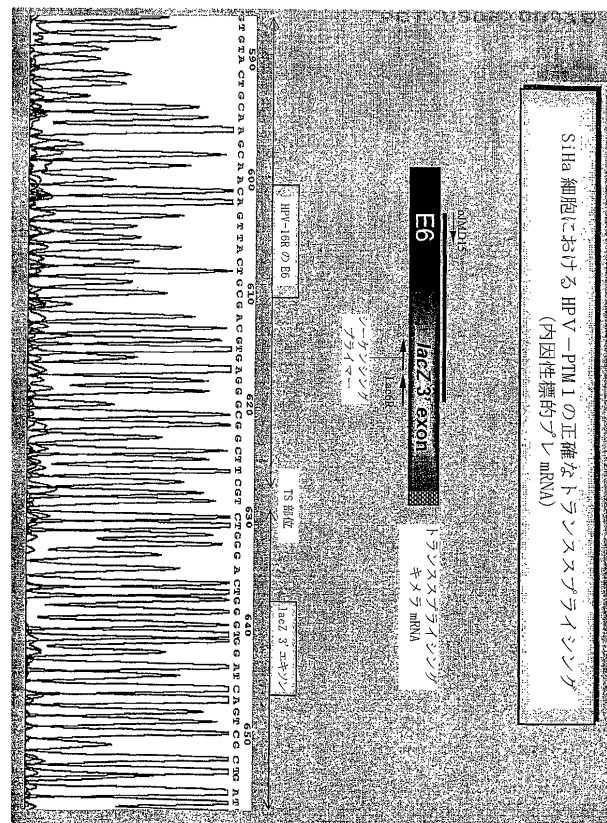
【図 58】



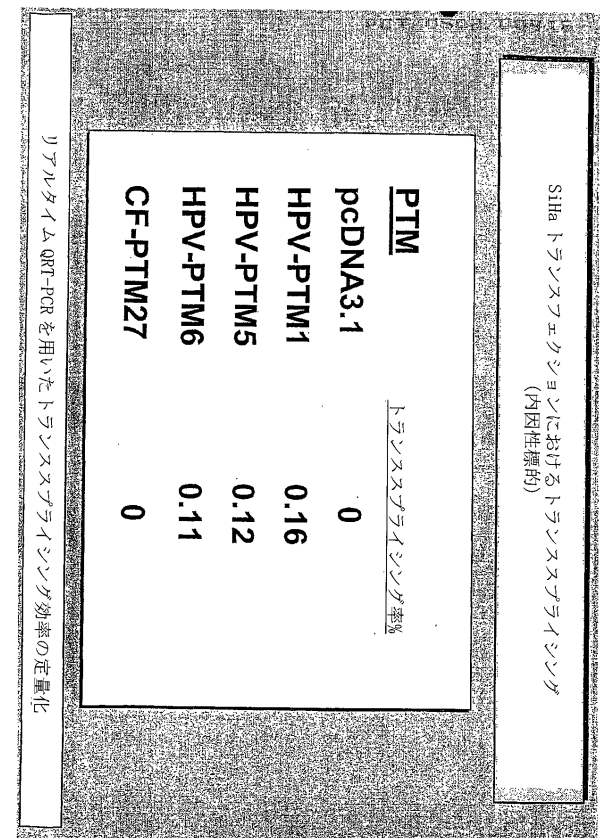
【図 59】



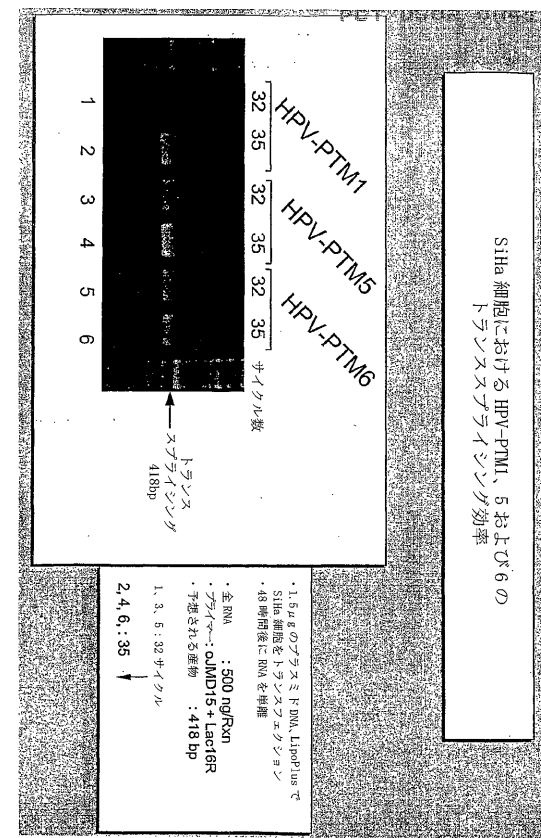
【図 60】



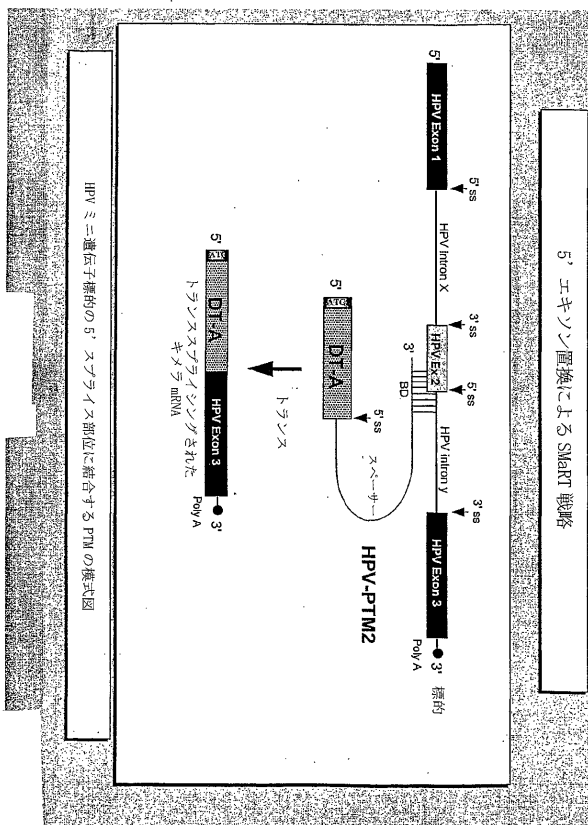
【図 61】



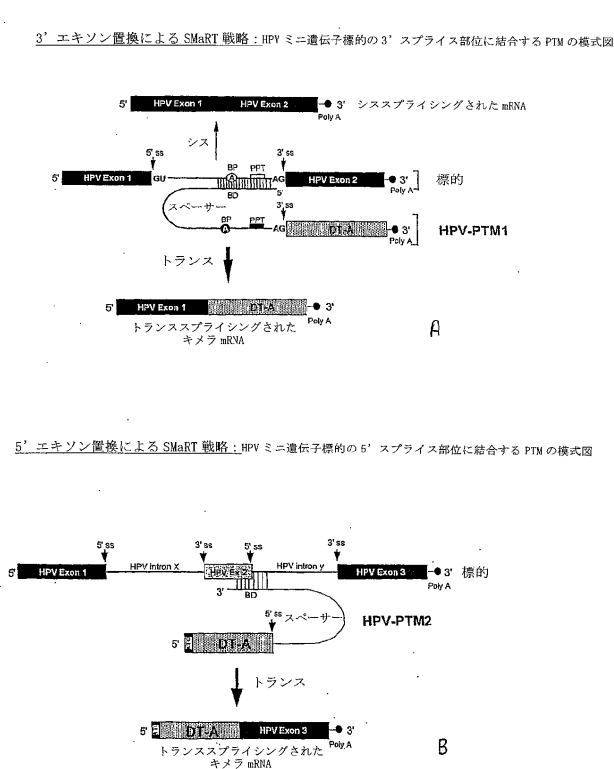
【図 62】



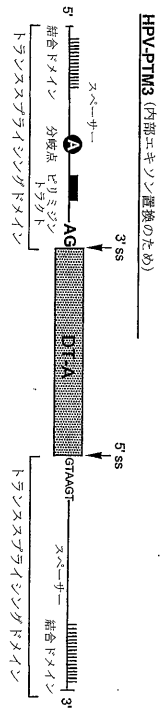
【图 6 4】



【図 6 6】



【図 67】



【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
11 July 2002 (11.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/053581 A2

- (51) International Patent Classification: C07K (74) Agents: SEIDE, Rochelle, K., et al.; Baker Botts, L.L.P. 30 Rockefeller Plaza, New York, NY 10112-0228 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/00416
- (22) International Filing Date: 8 January 2002 (08.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
09/756,095 8 January 2001 (08.01.2001) US
09/756,096 8 January 2001 (08.01.2001) US
09/756,097 8 January 2001 (08.01.2001) US
09/838,858 20 April 2001 (20.04.2001) US
09/941,492 29 August 2001 (29.08.2001) US
- (71) Applicant: INTRONN, INC. [US/US]; 840 Main Campus Drive, Suite 3500, Raleigh, NC 027606 (US).
- (72) Inventors: MITCHELL, Lloyd, G.; 4500 Highgate Drive, Durham, NC 27713 (US). GARCIA-BLANCO, Mariano, A.; 12 Sanderling Court, Durham, NC 27713 (US). BAKER, Carl, C.; 10606 Crossing Creek Road, Potomac, MD 20854 (US). PUTTARAJU, Madalaiah; 416 Tall Oaks Drive, Durham, NC 27713 (US). MANSFIELD, Gary, S.; 1005 Prologue Road, Durham, NC 27712 (US). CHAO, Hengjun; 1000 Smith Level Road, D8, Carboro, NC 27510 (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, GR, GM, HN, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LI, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (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, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- 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 02/053581 A2

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR USE IN SPLICEOSOME MEDIATED RNA TRANS-SPLICING

(57) Abstract: The molecules and methods of the present invention provide a means for *in vivo* production of a trans-spliced molecule in a selected subset of cells. The pre-trans-splicing molecules of the invention are substrates for a *trans*-splicing reaction between the pre-trans-splicing molecules and a pre-mRNA which is uniquely expressed in the specific target cells. The *in vivo trans*-splicing reaction provides a novel mRNA which is functional as mRNA or encodes a protein to be expressed in the target cells. The expression product of the mRNA is a protein of therapeutic value to the cell or host organism a toxin which causes killing of the specific cells or a novel protein not normally present in such cells. The invention further provides PTMs that have been genetically engineered for the identification of exon/intron boundaries of pre-mRNA molecules using an exon tagging method. The PTMs of the invention can also be designed to result in the production of chimeric RNA encoding for peptide affinity purification tags which can be used to purify and identify proteins expressed in a specific cell type.

WO 02/053581

PCT/US02/00416

1

**INHIBITOR OF APOPTOSIS PROTEINS AND NUCLEIC ACIDS AND
METHODS FOR MAKING AND USING THEM****PRIORITY INFORMATION**

5 This application claims priority to United States Provisional Application Serial No.
60/260,478, filed January 8, 2001.

**STATEMENT AS TO RIGHTS TO INVENTIONS MADE UNDER
FEDERALLY SPONSORED RESEARCH**

10 This invention was made in part with Government support under National
Institutes of Health grants ES02701, AG15402, ES 04699, CA30199 (NCI); U.S.
Department of Agriculture grants 97-35302-4406, 9802852; Binational Agriculture
Research and Development grant 96-34339-3532; and, National Institute of
Environmental Health Science grant ES 05707. The Government may have certain rights
in the invention.

TECHNICAL FIELD

15 This invention generally pertains to the fields of cell biology and molecular
biology. In particular, this invention provides polypeptides comprising the inhibitor of
apoptosis protein (IAP) family member BmIAP, initially derived from silkworm *Bombyx*
mori BmN cells, and nucleic acids encoding them, and methods for making and using
these compositions, including their use for inhibiting caspase proteases and apoptosis.

BACKGROUND

20 Apoptosis or programmed cell death is a cellular suicide process in which damaged
or harmful cells are eliminated from multicellular organisms. Cells undergoing apoptosis
have distinct morphological changes including cell shrinkage, membrane blebbing,
chromatin condensation, apoptotic body formation and fragmentation. This cell suicide
25 program is evolutionarily conserved across animal and plant species. Apoptosis plays an
important role in the development and homeostasis of metazoans and is also critical in
insect embryonic development and metamorphosis. Furthermore, apoptosis acts as a host
defense mechanism. For example, virally infected cells are eliminated by apoptosis to
limit the propagation of viruses. Apoptosis mechanisms are involved in plant reactions to
30 biotic and abiotic insults. Dysregulation of apoptosis has been associated with a variety of
human diseases including cancer, neurodegenerative disorders and autoimmune diseases.
Accordingly, identification of novel mechanisms to manipulate apoptosis provides new
means to study and manipulate this process.

METHODS AND COMPOSITIONS FOR USE IN
SPLICEOSOME MEDIATED RNA *TRANS*-SPLICING

SPECIFICATION

The present application is a continuation-in-part of a pending
5 application 09/838,858 filed on April 20, 2001 which is a continuation-in-part of
pending application serial number 09/756096 filed January 8, 2001 which is a
continuation-in-part of pending application serial number 09/158,863 filed September
23, 1998 which is a continuation-in-part of serial number 09/133,717 filed on August
13, 1998 which is a continuation-in-part of serial number 09/087,233 filed on May 28,
10 1998, which is a continuation-in-part of pending application serial number 08/766,354
filed on December 13, 1996, which claims benefit to provisional application number
60/008,317 filed on December 15, 1995.

The present invention was made with government support under Grant
Nos. SBIR R43DK56526-01 and SBIR R44DK56526-02. The government has
15 certain rights in the invention.

1. INTRODUCTION

The present invention provides methods and compositions for
generating novel nucleic acid molecules through targeted spliceosomal *trans*-splicing.
The compositions of the invention include pre-*trans*-splicing molecules (PTMs)
20 designed to interact with a natural target precursor messenger RNA molecule (target
pre-mRNA) and mediate a *trans*-splicing reaction resulting in the generation of a
novel chimeric RNA molecule (chimeric RNA). The PTMs of the invention are
genetically engineered so as to result in the production of a novel chimeric RNA
which may itself perform a function, such as inhibiting the translation of the RNA, or
25 that encodes a protein that complements a defective or inactive protein in a cell, or
encodes a toxin which kills specific cells. Generally, the target pre-mRNA is chosen
as a target because it is expressed within a specific cell type thus providing a means
for targeting expression of the novel chimeric RNA to a selected cell type. The
invention further relates to PTMs that have been genetically engineered for the

identification of exon/intron boundaries of pre-mRNA molecules using an exon tagging method. In addition, PTMs can be designed to result in the production of chimeric RNA encoding for peptide affinity purification tags which can be used to purify and identify proteins expressed in a specific cell type. The methods of the invention encompass contacting the PTMs of the invention with a target pre-mRNA under conditions in which a portion of the PTM is *trans*-spliced to a portion of the target pre-mRNA to form a novel chimeric RNA molecule. The methods and compositions of the invention can be used in cellular gene regulation, gene repair and suicide gene therapy for treatment of proliferative disorders such as cancer or treatment of genetic, autoimmune or infectious diseases. In addition, the methods and compositions of the invention can be used to generate novel nucleic acid molecules in plants through targeted splicing. For example, targeted *trans*-splicing may be used to regulate gene expression in plants for treatment of plants diseases, engineering of disease resistant plants or expression of desirable genes in plants. The methods and compositions of the invention can also be used to map intron-exon boundaries and to identify novel proteins expressed in any given cell.

2. BACKGROUND OF THE INVENTION

DNA sequences in the chromosome are transcribed into pre-mRNAs which contain coding regions (exons) and generally also contain intervening non-coding regions (introns). Introns are removed from pre-mRNAs in a precise process called splicing (Chow *et al.*, 1977, Cell 12:1-8; and Berget, S.M. *et al.*, 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:3171-3175). Splicing takes place as a coordinated interaction of several small nuclear ribonucleoprotein particles (snRNP's) and many protein factors that assemble to form an enzymatic complex known as the spliceosome (Moore *et al.*, 1993, in The RNA World, R.F. Gestland and J.F. Atkins eds. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Kramer, 1996, Annu. Rev. Biochem., 65:367-404; Staley and Guthrie, 1998, Cell 92:315-326).

Pre-mRNA splicing proceeds by a two-step mechanism. In the first step, the 5' splice site is cleaved, resulting in a "free" 5' exon and a lariat intermediate (Moore, M.J. and P.A. Sharp, 1993, Nature 365:364-368). In the second step, the 5' exon is ligated to the 3' exon with release of the intron as the lariat product. These steps are catalyzed in a complex of small nuclear ribonucleoproteins and proteins called the spliceosome. The splicing reaction sites are defined by consensus sequences around the 5' and 3' splice sites. The 5' splice site consensus sequence is AG/GURAGU (where A=adenosine, U = uracil, G = guanine, C = cytosine, R = purine and / = the splice site). The 3' splice region consists of three separate sequence elements: the branch point or branch site, a polypyrimidine tract and the 3' splice consensus sequence (YAG). These elements loosely define a 3' splice region, which may encompass 100 nucleotides of the intron upstream of the 3' splice site. The branch point consensus sequence in mammals is YNYURAC (where N = any nucleotide, Y= pyrimidine). The underlined A is the site of branch formation (the BPA = branch point adenosine). The 3' splice consensus sequence is YAG/G. Between the branch point and the splice site there is usually found a polypyrimidine tract, which is important in mammalian systems for efficient branch point utilization and 3' splice site recognition (Roscinio, R., F. *et al.*, 1993, J. Biol. Chem. 268:11222-11229). The first YAG trinucleotide downstream from the branch point and polypyrimidine tract is the most commonly used 3' splice site (Smith, C.W. *et al.*, 1989, Nature 342:243-247).

In most cases, the splicing reaction occurs within the same pre-mRNA molecule, which is termed *cis*-splicing. Splicing between two independently transcribed pre-mRNAs is termed *trans*-splicing. *Trans*-splicing was first discovered in trypanosomes (Sutton & Boothroyd, 1986, Cell 47:527; Murphy *et al.*, 1986, Cell 47:517) and subsequently in nematodes (Krause & Hirsh, 1987, Cell 49:753); flatworms (Rajkovic *et al.*, 1990, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 87:8879; Davis *et al.*, 1995, J. Biol. Chem. 270:21813) and in plant mitochondria (Malek *et al.*, 1997, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 94:553). In the parasite *Trypanosoma brucei*, all mRNAs acquire a splice leader (SL) RNA at their 5' termini by *trans*-splicing. A 5' leader sequence is also *trans*-spliced onto some genes in *Caenorhabditis elegans*. This

mechanism is appropriate for adding a single common sequence to many different transcripts.

The mechanism of *trans*-splicing, which is nearly identical to that of conventional *cis*-splicing, proceeds via two phosphoryl transfer reactions. The first causes the formation of a 2'-5' phosphodiester bond producing a 'Y' shaped branched intermediate, equivalent to the lariat intermediate in *cis*-splicing. The second reaction, exon ligation, proceeds as in conventional *cis*-splicing. In addition, sequences at the 3' splice site and some of the snRNPs which catalyze the *trans*-splicing reaction, closely resemble their counterparts involved in *cis*-splicing.

Trans-splicing may also refer to a different process, where an intron of one pre-mRNA interacts with an intron of a second pre-mRNA, enhancing the recombination of splice sites between two conventional pre-mRNAs. This type of *trans*-splicing was postulated to account for transcripts encoding a human immunoglobulin variable region sequence linked to the endogenous constant region in a transgenic mouse (Shimizu *et al.*, 1989, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86:8020). In addition, *trans*-splicing of c-myc pre-mRNA has been demonstrated (Vellard, M. *et al.* Proc. Nat'l. Acad. Sci., 1992 89:2511-2515) and more recently, RNA transcripts from cloned SV40 *trans*-spliced to each other were detected in cultured cells and nuclear extracts (Eul *et al.*, 1995, EMBO. J. 14:3226). However, naturally occurring *trans*-splicing of mammalian pre-mRNAs is thought to be an exceedingly rare event.

In vitro trans-splicing has been used as a model system to examine the mechanism of splicing by several groups (Konarska & Sharp, 1985, Cell 46:165-171; Solnick, 1985, Cell 42:157; Chiara & Reed, 1995, Nature 375:510; Pasman and Garcia-Blanco, 1996, Nucleic Acids Res. 24:1638). Reasonably efficient *trans*-splicing (30% of *cis*-spliced analog) was achieved between RNAs capable of base pairing to each other, splicing of RNAs not tethered by base pairing was further diminished by a factor of 10. Other *in vitro trans*-splicing reactions not requiring obvious RNA-RNA interactions among the substrates were observed by Chiara & Reed (1995, Nature 375:510), Bruzik J.P. & Maniatis, T. (1992, Nature 360:692) and Bruzik J.P. and Maniatis, T., (1995, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 92:7056-7059).

These reactions occur at relatively low frequencies and require specialized elements, such as a downstream 5' splice site or exonic splicing enhancers.

In addition to splicing mechanisms involving the binding of multiple proteins to the precursor mRNA which then act to correctly cut and join RNA, a third mechanism involves cutting and joining of the RNA by the intron itself, by what are termed catalytic RNA molecules or ribozymes. The cleavage activity of ribozymes has been targeted to specific RNAs by engineering a discrete "hybridization" region into the ribozyme. Upon hybridization to the target RNA, the catalytic region of the ribozyme cleaves the target. It has been suggested that such ribozyme activity would be useful for the inactivation or cleavage of target RNA *in vivo*, such as for the treatment of human diseases characterized by production of foreign or aberrant RNA. The use of antisense RNA has also been proposed as an alternative mechanism for targeting and destruction of specific RNAs. In such instances small RNA molecules are designed to hybridize to the target RNA and by binding to the target RNA prevent translation of the target RNA or cause destruction of the RNA through activation of nucleases.

Until recently, the practical application of targeted *trans*-splicing to modify specific target genes has been limited to group I ribozyme-based mechanisms. Using the *Tetrahymena* group I ribozyme, targeted *trans*-splicing was demonstrated in *E. coli* (Sullenger B.A. and Cech. T.R., 1994, Nature 341:619-622), in mouse fibroblasts (Jones, J.T. et al., 1996, Nature Medicine 2:643-648), human fibroblasts (Phylacton, L.A. et al. Nature Genetics 18:378-381) and human erythroid precursors (Lan et al., 1998, Science 280:1593-1596). While many applications of targeted RNA *trans*-splicing driven by modified group I ribozymes have been explored, targeted *trans*-splicing mediated by native mammalian splicing machinery, *i.e.*, spliceosomes, has not been previously reported.

3. SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to compositions and methods for generating novel nucleic acid molecules through spliceosome-mediated targeted *trans*-splicing. The compositions of the invention include pre-*trans*-splicing

molecules (hereinafter referred to as "PTMs") designed to interact with a natural target pre-mRNA molecule (hereinafter referred to as "pre-mRNA") and mediate a spliceosomal *trans*-splicing reaction resulting in the generation of a novel chimeric RNA molecule (hereinafter referred to as "chimeric RNA"). The methods of the invention encompass contacting the PTMs of the invention with a natural target pre-mRNA under conditions in which a portion of the PTM is spliced to the natural pre-mRNA to form a novel chimeric RNA. The PTMs of the invention are genetically engineered so that the novel chimeric RNA resulting from the *trans*-splicing reaction may itself perform a function such as inhibiting the translation of RNA, or alternatively, the chimeric RNA may encode a protein that complements a defective or inactive protein in the cell, or encodes a toxin which kills the specific cells. Generally, the target pre-mRNA is chosen because it is expressed within a specific cell type thereby providing a means for targeting expression of the novel chimeric RNA to a selected cell type. The target cells may include, but are not limited to those infected with viral or other infectious agents, benign or malignant neoplasms, or components of the immune system which are involved in autoimmune disease or tissue rejection. The PTMs of the invention may also be used to correct genetic mutations found to be associated with genetic diseases. In particular, double-*trans*-splicing reactions can be used to replace internal exons. The PTMs of the invention can also be genetically engineered to tag exon sequences in a mRNA molecule as a method for identifying intron/exon boundaries in target pre-mRNA. The invention further relates to the use of PTM molecules that are genetically engineered to encode a peptide affinity purification tag for use in the purification and identification of proteins expressed in a specific cell type. The methods and compositions of the invention can be used in gene regulation, gene repair and targeted cell death. Such methods and compositions can be used for the treatment of various diseases including, but not limited to, genetic, infectious or autoimmune diseases and proliferative disorders such as cancer and to regulate gene expression in plants.

4. BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1A. Model of Pre-*Trans*-splicing RNA.

Figure 1B. Model PTM constructs and targeted *trans*-splicing strategy. Schematic representation of the first generation PTMs (PTM+Sp and PTM-Sp). BD, binding domain; NBD, non-binding domain; BP, branch point; PPT, pyrimidine tract; ss, splice site and DT-A, diphtheria toxin subunit A. Unique restriction sites within the PTMs are indicated by single letters: E; EcoRI; X, XhoI; K, KpnI; P, PstI; A, AclI; B, BamHI and H; HindIII.

Figure 1C. Schematic drawing showing the binding of PTM+Sp via conventional Watson Crick base pairing to the β HCG6 target pre-mRNA and the proposed *cis*- and *trans*-splicing mechanism.

Figure 2A. *In vitro trans*-splicing efficiency of various PTM constructs into β HCG6 target. A targeted binding domain and active splice sites correlate with PTM *trans*-splicing activity. Full length targeted (pcPTM+Sp), non-targeted (PTM-Sp) and the splice mutants [Py(-)AG(-) and BP(-)Py(-)AG(-)] PTM RNAs were added to splicing reactions containing β HCG6 target pre-mRNA. The products were RT-PCR amplified using primers β HCG-F (specific for target β HCG6 exon 1) and DT-5R (complementary to DT-A) and analyzed by electrophoresis in a 1.5% agarose gel.

Figure 2B. *In vitro trans*-splicing efficiency of various PTM constructs. Full length PTM with a spacer between the binding domain and splice site (PTM+Sp), PTM without the spacer region (PTM+) and short PTMs that contain a target binding domain (short PTM+) or a non-target binding region (PTM-) were added to splicing reactions containing β HCG target pre-mRNA. The products were RT-PCR amplified using primers β HCG-F and DT-3. For reactions containing the short PTMs, the reverse PCR primer was DT-4, since the binding site for DT-3 was removed from the PTM.

Figure 3. Nucleotide sequence demonstrating the *in vitro trans*-spliced product between a PTM and target pre-mRNA. The 466 bp *trans*-spliced RT-PCR product from Figure 2 (lane 2) was re-amplified using a 5' biotin labeled forward primer (β HCG-F) and a nested unlabeled reverse primer (DT-3R). Single stranded

DNA was purified and sequenced directly using toxin specific DT-3R primer. The arrow indicates the splice junction between the last nucleotide of target β HCG6 exon I and the first nucleotide encoding DT-A.

Figure 4A. Schematic diagram of the "safety" PTM and variations, demonstrating the PTM intramolecular base-paired stem, intended to mask the BP and PPT from splicing factors. Underlined sequences represent the β HCG6 intron 1 complementary target-binding domain, sequence in italics indicate target mismatches that are homologous to the BP.

Figure 4B. Schematic of a safety PTM in open configuration upon binding to the target.

Figure 4C. *In vitro trans*-splicing reactions were carried out by incubating either safety PTM or safety PTM variants with the β HCG6 target. Splicing reactions were amplified by RT-PCR using β HCG-F and DT-3R primers; products were analyzed in a 2.0% agarose gel.

Figure 5. Specificity of targeted *trans*-splicing is enhanced by the inclusion of a safety into the PTM. β HCG6 pre-mRNA (250 ng) and β -globin pre-mRNA (250 ng) were annealed together with either PTM+SF (safety) or pcPTM+Sp (linear) RNA (500 ng). *In vitro trans*-splicing reactions and RT-PCR analysis were performed as described under experimental procedures and the products were separated on a 2.0% agarose gel. Primers used for RT-PCR are as indicated.

Figure 6. In the presence of increasing PTM concentration, *cis*-splicing is inhibited and replaced by *trans*-splicing. *In vitro* splicing reactions were performed in the presence of a constant amount of β HCG6 target pre-mRNA (100 ng) with increasing concentrations of PTM (pcPTM+Sp) RNA (52-300 ng). RT-PCR for *cis*-spliced and un-spliced products utilized primers β HCG-F (exon 1 specific) and β HCG-R2 (exon 2 specific - Panel A); primers β HCG-F and DT-3R were used to RT-PCR *trans*-spliced products (Panel B). Reaction products were analyzed on 1.5% and 2.0% agarose gels, respectively. In panel A, lane 9 represents the 60 min time point in the presence of 300 ng of PTM, which is equivalent to lane 10 in panel B.

Figure 7A. PTMs are capable of *trans*-splicing in cultured human cancer cells. Total RNA was isolated from each of 4 expanded neomycin resistant

H1299 lung carcinoma colonies transfected with pcSp+CRM (expressing non-toxic mutant DT-A) RT-PCR was performed using 1 µg of total RNA and 5' biotinylated βHCG-F and non-biotinylated DT-3R primers. Single stranded DNA was purified and sequenced.

5 Figure 7B. Nucleotide sequence (sense strand) of the *trans*-spliced product between endogenous βHCG6 target and CRM197 mutant toxin is shown. Two arrows indicate the position of the splice junction.

Figure 8A. Schematic diagram of a double splicing pre-therapeutic mRNA.

10 Figure 8B. Selective *trans*-splicing of a double splicing PTM. By varying the PTM concentration the PTM can be *trans*-spliced into either the 5' or the 3' splice site of the target.

Figure 9. Schematic diagram of the use of PTM molecules for exon tagging. Two examples of PTMs are shown. The PTM on the left is capable of non-specifically trans-splicing into a target pre-mRNA 3' splice site. The other PTM on 15 the right is designed to non-specifically trans-splice into a target pre-mRNA 5' splice site. A PTM mediated trans-splicing reaction will result in the production of a chimeric RNA comprising a specific tag to either the 5' or 3' side of an authentic exon.

Figure 10A. Schematic diagram of constructs for use in the lacZ 20 knock-out model. The target lacZ pre-mRNA contains the 5' fragment of lacZ followed by βHCG6 intron 1 and the 3' fragment of lacZ (target 1). The PTM molecule for use in the model system was created by digesting pPTM +SP with PstI and HindIII and replacing the DT-A toxin with βHCG6 exon 2 (pc3.1PTM2).

Figure 10B. Schematic diagram of restoration of β-Gal activity by 25 Spliceosome Mediated RNA Trans-splicing. Schematic diagram of constructs for use in the lacZ knock-in model (pc.3.1 lacZ T2). The lacZ target pre-mRNA is identical to that target pre-mRNA used for the knock-out experiments except that it contains two stop codons (TAA TAA) in frame four codons after the 3' splice site. The PTM molecule for use in the model system was created by digesting pPTM +SP with PstI 30 and HindIII and replacing the DT-A toxin with functional 3' fragment of lacZ.

Figure 11A. Demonstration of *cis*- and *trans*-splicing when utilizing the lacZ knock-out model. The LacZ splice target 1 pre-mRNA and PTM2 were co-transfected into 293T cells. Total RNA was then isolated and analyzed by PCR for *cis*-spliced and *trans*-spliced products using the appropriate specific primers. The amplified PCR products were separated on a 2% agarose gel.

Figure 11B-C. Assays for β -galactosidase activity. 293 cells were transfected with lacZ target 2 DNA alone (panel B) or lacZ target 2 DNA and PTM1 (panel C).

Figure 12A. Nucleotide sequence of *trans*-spliced molecule demonstrating accurate *trans*-splicing.

Figure 12B. Nucleotide sequences of the *cis*-spliced product and the *trans*-spliced product. The nucleotide sequences were those sequences expected for each of the different splicing reactions.

Figure 13. Gene repair model for repair of the cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene.

Figure 14. RT-PCR demonstration of *trans*-splicing between an exogenously supplied CFTR mini-gene target and PTM. Plasmids were co-transfected into 293 embryonic kidney cells. The primers pairs used for RT-PCR reactions are listed above each lane. The lower band (471 bp) in each lane represents a *trans*-spliced product. The lower band in lane 1 (471bp) was purified from a 2% Seakem agarose gel and the DNA sequence of the band was determined.

Figure 15. DNA sequence of the *trans*-spliced product (lane 1, lower band shown in Figure 14). The DNA sequence indicates the presence of the F508 codon (CTT), exon 9 sequence is contiguous with exon 10 sequence, and the His tag sequence.

Figure 16. Schematic representation of repair of an exogenously supplied CFTR target molecule carrying an F508 deletion in exon 10.

Figure 17. Repair of endogenous CFTR transcripts by exon 10 replacement using a double splicing PTM. The use of a double splicing PTM permits repair of the Δ 508 mutation with a very short PTM molecule.

Figure 18. Model lacZ target consisting of lacZ 5' exon - CFTR mini-intron 9 - CFTR exon 10 (delta 508) - CFTR mini-intron 10 followed by the lacZ 3' exon. Binding domains for PTMs are bracketed.

Figure 19. Schematic representation of double-*trans*-splicing PTMs
5 designed to restore β -gal function.

Figure 20. Schematic representation of a double-*trans*-splicing reaction showing the binding of DSPTM7 with DSCFT1.6 target pre-mRNA.

Figure 21. Important structural elements of DSPTM7. The double splicing PTM has both 3' and 5' functional splice sites as well as binding domains.

10 Figure 22. Schematic diagram of mutant double splicing PTMs.

Figure 23. Accuracy of double-*trans*-splicing reaction.

Figure 24. Double-*trans*-splicing between the target pre-mRNA and the DSPTM7 produces full-length protein. Western blot analysis of total cell lysates using polyclonal anti- β -galactosidase antiserum.

15 Figure 25. Precise internal exon substitution between the DSCFT1.6 target pre-mRNA and DSPTM7 RNA by double-*trans*-splicing produces functionally active β -gal protein. Total cell extracts were prepared and assayed for β -gal activity using an ONPG assay.

20 Figure 26. 3' and 5' splice sites are essential for the restoration of β -gal function by double-*trans*-splicing reaction.

Figure 27. Double-*trans*-splicing: titration of target and PTM. Different concentrations of the target and PTM were co-transfected and analyzed for β -gal activity restoration.

25 Figure 28. Constructs designed to test the specificity of double-*trans*-splicing reaction.

Figure 29. Specificity of a double-*trans*-splicing reaction.

Figure 30. *Trans*-splicing repair of the cystic fibrosis gene using a PTM that mediates a double-*trans*-splicing event.

30 Figure 31. PTM with a long binding domain masking two splice sites and part of exon 10 in a mini-gene target.

Figure 32. Sequence of a single PCR product showing target exon 9 correctly spliced to PTM exon 10 (with modified codons) (upper panel), codon 508 in exon 10 of the PTM (middle panel) and PTM exon 10 correctly spliced to target exon 11 (lower panel). The sequence of a repaired target was generated by RT-PCR followed by PCR.

Figure 33. *Trans*-splicing repair of the cystic fibrosis gene using a PTM that can perform 5' exon replacement.

Figure 34. Schematic diagram of three different PTM molecules with different binding domains.

Figure 35. Schematic diagram of PTM exon 10 with modified codon usage to reduce antisense effects with its own binding domain.

Figure 36. Sequence of *cis*- and *trans*-spliced products.

Figure 37. Model system for repair of messenger RNAs by *trans*-splicing. (A) Schematic illustration of a defective lacZCF9m splice target used in the present study (see Materials and Methods for details). BP, branch point; PPT, polypyrimidine tracts; ss, splice sites and pA, polyadenylation signal. (B) A prototype PTM showing the key components of the *trans*-splicing domain, and the diagrams of various PTMs showing the binding domain length and approximate positions at which they bind to the target pre-mRNA. Unique restriction sites within the *trans*-splicing domain are N, *Nhe* I; S, *Sac* II; K, *Kpn* I and E, *Eco*R V. (C) Schematic diagram showing the binding of a PTM through antisense binding and repair of defective *lacZ* pre-mRNA through targeted RNA *trans*-splicing. Expected *cis* and *trans*-spliced products and the primer binding sites for Lac-9F, Lac-3R and Lac-5R are indicated.

Figure 38. Efficient repair of *lacZ* messenger RNA. Target specific primers, Lac-9F (5' exon) and Lac-3R (3' exon) were used to amplify *cis*-spliced products (lanes 1-6), while; target and PTM specific primers, Lac-9F (5' exon) and Lac-5R (3' exon) were used to amplify *trans*-spliced products (lanes 7-15). 25-50 ng of total RNA was used to measure target *cis*-splicing (lanes 1-6) and 50-200 ng of total RNA was used to measure PTM induced RNA *trans*-splicing (lanes 7-12). Lanes 13-15, 25-50 ng of total RNA from cells transfected with lacZCF9 a control for

trans-splicing. (B) Endogenous mRNA repair by *trans*-splicing. Lanes 1-3, RNA from cells transfected with PTM-CF14; lanes 4-6, PTM-CF22 and lanes 7-9, PTM-CF24. Lane 10, RNA from mock-transfected cells and lane 11 is a control in which reverse-transcription reaction was omitted.

5 Figure 39. Messenger RNA repair leads to synthesis of full-length β -galactosidase. Lane 1, lacZCF9 (positive control, 5 μ g); lane 2, lacZCF9m target alone (25 μ g); lane 3, PTM-CF24 alone (25 μ g) and lane 4, lacZCF9m target + PTM-CF24 (25 μ g).

10 Figure 40. Messenger RNA repair by SMaRT produces functional β -galactosidase. (A) In situ detection of functional β -galactosidase produced by *trans*-splicing. 293T cells were either transfected (transient assay) with lacZCF9m target alone (panel A) or co-transfected with lacZCF9m target + PTM-CF24 (panel B) expression plasmids as described above. 48-hr post-transfection, cells were rinsed with PBS and stained *in situ* for β -gal activity. (B) Repair of a defective lacZ mRNA
15 produces functional β -galactosidase. Target and PTM, extracts from cells transfected with either lacZCF9m target or PTM-CF24 plasmid alone, and the rest were from cells co-transfected with lacZCF9m target and one of the PTMs as indicated. (C) Endogenous mRNA repair by *trans*-splicing produces functional β -galactosidase. Stable cells expressing an endogenous lacZCF9m pre-mRNA target was transfected
20 with "linear" PTMs (PTM-CF14, PTM-CF22 or PTM-CF24) as described above. Following transfection, total cell lysate was prepared and assayed for β -gal activity. The results presented are the average of two independent transfections.

Figure 41. Messenger RNA repair is specific. (A) Experimental
25 strategy to measure non-specific *trans*-splicing between lacZHC1m pro-mRNA and "linear" PTMs. (B) Extended binding domains enhance the specificity of *trans*-splicing. Lanes 1-3, PTM-CF14; 4-6, PTM-CF22; 7-9, PTM-CF24; 10-12, PTM-CF26 and 13-15, PTM-CF27. (C) PTMs with very long binding domains are capable of increasing specificity. Total cell extract (5 μ l) was assayed in solution for β -gal activity and the specific activity was calculated. β -gal activity was normalized to
30 mock and the results presented are the average of two independent transfections.

Control, extract from cells transfected with lacZHC1m target alone and the rest were co-transfected with lacZHC1m target and one of the linear PTMs.

Figure 42. Complete sequence of CFTR PTM 30 (5' exon replacement PTM) showing the *trans*-splicing domain (underlined) and the coding sequence for exons 1-10 of the CFTR gene. Modified codons in exon 10 are underlined and bold.

Figure 43A. 153 base-pair PTM 24 Binding Domain.

Figure 43B. Complete sequence of CFTR PTM 24 (3' exon replacement PTM) showing the *trans*-splicing domain (underlined) and the coding sequence for exons 10-24 of the CFTR cDNA. At the end of the coding is a histidine tag and the translation stop codon.

Figure 44A. Detailed structure of the mouse factor VIII PTM containing normal mouse sequences for exons 16-26. BGH=bovine growth hormone 3' UTR (untranslated sequence); Binding Domain=125bp; base changes to eliminate cryptic sites are circled: F5, F6, F7, F8=primer sites.

Figure 44B. Schematic diagram showing the extent of the binding domain in the mouse factor VIII gene.

Figure 44C. Changes to the promoter in AAV vectors pDLZ20 and pDLZ20-M2 to eliminate cryptic donor sites in sequence upstream of the PTM binding domain.

Figure 44D. Factor VIII repair model. Schematic diagram of a PTM binding to the 3' splice site of intron 15 of the mouse factor VIII gene.

Figure 45. Schematic diagram of a F8 PTM with the *trans*-splicing domain eliminated. This represents a control PTM to test whether repair is a result of *trans*-splicing.

Figure 46. Data indicating repair of factor VIII in Factor VIII knock out mice. Blood was assayed for factor VIII activity using a coatest assay.

Figure 47A. Detailed structure of a mouse factor VIII PTM containing normal sequences for exons 16-26 and a C-terminal FLAG tag. BGH=bovine growth hormone 3'UTR; Binding domain=125 bp.

Figure 47B. Detailed structure of a human or canine factor VIII PTM containing normal sequences for exons 23-26.

Figure 48. Transcription Map of HPV-16.

Figure 49. Disruption of Human Papillomavirus Type 16 Expression by PTM. Schematic diagram of HPV-PTM 2 binding to the 3' splice site of the HPV type 16 target pre-mRNA.

5 Figure 50. E7 Targeting Strategy in which Multiple PTMs are targeted to HPV E7.

Figure 51. PTM Design indicating the binding domain, branch point and polypyrimidine tract.

10 Figure 52A. HPV-PTM 1 with 80 bp binding domain targeted to 3' ss at 409.

Figure 52B. HPV-PTM 2 with 149 bp binding domain targeted to 3' ss at 409.

Figure 53. Binding Domains of HPV-PTM 3 and 4.

15 Figure 54. Binding Domains of HPV-PTM 5 and 6. Nucleotides in bold are modified to prevent cryptic splicing of PTMs.

Figure 55. Positions of HPV-PTM targeting domains.

Figure 56. *Trans*-splicing Efficiency of HPV-PTMs in 293 T Cells.

293T cells were con-transfected with 2 µg of p1059 target and 1.5 µg of PTM expression plasmids. 48 hr post-transfection, total RNA was isolated and analyzed by
20 RT-PCR. Target specific primers, oJMD15 and JMD16 were used to amplify *cis*-spliced products (lanes 1-11, upper panel), while; target and PTM specific primers, oJMD15 and Lac-6R were used to amplify *trans*spliced products (lanes 1-12, lower panel). Lanes 13-14 (upper panel), RNA isolated from cells that are transfected with lacZCF9 and HPV-PTM1 and 2 respectively, hence, serve as controls for evaluating
25 the specificity of HPV-PTMs.

Figure 57. Nucleotide sequence showing the *trans*-splice junctions between the HPV target pre-mRNA and the PTM. The RT-PCR product was purified and sequenced directly using primer Lac5R (binds to 3' exon of the PTM). The arrow indicate trans-splice junction between E6 of HPV pre-mRNA target and lacZ 3' exon
30 of the PTM..

Figure 58. *Trans*-splicing in 293 cells (Co-transfections)

Quantification of *trans*-splicing efficiency was determined using real-time QRT-PCR.

Figure 59. *Trans*-splicing efficiency of HPV-PTMs into an endogenous pre-mRNA target. SiHa and CaSki cells were transfected with 1.5 µg of either HPV-PTM1, 2 or CFTR targets PTM14 or 27 expression plasmids. 48 hr post-transsplicing, total RNA was isolated and analyzed by RT-PCR. Trans-splicing between the endogenous HPV target and the PTM was detected using target and PTM specific primers oJMD15 and Lac-16R. The expected *trans*-spliced product (418 bp) is clearly visible in cells that are transfected with HPV-PTMs (lanes 2-3 and 5-7) but not in control (lanes 1 and 4). In addition, *trans*-splicing is also detected in lane 8 due to non-specific *trans*-splicing.

Figure 60. Accurate *Trans*-splicing of HPV-PTM1 in SiHa Cells.

Target pre-mRNA was endogenous mRNA. Sequence analysis of *trans*-spliced chimeric RNA indicates that *trans*-splicing is accurate.

Figure 61. Quantification of *trans*-splicing efficiency in SiHa cells using real-time QRT-PCR.

Figure 62. *Trans*-splicing efficiency of HPV-PTM 1, HPV-PTM 5, & HPV-PTM 6 in SiHa cells. Analysis of total RNA was performed using RT-PCR.

Figure 63. Deletion of polypyrimidine tract abolishes *trans*-splicing. Lanes 1 and 2 represent RNA from cells transfected with mutant HPV-PPT. Lanes 3 and 4 represent RNA from cells transfected with HPV-PTM5 plasmid. 269 bp product resulting from *trans*-splicing is detected.

Figure 64. Schematic Diagram of a PTM binding to the 5' splice site of the HPV mini-gene target and the resulting *trans*-spliced chimera RNA.

Figure 65. Double *Trans*-splicing. Schematic diagram of a double *trans*-splicing PTM binding to the 3' and 5' splice sites of the HPV mini-gene target. The resultant *trans*-spliced mRNA is shown.

Figure 66A. *Trans*-splicing by 3' exon replacement. Schematic diagram of a PTM binding to the 3' splice site of the HPV mini-gene target.

Figure 66B. *Trans*-splicing by 5' exon replacement. Schematic diagram of a PTM binding to the 5' splice site of the HPV mini-gene target.

Figure 67. Schematic of a double splicing HPV-PTM designed for internal exon replacement.

5. DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention relates to compositions comprising pre-*trans*-splicing molecules (PTMs) and the use of such molecules for generating novel nucleic acid molecules. The PTMs of the invention comprise one or more target binding domains that are designed to specifically bind to pre-mRNA, a 3' splice region that includes a branch point, pyrimidine tract and a 3' splice acceptor site and/or a 5' splice donor site; and one or more spacer regions that separate the RNA splice site from the target binding domain. In addition, the PTMs of the invention can be engineered to contain any nucleotide sequences such as those encoding a translatable protein product.

The methods of the invention encompass contacting the PTMs of the invention with a natural pre-mRNA under conditions in which a portion of the PTM is *trans*-spliced to a portion of the natural pre-mRNA to form a novel chimeric RNA. The target pre-mRNA is chosen as a target due to its expression within a specific cell type thus providing a mechanism for targeting expression of a novel RNA to a selected cell type. The resulting chimeric RNA may provide a desired function, or may produce a gene product in the specific cell type. The specific cells may include, but are not limited to those infected with viral or other infectious agents, benign or malignant neoplasms, or components of the immune system which are involved in autoimmune disease or tissue rejection. Specificity is achieved by modification of the binding domain of the PTM to bind to the target endogenous pre-mRNA. The gene products encoded by the chimeric RNA can be any gene, including genes having clinical usefulness, for example, therapeutic or marker genes, and genes encoding toxins.

5.1. STRUCTURE OF THE PRE-*TRANS*-SPICING MOLECULES

The present invention provides compositions for use in generating novel chimeric nucleic acid molecules through targeted *trans*-splicing. The PTMs of the invention comprise (i) one or more target binding domains that targets binding of

the PTM to a pre-mRNA (ii) a 3' splice region that includes a branch point, pyrimidine tract and a 3' splice acceptor site and/or 5' splice donor site; and (iii) one or more spacer regions to separate the RNA splice site from the target binding domain. Additionally, the PTMs can be engineered to contain any nucleotide sequence encoding a translatable protein product. In yet another embodiment of the invention, the PTMs can be engineered to contain nucleotide sequences that inhibit the translation of the chimeric RNA molecule. For example, the nucleotide sequences may contain translational stop codons or nucleotide sequences that form secondary structures and thereby inhibit translation. Alternatively, the chimeric RNA may function as an antisense molecule thereby inhibiting translation of the RNA to which it binds.

The target binding domain of the PTM may contain multiple binding domains which are complementary to and in anti-sense orientation to the targeted region of the selected pre-mRNA. As used herein, a target binding domain is defined as any sequence that confers specificity of binding and anchors the pre-mRNA closely in space so that the spliceosome processing machinery of the nucleus can *trans*-splice a portion of the PTM to a portion of the pre-mRNA. The target binding domains may comprise up to several thousand nucleotides. In preferred embodiments of the invention the binding domains may comprise at least 10 to 30 and up to several hundred nucleotides. As demonstrated herein, the specificity of the PTM can be increased significantly by increasing the length of the target binding domain. For example, the target binding domain may comprise several hundred nucleotides or more. In addition, although the target binding domain may be "linear" it is understood that the RNA may fold to form secondary structures that may stabilize the complex thereby increasing the efficiency of splicing. A second target binding region may be placed at the 3' end of the molecule and can be incorporated into the PTM of the invention. Absolute complementarity, although preferred, is not required. A sequence "complementary" to a portion of an RNA, as referred to herein, means a sequence having sufficient complementarity to be able to hybridize with the RNA, forming a stable duplex. The ability to hybridize will depend on both the degree of complementarity and the length of the nucleic acid (See, for example, Sambrook et

al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York). Generally, the longer the hybridizing nucleic acid, the more base mismatches with an RNA it may contain and still form a stable duplex. One skilled in the art can ascertain a tolerable degree of mismatch or length of duplex by use of standard procedures to determine the stability of the hybridized complex.

Where the PTMs are designed for use in intron-exon tagging or for peptide affinity tagging, a library of PTMs is genetically engineered to contain random nucleotide sequences in the target binding domain. Alternatively, for intron-exon tagging the PTMs may be genetically engineered so as to lack target binding domains. The goal of generating such a library of PTM molecules is that the library will contain a population of PTM molecules capable of binding to each RNA molecule expressed in the cell. A recombinant expression vector can be genetically engineered to contain a coding region for a PTM including a restriction endonuclease site that can be used for insertion of random DNA fragments into the PTM to form random target binding domains. The random nucleotide sequences to be included in the PTM as target binding domains can be generated using a variety of different methods well known to those of skill in the art, including but not limited to, partial digestion of DNA with restriction enzymes or mechanical shearing of DNA to generate random fragments of DNA. Random binding domain regions may also be generated by degenerate oligonucleotide synthesis. The degenerate oligonucleotides can be engineered to have restriction endonuclease recognition sites on each end to facilitate cloning into a PTM molecule for production of a library of PTM molecules having degenerate binding domains.

Binding may also be achieved through other mechanisms, for example, through triple helix formation or protein/nucleic acid interactions such as those in which the PTM is engineered to recognize a specific RNA binding protein, *i.e.*, a protein bound to a specific target pre-mRNA. Alternatively, the PTMs of the invention may be designed to recognize secondary structures, such as for example, hairpin structures resulting from intramolecular base pairing between nucleotides within an RNA molecule.

The PTM molecule also contains a 3' splice region that includes a branch point, pyrimidine tract and a 3' splice acceptor AG site and/or a 5' splice donor site. Consensus sequences for the 5' splice donor site and the 3' splice region used in RNA splicing are well known in the art (See, Moore, *et al.*, 1993, The RNA World, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 303-358). In addition, modified consensus sequences that maintain the ability to function as 5' donor splice sites and 3' splice regions may be used in the practice of the invention. Briefly, the 5' splice site consensus sequence is AG/GURAGU (where A=adenosine, U=uracil, G=guanine, C=cytosine, R=purine and /=the splice site). The 3' splice site consists of three separate sequence elements: the branch point or branch site, a polypyrimidine tract and the 3' consensus sequence (YAG). The branch point consensus sequence in mammals is YNYURAC (Y=pyrimidine). The underlined A is the site of branch formation. A polypyrimidine tract is located between the branch point and the splice site acceptor and is important for different branch point utilization and 3' splice site recognition.

Further, PTMs comprising a 3' acceptor site (AG) may be genetically engineered. Such PTMs may further comprise a pyrimidine tract and/or branch point sequence.

Recently, pre-messenger RNA introns beginning with the dinucleotide AU and ending with the dinucleotide AC have been identified and referred to as U12 introns. U12 intron sequences as well as any sequences that function as splice acceptor/donor sequences may also be used in PTMs.

A spacer region to separate the RNA splice site from the target binding domain is also included in the PTM. The spacer region can have features such as stop codons which would block any translation of an unspliced PTM and/or sequences that enhance *trans*-splicing to the target pre-mRNA.

In a preferred embodiment of the invention, a "safety" is also incorporated into the spacer, binding domain, or elsewhere in the PTM to prevent non-specific *trans*-splicing. This is a region of the PTM that covers elements of the 3' and/or 5' splice site of the PTM by relatively weak complementarity, preventing non-specific *trans*-splicing. The PTM is designed in such a way that upon hybridization

of the binding /targeting portion(s) of the PTM, the 3' and/or 5' splice site is uncovered and becomes fully active.

The "safety" consists of one or more complementary stretches of *cis*-sequence (or could be a second, separate, strand of nucleic acid) which weakly binds to one or both sides of the PTM branch point, pyrimidine tract, 3' splice site and/or 5' splice site (splicing elements), or could bind to parts of the splicing elements themselves. This "safety" binding prevents the splicing elements from being active (i.e. block U2 snRNP or other splicing factors from attaching to the PTM splice site recognition elements). The binding of the "safety" may be disrupted by the binding of the target binding region of the PTM to the target pre-mRNA, thus exposing and activating the PTM splicing elements (making them available to *trans*-splice into the target pre-mRNA).

A nucleotide sequence encoding a translatable protein capable of producing an effect, such as cell death, or alternatively, one that restores a missing function or acts as a marker, is included in the PTM of the invention. For example, the nucleotide sequence can include those sequences encoding gene products missing or altered in known genetic diseases. Alternatively, the nucleotide sequences can encode marker proteins or peptides which may be used to identify or image cells. In yet another embodiment of the invention nucleotide sequences encoding affinity tags such as, HIS tags (6 consecutive histidine residues) (Janknecht, et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972-8976), the C-terminus of glutathione-S-transferase (GST) (Smith and Johnson, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8703--8707) (Pharmacia) or FLAG (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys) (Eastman Kodak/IBI, Rochester, NY) can be included in PTM molecules for use in affinity purification. The use of PTMs containing such nucleotide sequences results in the production of a chimeric RNA encoding a fusion protein containing peptide sequences normally expressed in a cell linked to the peptide affinity tag. The affinity tag provides a method for the rapid purification and identification of peptide sequences expressed in the cell. In a preferred embodiment the nucleotide sequences may encode toxins or other proteins which provide some function which enhances the susceptibility of the cells to subsequent treatments, such as radiation or chemotherapy.

In a highly preferred embodiment of the invention a PTM molecule is designed to contain nucleotide sequences encoding the Diphtheria toxin subunit A (Greenfield, L., et al., 1983, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 80: 6853-6857). Diphtheria toxin subunit A contains enzymatic toxin activity and will function if expressed or delivered into human cells resulting in cell death. Furthermore, various other known peptide toxins may be used in the present invention, including but not limited to, ricin, *Pseudomonas* toxin, *Shiga* toxin and exotoxin A.

Additional features can be added to the PTM molecule either after, or before, the nucleotide sequence encoding a translatable protein, such as polyadenylation signals or 5' splice sequences to enhance splicing, additional binding regions, "safety"-self complementary regions, additional splice sites, or protective groups to modulate the stability of the molecule and prevent degradation.

Additional features that may be incorporated into the PTMs of the invention include stop codons or other elements in the region between the binding domain and the splice site to prevent unspliced pre-mRNA expression. In another embodiment of the invention, PTMs can be generated with a second anti-sense binding domain downstream from the nucleotide sequences encoding a translatable protein to promote binding to the 3' target intron or exon and to block the fixed authentic *cis*-5' splice site (U5 and/or U1 binding sites).

PTMs may also be generated that require a double-*trans*-splicing reaction for generation of a chimeric *trans*-spliced product. Such PTMs could be used to replace an internal exon which could be used for RNA repair. PTMs designed to promote two *trans*-splicing reactions are engineered as described above, however, they contain both 5' donor sites and 3' splice acceptor sites. In addition, the PTMs may comprise two or more binding domains and splicer regions. The splicer regions may be placed between the multiple binding domains and splice sites or alternatively between the multiple binding domains.

Further elements such as a 3' hairpin structure, circularized RNA, nucleotide base modification, or a synthetic analog can be incorporated into PTMs to promote or facilitate nuclear localization and spliceosomal incorporation, and intracellular stability.

Additionally, when engineering PTMs for use in plant cells it may not be necessary to include conserved branch point sequences or polypyrimidine tracts as these sequences may not be essential for intron processing in plants. However, a 3' splice acceptor site and/or 5' splice donor site, such as those required for splicing in vertebrates and yeast, will be included. Further, the efficiency of splicing in plants may be increased by also including UA-rich intronic sequences. The skilled artisan will recognize that any sequences that are capable of mediating a *trans*-splicing reaction in plants may be used.

The PTMs of the invention can be used in methods designed to produce a novel chimeric RNA in a target cell. The methods of the present invention comprise delivering to the target cell a PTM which may be in any form used by one skilled in the art, for example, an RNA molecule, or a DNA vector which is transcribed into a RNA molecule, wherein said PTM binds to a pre-mRNA and mediates a *trans*-splicing reaction resulting in formation of a chimeric RNA comprising a portion of the PTM molecule spliced to a portion of the pre-mRNA.

5.2. SYNTHESIS OF THE *TRANS*-SPLICING MOLECULES

The nucleic acid molecules of the invention can be RNA or DNA or derivatives or modified versions thereof, single-stranded or double-stranded. By nucleic acid is meant a PTM molecule or a nucleic acid molecule encoding a PTM molecule, whether composed of deoxyribonucleotides or ribonucleosides, and whether composed of phosphodiester linkages or modified linkages. The term nucleic acid also specifically includes nucleic acids composed of bases other than the five biologically occurring bases (adenine, guanine, thymine, cytosine and uracil).

The RNA and DNA molecules of the invention can be prepared by any method known in the art for the synthesis of DNA and RNA molecules. For example, the nucleic acids may be chemically synthesized using commercially available reagents and synthesizers by methods that are well known in the art (see, e.g., Gait, 1985, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford, England). Alternatively, RNA molecules can be generated by *in vitro* and *in vivo* transcription of DNA sequences encoding the RNA molecule. Such DNA sequences can be

incorporated into a wide variety of vectors which incorporate suitable RNA polymerase promoters such as the T7 or SP6 polymerase promoters. RNAs may be produced in high yield via *in vitro* transcription using plasmids such as SPS65 (Promega Corporation, Madison, WI). In addition, RNA amplification methods such as Q- β amplification can be utilized to produce RNAs.

The nucleic acid molecules can be modified at the base moiety, sugar moiety, or phosphate backbone, for example, to improve stability of the molecule, hybridization, transport into the cell, etc. For example, modification of a PTM to reduce the overall charge can enhance the cellular uptake of the molecule. In addition, modifications can be made to reduce susceptibility to nuclease degradation. The nucleic acid molecules may include other appended groups such as peptides (e.g., for targeting host cell receptors *in vivo*), or agents facilitating transport across the cell membrane (see, e.g., Letsinger *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6553-6556; Lemaitre *et al.*, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648-652; PCT Publication No. W088/09810, published December 15, 1988) or the blood-brain barrier (see, e.g., PCT Publication No. W089/10134, published April 25, 1988), hybridization-triggered cleavage agents. (See, e.g., Krol *et al.*, 1988, BioTechniques 6:958-976) or intercalating agents. (See, e.g., Zon, 1988, Pharm. Res. 5:539-549). To this end, the nucleic acid molecules may be conjugated to another molecule, e.g., a peptide, hybridization triggered cross-linking agent, transport agent, hybridization-triggered cleavage agent, etc. Various other well-known modifications to the nucleic acid molecules can be introduced as a means of increasing intracellular stability and half-life. Possible modifications include, but are not limited to, the addition of flanking sequences of ribo- or deoxy- nucleotides to the 5' and/or 3' ends of the molecule. In some circumstances where increased stability is desired, nucleic acids having modified internucleoside linkages such as 2'-O-methylation may be preferred. Nucleic acids containing modified internucleoside linkages may be synthesized using reagents and methods that are well known in the art (see, Uhlmann *et al.*, 1990, Chem. Rev. 90:543-584; Schneider *et al.*, 1990, Tetrahedron Lett. 31:335 and references cited therein).

The nucleic acids may be purified by any suitable means, as are well known in the art. For example, the nucleic acids can be purified by reverse phase chromatography or gel electrophoresis. Of course, the skilled artisan will recognize that the method of purification will depend in part on the size of the nucleic acid to be
5 purified.

In instances where a nucleic acid molecule encoding a PTM is utilized, cloning techniques known in the art may be used for cloning of the nucleic acid molecule into an expression vector. Methods commonly known in the art of recombinant DNA technology which can be used are described in Ausubel *et al.*
10 (eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; and Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY.

The DNA encoding the PTM of interest may be recombinantly engineered into a variety of host vector systems that also provide for replication of the
15 DNA in large scale and contain the necessary elements for directing the transcription of the PTM. The use of such a construct to transfect target cells in the patient will result in the transcription of sufficient amounts of PTMs that will form complementary base pairs with the endogenously expressed pre-mRNA targets and thereby facilitate a *trans*-splicing reaction between the complexed nucleic acid
20 molecules. For example, a vector can be introduced *in vivo* such that it is taken up by a cell and directs the transcription of the PTM molecule. Such a vector can remain episomal or become chromosomally integrated, as long as it can be transcribed to produce the desired RNA. Such vectors can be constructed by recombinant DNA technology methods standard in the art.

Vectors encoding the PTM of interest can be plasmid, viral, or others known in the art, used for replication and expression in mammalian cells. Expression of the sequence encoding the PTM can be regulated by any promoter known in the art to act in mammalian, preferably human cells. Such promoters can be inducible or constitutive. Such promoters include but are not limited to: the SV40 early promoter
25 region (Benoist, C. and Chambon, P. 1981, Nature 290:304-310), the promoter
30 contained in the 3' long terminal repeat of Rous sarcoma virus (Yamamoto *et al.*,

1980, Cell 22:787-797), the herpes thymidine kinase promoter (Wagner *et al.*, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445), the regulatory sequences of the metallothionein gene (Brinster *et al.*, 1982, Nature 296:39-42), the viral CMV promoter, the human chorionic gonadotropin- β promoter (Hollenberg *et al.*, 1994, Mol. Cell. Endocrinology 106:111-119), etc. Any type of plasmid, cosmid, YAC or viral vector can be used to prepare the recombinant DNA construct which can be introduced directly into the tissue site. Alternatively, viral vectors can be used which selectively infect the desired target cell.

For use of PTMs encoding peptide affinity purification tags, it is desirable to insert nucleotide sequences containing random target binding sites into the PTMs and clone them into a selectable mammalian expression vector system. A number of selection systems can be used, including but not limited to selection for expression of the herpes simplex virus thymidine kinase, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase and adenine phosphoribosyl transferase protein in tk-, hgpri- or apri- deficient cells, respectively. Also, anti-metabolic resistance can be used as the basis of selection for dihydrofolate transferase (*dhfr*), which confers resistance to methotrexate; xanthine-guanine phosphoribosyl transferase (*gpt*), which confers resistance to mycophenolic acid; neomycin (*neo*), which confers resistance to aminoglycoside G-418; and hygromycin B phosphotransferase (*hygro*) which confers resistance to hygromycin. In a preferred embodiment of the invention, the cell culture is transformed at a low ratio of vector to cell such that there will be only a single vector, or a limited number of vectors, present in any one cell. Vectors for use in the practice of the invention include any eukaryotic expression vectors, including but not limited to viral expression vectors such as those derived from the class of retroviruses or adeno-associated viruses.

5.3. USES AND ADMINISTRATION OF TRANS-SPLICING MOLECULES

5.3.1. USE OF PTM MOLECULES FOR GENE REGULATION, GENE REPAIR AND TARGETED CELL DEATH

The compositions and methods of the present invention will have a variety of different applications including gene regulation, gene repair and targeted

cell death. For example, *trans*-splicing can be used to introduce a protein with toxic properties into a cell. In addition, PTMs can be engineered to bind to viral mRNA and destroy the function of the viral mRNA, or alternatively, to destroy any cell expressing the viral mRNA. In yet another embodiment of the invention, PTMs can
5 be engineered to place a stop codon in a deleterious mRNA transcript thereby decreasing the expression of that transcript.

In an embodiment of the invention PTM molecules were designed to bind to papilloma virus RNA and inhibit the function of the viral RNA. Specifically anti-HPV PTMs were designed to specifically target HPV pre-mRNAs and result in
10 the expression of a disruptive or toxic protein only in the HPV-infected cancer cells. Thus, the invention provides PTM molecules designed to inhibit the function of papilloma virus RNA. Such papilloma viruses, include but are not limited to mammalian papillomaviruses including human papillomaviruses.

The papilloma viruses are a group of small DNA viruses which induce
15 papillomas (warts) in a variety of vertebrates, including human. In addition, human papilloma virus is one of the most common causes of sexually transmitted diseases in the country and the vast majority of cervical cancers are associated with oncogenic human papillomaviruses and express viral mRNAs encoding the E6 and E7 oncoproteins. Thus, the PTM molecules of the invention may be used to inhibit the
20 proliferation of papillomaviruses within an infected host.

Targeted *trans*-splicing, including double-*trans*-splicing reactions, 3' exon replacement and/or 5' exon replacement can be used to repair or correct transcripts that are either truncated or contain point mutations. The PTMs of the invention are designed to cleave a targeted transcript upstream or downstream of a
25 specific mutation or upstream of a premature 3' and correct the mutant transcript via a *trans*-splicing reaction which replaces the portion of the transcript containing the mutation with a functional sequence.

In addition, double *trans*-splicing reactions may be used for the selective expression of a toxin in tumor cells. For example, PTMs can be designed to
30 replace the second exon of the human β -chronic gonadotropin-6 (β hCG6) gene transcripts and to deliver an exon encoding the subunit A of diphtheria toxin (DT-A).

Expression of DT-A in the absence of subunit B should lead to toxicity only in the cells expressing the gene. β hCG6 is a prototypical target for genetic modification by trans-splicing. The sequence and the structure of the β hCG6 gene are completely known and the pattern of splicing has been determined. The β hCG6 gene is highly
 5 expressed in many types of solid tumors, including many non-germ line tumors, but the β hCG6 gene is silent in the majority cells in a normal adult. Therefore, the β hCG6 pre-mRNA represents a desirable target for a trans-splicing reaction designed to produce tumor-specific toxicity.

The first exon of β hCG6 pre-mRNA is ideal in that it encodes only
 10 five amino acids, including the initiator AUG, which should result in minimal interference with the proper folding of the DT-A toxin while providing the required signals for effective translation of the trans-spliced mRNA. The DT-A exon, which is designed to include a stop codon to prevent chimeric protein formation, will be engineered to trans-splice into the last exon of the β hCG6 gene. The last exon of the
 15 β hCG6 gene provides the construct with the appropriate signals to polyadenylate the mRNA and ensure translation.

Cystic fibrosis (CF) is one of the most common fatal genetic disease in humans. Based on both genetic and molecular analyses, the gene associated with cystic fibrosis has been isolated and its protein product deduced (Kerem, B.S. et al.,
 20 1989, Science 245:1073-1080; Riordan et al., 1989, Science 245:1066-1073; Rommans, et al., 1989, Science 245:1059-1065). The protein product of the CF associated gene is called the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). In a specific embodiment of the invention, a *trans*-splicing reaction will be used to correct a genetic defect in the DNA sequence encoding the cystic fibrosis
 25 transmembrane regulator (CFTR) whereby the DNA sequence encoding the cystic fibrosis trans-membrane regulator protein is expressed and a functional chloride ion channel is produced in the airway epithelial cells of a patient.

Population studies have indicated that the most common cystic fibrosis mutation is a deletion of the three nucleotides in exon 10 that encode phenylalanine at
 30 position 508 of the CFTR amino acid sequence. As indicated in Figure 15, a *trans*-splicing reaction was capable of correcting the deletion at position 508 in the CFTR

amino acid sequence. The PTM used for correction of the genetic defect contained a CFTR BD intron 9 sequence, a spacer sequence, a branch point, a polypyrimidine tract, a 3' splice site and a wild type CFTR BD exon 10 sequence (Figure 13). The successful correction of the mutated DNA encoding CFTR utilizing a *trans*-splicing reaction supports the general application of PTMs for correction of genetic defects.

Hemophilia A is an X-linked bleeding disorder characterized by a deficiency in the activity of factor VIII, an important component of the coagulation cascade. The incidence of hemophilia A is approximately 1 in 5,000 to 10,000 males. Affected individuals suffer joint and muscle hemorrhage, easy bruising, and prolonged bleeding from wounds. Hemophilia A arises from a variety of mutations within the factor VIII gene. The gene comprises 26 exons and spans 186 kb. About 95 percent of those patients with hemophilia A in whom mutations have been characterized, have point mutations in the gene. In a specific embodiment of the invention, a *trans*-splicing reaction will be used to correct a genetic defect in the DNA sequence encoding factor VIII whereby the DNA sequence encoding the factor VIII protein is expressed and a functional clotting factor is produced in the plasma of a patient. The PTMs of the invention can be genetically engineered to repair any exon of interest, or combination of exons for the purpose of correcting a defect in the coding region of the factor VIII gene.

Genetic studies have indicated that the most common factor VIII mutation(s) are generated. As indicated in Figure 46, a *trans*-splicing reaction was capable of correcting the mutation in the factor VIII amino acid sequence. The mutation was created by an insertion of the neomycin gene into exon 16 and intron 16 of the mouse gene, interrupting the open reading frame of exon 16 and eliminating intron 16's 3' splice donor site. The PTM used for correction of the genetic defect contained factor VIII exons 16-24 coding sequences, a spacer sequence, a branch point, a polypyrimidine tract, and a 3' acceptor splice (Figure 44A). The successful correction of the mutated DNA encoding factor VIII utilizing a *trans*-splicing reaction further supports the general application of PTMs for correction of genetic defects.

The methods and compositions of the invention may also be used to regulate gene expression in plants. For example, *trans*-splicing may be used to place

the expression of any engineered gene under the natural regulation of a chosen target plant gene, thereby regulating the expression of the engineered gene. *Trans*-splicing may also be used to prevent the expression of engineered genes in non-host plants or to convert an endogenous gene product into a more desirable product.

5 In a specific embodiment of the invention *trans*-splicing may be used to regulate the expression of the insecticidal gene that produces Bt toxin (*Bacillus thuringiensis*). For example, the PTM may be designed to *trans*-splice into an injury response gene (pre-mRNA) that is expressed only after an insect bites the plant. Thus, all cells of the plant would carry the gene for Bt in the PTM, but the cells would
10 only produce Bt when and where an insect injures the plant. The rest of the plant will make little or no Bt. A PTM could *trans*-splice the Bt gene into any chosen gene with a desired pattern of expression. Further, it should be possible to target a PTM so that no Bt is produced in the edible portion of the plant.

One advantage associated with the use of PTMs is that the PTM
15 acquires the native gene control elements of the target gene, thus, reducing the time and effort that might otherwise be spent attempting to identify and reconstitute appropriate regulatory sequences upstream of an engineered gene. Thus, expression of the PTM regulated gene should occur only in those plant cells containing the target pre-mRNA. By targeting a gene not expressed in the edible portion of the plant or in
20 the pollen, *trans*-splicing can alleviate opposition to genetically modified plants, as consumers would not be eating the proteins made from modified genes. The edible portion of such crops should test negative for genetically modified proteins.

In addition, PTM can be targeted to a unique sequence of the host gene that is not present in other plants. Therefore, even if the gene (DNA) which encodes
25 the PTM jumps to another species of plant, the PTM gene will not have an appropriate target for *trans*-splicing. Thus, *trans*-splicing offers a "fail-safe" mode for prevention of gene "jumping" to other plant species: the PTM gene will be expressed only in the engineered host plant, which contains the appropriate target pre-mRNA. Expression in non-engineered plants would not be possible.

30 *Trans*-splicing also provides a more efficient way to convert one gene product into another. For example, *trans*-splicing ribozymes and chimeric oligos can

be incorporated into corn genomes to modify the ratio of saturated to unsaturated oils. *Trans*-splicing can also be used to convert one gene product into another.

Various delivery systems are known and can be used to transfer the compositions of the invention into cells, *e.g.* encapsulation in liposomes, microparticles, microcapsules, recombinant cells capable of expressing the composition, receptor-mediated endocytosis (see, *e.g.*, Wu and Wu, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432), construction of a nucleic acid as part of a retroviral or other vector, injection of DNA, electroporation, calcium phosphate mediated transfection, etc.

The compositions and methods can be used to treat cancer and other serious viral infections, autoimmune disorders, and other pathological conditions in which the alteration or elimination of a specific cell type would be beneficial. Additionally, the compositions and methods may also be used to provide a gene encoding a functional biologically active molecule to cells of an individual with an inherited genetic disorder where expression of the missing or mutant gene product produces a normal phenotype.

In a preferred embodiment, nucleic acids comprising a sequence encoding a PTM are administered to promote PTM function, by way of gene delivery and expression into a host cell. In this embodiment of the invention, the nucleic acid mediates an effect by promoting PTM production. Any of the methods for gene delivery into a host cell available in the art can be used according to the present invention. For general reviews of the methods of gene delivery see Strauss, M. and Barranger, J.A., 1997, *Concepts in Gene Therapy*, by Walter de Gruyter & Co., Berlin; Goldspiel *et al.*, 1993, *Clinical Pharmacy* 12:488-505; Wu and Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 33:573-596; Mulligan, 1993, *Science* 260:926-932; and Morgan and Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217; 1993, *TIBTECH* 11(5):155-215. Exemplary methods are described below.

Delivery of the nucleic acid into a host cell may be either direct, in which case the host is directly exposed to the nucleic acid or nucleic acid-carrying vector, or indirect, in which case, host cells are first transformed with the nucleic acid

in vitro, then transplanted into the host. These two approaches are known, respectively, as *in vivo* or *ex vivo* gene delivery.

In a specific embodiment, the nucleic acid is directly administered *in vivo*, where it is expressed to produce the PTM. This can be accomplished by any of numerous methods known in the art, *e.g.*, by constructing it as part of an appropriate nucleic acid expression vector and administering it so that it becomes intracellular, *e.g.* by infection using a defective or attenuated retroviral or other viral vector (see U.S. Patent No. 4,980,286), or by direct injection of naked DNA, or by use of microparticle bombardment (*e.g.*, a gene gun; Biolistic, Dupont), or coating with lipids or cell-surface receptors or transfecting agents, encapsulation in liposomes, microparticles, or microcapsules, or by administering it in linkage to a peptide which is known to enter the nucleus, by administering it in linkage to a ligand subject to receptor-mediated endocytosis (see *e.g.*, Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432).

In a specific embodiment, a viral vector that contains the PTM can be used. For example, a retroviral vector can be utilized that has been modified to delete retroviral sequences that are not necessary for packaging of the viral genome and integration into host cell DNA (see Miller *et al.*, 1993, Meth. Enzymol. 217:581-599). Alternatively, adenoviral or adeno-associated viral vectors can be used for gene delivery to cells or tissues. (See, Kozarsky and Wilson, 1993, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503 for a review of adenovirus-based gene delivery).

Another approach to gene delivery into a cell involves transferring a gene to cells in tissue culture by such methods as electroporation, lipofection, calcium phosphate mediated transfection, or viral infection. Usually, the method of transfer includes the transfer of a selectable marker to the cells. The cells are then placed under selection to isolate those cells that have taken up and are expressing the transferred gene. The resulting recombinant cells can be delivered to a host by various methods known in the art. In a preferred embodiment, the cell used for gene delivery is autologous to the host cell.

The present invention also provides for pharmaceutical compositions comprising an effective amount of a PTM or a nucleic acid encoding a PTM, and a pharmaceutically acceptable carrier. In a specific embodiment, the term "pharmaceutically acceptable" means approved by a regulatory agency of the Federal or a state government or listed in the U.S. Pharmacopeia or other generally recognized pharmacopeia for use in animals, and more particularly in humans. The term "carrier" refers to a diluent, adjuvant, excipient, or vehicle with which the therapeutic is administered. Examples of suitable pharmaceutical carriers are described in "Remington's Pharmaceutical sciences" by E.W. Martin.

In specific embodiments, pharmaceutical compositions are administered: (1) in diseases or disorders involving an absence or decreased (relative to normal or desired) level of an endogenous protein or function, for example, in hosts where the protein is lacking, genetically defective, biologically inactive or underactive, or under expressed; or (2) in diseases or disorders wherein, *in vitro* or *in vivo*, assays indicate the utility of PTMs that inhibit the function of a particular protein. The activity of the protein encoded for by the chimeric mRNA resulting from the PTM mediated *trans*-splicing reaction can be readily detected, e.g., by obtaining a host tissue sample (e.g., from biopsy tissue) and assaying it *in vitro* for mRNA or protein levels, structure and/or activity of the expressed chimeric mRNA. Many methods standard in the art can be thus employed, including but not limited to immunoassays to detect and/or visualize the protein encoded for by the chimeric mRNA (e.g., Western blot, immunoprecipitation followed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, immunocytochemistry, etc.) and/or hybridization assays to detect formation of chimeric mRNA expression by detecting and/or visualizing the presence of chimeric mRNA (e.g., Northern assays, dot blots, *in situ* hybridization, and Reverse-Transcription PCR, etc.), etc.

The present invention also provides for pharmaceutical compositions comprising an effective amount of a PTM or a nucleic acid encoding a PTM, and a pharmaceutically acceptable carrier. In a specific embodiment, the term "pharmaceutically acceptable" means approved by a regulatory agency of the Federal or a state government or listed in the U.S. Pharmacopeia or other generally recognized

pharmacopeia for use in animals, and more particularly in humans. The term "carrier" refers to a diluent, adjuvant, excipient, or vehicle with which the therapeutic is administered. Examples of suitable pharmaceutical carriers are described in "Remington's Pharmaceutical sciences" by E.W. Martin. In a specific embodiment, it may be desirable to administer the pharmaceutical compositions of the invention locally to the area in need of treatment. This may be achieved by, for example, and not by way of limitation, local infusion during surgery, topical application, *e.g.*, in conjunction with a wound dressing after surgery, by injection, by means of a catheter, by means of a suppository, or by means of an implant, said implant being of a porous, non-porous, or gelatinous material, including membranes, such as sialastic membranes, or fibers. Other control release drug delivery systems, such as nanoparticles, matrices such as controlled-release polymers, hydrogels.

The PTM will be administered in amounts which are effective to produce the desired effect in the targeted cell. Effective dosages of the PTMs can be determined through procedures well known to those in the art which address such parameters as biological half-life, bioavailability and toxicity. The amount of the composition of the invention which will be effective will depend on the nature of the disease or disorder being treated, and can be determined by standard clinical techniques. In addition, *in vitro* assays may optionally be employed to help identify optimal dosage ranges.

The present invention also provides a pharmaceutical pack or kit comprising one or more containers filled with one or more of the ingredients of the pharmaceutical compositions of the invention optionally associated with such container(s) can be a notice in the form prescribed by a governmental agency regulating the manufacture, use or sale of pharmaceuticals or biological products, which notice reflects approval by the agency of manufacture, use or sale for human administration.

5.3.2. USE OF PTM MOLECULES FOR EXON TAGGING

In view of current efforts to sequence and characterize the genomes of humans and other organisms, there is a need for methods that facilitate such

characterization. A majority of the information currently obtained by genomic mapping and sequencing is derived from complementary DNA (cDNA) libraries, which are made by reverse transcription of mRNA into cDNA. Unfortunately, this process causes the loss of information concerning intron sequences and the location of exon/intron boundaries.

The present invention encompasses a method for mapping exon-intron boundaries in pre-mRNA molecules comprising (i) contacting a pre-trans-splicing molecule with a pre-mRNA molecule under conditions in which a portion of the pre-trans-splicing molecule is trans-spliced to a portion of the target pre-mRNA to form a chimeric mRNA; (ii) amplifying the chimeric mRNA molecule; (iii) selectively purifying the amplified molecule; and (iv) determining the nucleotide sequence of the amplified molecule thereby identifying the intron-exon boundaries.

In an embodiment of the present invention, PTMs can be used in trans-splicing reactions to locate exon-intron boundaries in pre-mRNAs molecules. PTMs for use in mapping of intron-exon boundaries have structures similar to those described above in Section 5.1. Specifically, the PTMs contain (i) a target binding domain that is designed to bind to many pre-mRNAs; (ii) a 3' splice region that includes a branch point, pyrimidine tract and a 3' splice acceptor site, or a 5' splice donor site; (iii) a spacer region that separates the mRNA splice site from the target binding domain; and (iv) a tag region that will be trans-spliced onto a pre-mRNA. Alternatively, the PTMs to be used to locate exon-intron boundaries may be engineered to contain no target binding domain.

For purposes of intron-exon mapping, the PTMs are genetically engineered to contain target binding domains comprising random nucleotide sequences. The random nucleotide sequences contain at least 15-30 and up to several hundred nucleotide sequences capable of binding and anchoring a pre-mRNA so that the spliceosome processing machinery of the nucleus can trans-splice a portion (tag or marker region) of the PTM to a portion of the pre-mRNA. PTMs containing short target binding domains, or containing inosines bind under less stringent conditions to the pre-mRNA molecules. In addition, strong branch point sequences and pyrimidine tracts serve to increase the non-specificity of PTM trans-splicing.

The random nucleotide sequences used as target binding domains in the PTM molecules can be generated using a variety of different methods, including, but not limited to, partial digestion of DNA with restriction endonucleases or mechanical shearing of the DNA. The use of such random nucleotide sequences is designed to generate a vast array of PTM molecules with different binding activities for each target pre-mRNA expressed in a cell. Randomized libraries of oligonucleotides can be synthesized with appropriate restriction endonucleases recognition sites on each end for cloning into PTM molecules genetically engineered into plasmid vectors. When the randomized oligonucleotides are ligated and expressed, a randomized binding library of PTMs is generated.

In a specific embodiment of the invention, an expression library encoding PTM molecules containing target binding domains comprising random nucleotide sequences can be generated using a variety of methods which are well known to those of skill in the art. Ideally, the library is complex enough to contain PTM molecules capable of interacting with each target pre-mRNA expressed in a cell.

By way of example, Figure 9 is a schematic representation of two forms of PTMs which can be utilized to map intron-exon boundaries. The PTM on the left is capable of non-specifically trans-splicing into a pre-mRNA 3' splice site, while the PTM on the right is capable of trans-splicing into a pre-mRNA 5' splice site. Trans-splicing between the PTM and the target pre-mRNA results in the production of a chimeric mRNA molecule having a specific nucleotide sequence "tag" on either the 3' or 5' end of an authentic exon.

Following selective purification, a DNA sequencing reaction is then performed using a primer which begins in the tag nucleotide sequence of the PTM and proceeds into the sequence of the tagged exon. The sequence immediately following the last nucleotide of the tag nucleotide sequence represents an exon boundary. For identification of intron-exon tags, the trans-splicing reactions of the invention can be performed either *in vitro* or *in vivo* using methods well known to those of skill in the art.

5.3.3. USE OF PTM MOLECULES FOR IDENTIFICATION OF PROTEINS EXPRESSED IN A CELL

In yet another embodiment of the invention, PTM mediated trans-splicing reactions can be used to identify previously undetected and unknown proteins expressed in a cell. This method is especially useful for identification of proteins that cannot be detected by a two-dimensional electrophoresis, or by other methods, due to *inter alia* the small size of the protein, low concentration of the protein, or failure to detect the protein due to similar migration patterns with other proteins in two-dimensional electrophoresis.

The present invention relates to a method for identifying proteins expressed in a cell comprising (i) contacting a pre-trans-splicing molecule containing a random target binding domain and a nucleotide sequence encoding a peptide tag with a pre-mRNA molecule under conditions in which a portion of the pre-trans-splicing molecule is trans-spliced to a portion of the target pre-mRNA to form a chimeric mRNA encoding a fusion polypeptide or separating it by gel electrophoresis (ii) affinity purifying the fusion polypeptide; and (iii) determining the amino acid sequence of the fusion protein.

To identify proteins expressed in a cell, the PTMs of the invention are genetically engineered to contain: (i) a target binding domain comprising randomized nucleotide sequences; (ii) a 3' splice region that includes a branch point, pyrimidine tract and a 3' splice acceptor site and/or a 5' splice donor site; (iii) a spacer region that separates the PTM splice site from the target binding domain; and (iv) nucleotide sequences encoding a marker or peptide affinity purification tag. Such peptide tags include, but are not limited to, HIS tags (6 histidine consecutive residues) (Janknecht, et al., 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972-8976), glutathione-S-transferase (GST) (Smith, D.B. and Johnson K.S., 1988, Gene 67:31) (Pharmacia) or FLAG (Kodak/IBI) tags (Nissson, J. et al. J. Mol. Recognit., 1996, 5:585-594).

Trans-splicing reactions using such PTMs results in the generation of chimeric mRNA molecules encoding fusion proteins comprising protein sequences normally expressed in a cell linked to a marker or peptide affinity purification tag. The desired goal of such a method is that every protein synthesized in a cell receives a

marker or peptide affinity tag thereby providing a method for identifying each protein expressed in a cell.

In a specific embodiment of the invention, PTM expression libraries encoding PTMs having different target binding domains comprising random
5 nucleotide sequences are generated. The desired goal is to create a PTM expression library that is complex enough to produce a PTM capable of binding to each pre-mRNA expressed in a cell. In a preferred embodiment, the library is cloned into a mammalian expression vector that results in one, or at most, a few vectors being present in any one cell.

10 To identify the expression of chimeric proteins, host cells are transformed with the PTM library and plated so that individual colonies containing one PTM vector can be grown and purified. Single colonies are selected, isolated, and propagated in the appropriate media and the labeled chimeric protein exon(s) fragments are separated away from other cellular proteins using, for example, an
15 affinity purification tag. For example, affinity chromatography can involve the use of antibodies that specifically bind to a peptide tag such as the FLAG tag. Alternatively, when utilizing HIS tags, the fusion proteins are purified using a Ni^{2+} nitriloacetic acid agarose columns, which allows selective elution of bound peptide eluted with imidazole containing buffers. When using GST tags, the fusion proteins are purified
20 using glutathione-S-transferase agarose beads. The fusion proteins can then be eluted in the presence of free glutathione.

Following purification of the chimeric protein, an analysis is carried out to determine the amino acid sequence of the fusion protein. The amino acid sequence of the fusion protein is determined using techniques well known to those of
25 skill in the art, such as Edman Degradation followed by amino acid analysis using HPLC, mass spectrometry or an amino acid analyzation. Once identified, the peptide sequence is compared to those sequences available in protein databases, such as GenBank. If the partial peptide sequence is already known, no further analysis is done. If the partial protein sequence is unknown, then a more complete sequence of
30 that protein can be carried out to determine the full protein sequence. Since the fusion protein will contain only a portion of the full length protein, a nucleic acid

encoding the full length protein can be isolated using conventional methods. For example, based on the partial protein sequence oligonucleotide primers can be generated for use as probes or PCR primers to screen a cDNA library.

6. EXAMPLE: PRODUCTION OF *TRANS*-SPLICING MOLECULES

- 5 The following section describes the production of PTMs and the demonstration that such molecules are capable of mediating *trans*-splicing reactions resulting in the production of chimeric mRNA molecules.

6.1. MATERIALS AND METHODS

6.1.1. CONSTRUCTION OF PRE-mRNA MOLECULES

- 10 Plasmids containing the wild type diphtheria toxin subunit A (DT-A, wild-type accession #K01722) and a DT-A mutant (CRM 197, no enzymatic activity) were obtained from Dr. Virginia Johnson, Food and Drug Administration, Bethesda, Maryland (Uchida *et al.*, 1973 J. Biol. Chem 248:3838). For *in vitro* experiments, DT-A was amplified using primers: DT-1F (5'-
- 15 GGCGCTGCAGGGCGCTGATGATGTTGTTG); and DT-2R (5'-GGCGAAGCTTGGATCCGACACGATTTCCTGCACAGG), cut with PstI and HindIII, and cloned into PstI and HindIII digested pBS(-) vector (Stratagene, La Jolla, CA). The resulting clone, pDTA was used to construct the individual PTMs. (1) pPTM+: Targeted construct. Created by inserting IN3-1 (5'AATTCTCTAGATGCTT
- 20 CACCCGGGCCTGACTCGAGTACTAAGTGGTACCTCTTCTTTTTCCTGCA) and IN2-4 (5'-GGAAAAAAGAAAGAGGTACCAGTAGTACTCGAGTCAGGCCCGGTGAAGCATCTAGAG) primers into EcoRI and PstI digested pDTA.
- (2) pPTM+Sp: As pPTM+ but with a 30 bp spacer sequence between the BD and BP. Created by digesting pPTM+ with XhoI and ligating in the oligonucleotides, spacer S
- 25 (5'-TCGAGCAACGTTATAATAATGTTC) and spacer AS (5'-TCGAGAACATTATTATAACGTGTC). For *in vivo* studies, an EcoRI and HindIII fragment of pcPTM+Sp was cloned into mammalian expression vector pcDNA3.1 (Invitrogen), under the control of a CMV promoter. Also, the methionine at codon 14 was changed into isoleucine to prevent initiation of translation. The resulting

- plasmid was designated as pcPTM+Sp. (3) pPTM+CRM: As pPTM+Sp but the wild type DT-A was substituted with CRM mutant DT-A (T. Uchida, et al., 1973, J. Biol. Chem. 248:3838). This was created by PCR amplification of a DT-A mutant (mutation at G52E) using primers DT-1F and DT-2R. For *in vivo* studies, an EcoRI
- 5 HindIII fragment of PTM+CRM was cloned into pc3.1DNA that resulted in pcPTM+ARM. (4) PTM-: Non-targeted construct. Created by digestion of PTM+ with EcoRI and Pst I, gel purified to remove the binding domain followed by ligation of the oligonucleotides, IN-5 (5'-ATCTCTAGATCAGGCCCGGGTGAAGCC CGAG) and IN-6 (5'-TGCTTCACCC GGGCCTGATCTAGAG). (5) PTM-Sp, is an
- 10 identical version of the PTM-, except it has a 30 bp spacer sequence at the PstI site. Similarly, the splice mutants [Py(-)AG(-) and BP(-)Py(-)AG(-)] and safety variants [PTM+SF-Py1, PTM+SF-Py2, PTM+SFBP3 and PTM+SFBP3-Py1] were constructed either by insertion or deletion of specific sequences (see 1).

Table 1. Binding/non-binding domain, BP, PPT and 3' as sequences of different PTMs.

PTM construct	BD/NBD	BP	PPT	3'ss
PTM+Sp (targeted)	:TGCTTCACCCGGGCGCTGA	TACTAΔC	CCTCTCTTTTTC	CAG
PTM-Sp (non-targeted)	:CAACGTTATAATAATGTT	TACTAΔC	CCTCTCTTTTTC	CAG
PTM+Py (-)AG(-)BP(-)	:TGCTTCACCCGGGCGCTGA	GGCTGΔT	CTGTGATTAATAGCGG	ACG
PTM+Py(-)AG(-)	:TGCTTCACCCGGGCGCTGA	TACTAΔC	CCTGGACGCGAAGTT	ACG
PTM+SF	:CTGGGACAAGGACACTGCTT CACC CGTTAGTAGACACACA GCCCTGAAGCC	TACTAΔC	CTCTGTCTTTTTC	CAG
PTM+SF-Py	:As in PTM+SF	TACTAΔC	CTCTGTATTATTCTC	CAG
PTM+SF-Py	:As in PTM+SF	TACTAΔC	GTCTGTCTCTGTCTC	CAG
PTM+SF-BP3	:As in PTM+SF	TGCTGΔC	CTCTGTCTTTTTC	CAG
PTM+SFBP3-Py	:As in PTM+SF	TGCTGΔC	CTCTGTATTATTCTC	CAG

15 Nucleotides in bold indicate the mutations compared to normal BP, PPT and 3' splice site.

- 20 Branch site A is underlined. The nucleotides in italics indicates the mismatch introduced into safety BD to mask the BP sequence in the PTM.

A double-trans-splicing PTM construct (DS-PTM) was also made adding a 5' splice site and a second target binding domain complementary to the second intron of β HCG pre-mRNA to the 3' end of the toxin coding sequence of PTM+SF (Figure A).

5 6.1.2. β HCG6 TARGET PRE-mRNA

To produce the *in vitro* target pre-mRNA, a SacI fragment of β HCG gene 6 (accession #X00266) was cloned into pBS(-). This produced an 805 bp insert from nucleotide 460 to 1265, which includes the 5' untranslated region, initiation codon, exon 1, intron 1, exon 2, and most of intron 2. For *in vivo* studies, an EcoRI and BamHI fragment was cloned into mammalian expression vector (pc3.1DNA), producing β HCG6.

6.1.3. mRNA PREPARATION

For *in vitro* splicing experiments, β HCG6, β -globin pre-mRNA and different PTM mRNAs were synthesized by *in vitro* transcription of BamHI and HindIII digested plasmid DNAs respectively, using T7 mRNA polymerase (Pasman & Garcia-Blanco, 1996, Nucleic Acids Res. 24:1638). Synthesized mRNAs were purified by electrophoresis on a denaturing polyacrylamide gel, and the products were excised and eluted.

6.1.4. IN VITRO SPLICING

20 PTMs and target pre-mRNA were annealed by heating at 98°C followed by slow cooling to 30-34°C. Each reaction contained 4 μ l of annealed mRNA complex (100 ng of target and 200 ng of PTM), 1X splice buffer (2 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 5 mM creatinine phosphate, and 40 mM KCl) and 4 μ l of HeLa splice nuclear extract (Promega) in a 12.5 μ l final volume. Reactions were incubated at 30°C for the indicated times and stopped by the addition of an equal volume of high salt buffer (7 M urea, 5% SDS, 100 mM LiCl, 10 mM EDTA and 10 mM TrisHCl, pH 7.5). Nucleic acids were purified by extraction with phenol:chloroform:isoamyl alcohol (50:49:1) followed by ethanol precipitation.

6.1.5. REVERSE TRANSCRIPTION-PCR REACTIONS

RT-PCR analysis was performed using EZ-RT PCR kit (Perkin-Elmer, Foster City, CA). Each reaction contained 10 ng of *cis*- or *trans*-spliced mRNA, or 1-2 µg of total mRNA, 0.1 µl of each 3' and 5' specific primer, 0.3 mM of each dNTP, 5 1X EZ buffer (50 mM bicine, 115 mM potassium acetate, 4% glycerol, pH 8.2), 2.5 mM magnesium acetate and 5 U of *rTth* DNA polymerase in a 50 µl reaction volume. Reverse transcription was performed at 60°C for 45 min followed by PCR amplification of the resulting cDNA as follows: one cycle of initial denaturation at 94°C for 30 sec, and 25 cycles of denaturation at 94°C for 18 sec and annealing and 10 extension at 60°C for 40 sec, followed by a 7 min final extension at 70°C. Reaction products were separated by electrophoresis in agarose gels.

Primers used in the study were as follows:

DT-1F: GCGCTGCAGGGCGCTGATGATGTTGTTG
 DT-2R: GGC GAAGCTTGGATCCGACACGATTTCTCTGCACAGG
 15 DT-3R: CATCGTCATAATTCCTTGTTG
 DT-4R: ATGGAATCTACATAACCAGG
 DT-5R: GAAGGCTGAGCACTACACGC
 HCG-R2: CGGCACCGTGGCCGAAGTGG,
 Bio-HCG-F: ACCGGAATTCATGAAGCCAGGTACACCAGG
 20 β-globulin-F: GGGCAAGGTGAACGTGGATG
 β-globulin-R: ATCAGGAGTGGACAGATCC

6.1.6. CELL GROWTH, TRANSFECTION AND mRNA ISOLATION

Human lung cancer cell line H1299 (ATCC accession # CRL-5803) 25 was grown in RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum at 37°C in a 5% CO₂ environment. Cells were transfected with pcSp+CRM (CRM is a non-functional toxin), a vector expressing a PTM, or vector alone (pcDNA3.1) using lipofectamine reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD). The assay was scored for neomycin resistance (neo^r) colony formation two weeks after transfection. Four 30 neo^r colonies were selected and expanded under continued neo selection. Total

cellular mRNA was isolated using RNA exol (BioChain Institute, Inc., San Leandro, CA) and used for RT-PCR.

6.1.7. TRANS-SPLICING IN TUMORS IN NUDE MICE

Eleven nude mice were bilaterally injected (except B10, B11 and B12 had 1 tumor) into the dorsal flank subcutaneous space with 1×10^7 H1299 human lung tumor cells (day 1). On day 14, the mice were given an appropriate dose of anesthesia and injected with, or without electroporation (T820, BTX Inc., San Diego, CA) in several orientations with a total volume of 100 μ l of saline containing 100 μ g pcSp+CRM with or without pc β HCG6 or pcPTM+Sp. Solutions injected into the right side tumors also contained India ink to mark needle tracks. The animals were sacrificed 48 hours later and the tumor excised and immediately frozen at -80°C. For analysis, 10 mg of each tumor was homogenized and mRNA was isolated using a Dynabeads mRNA direct kit (Dyna) following the manufacturers directions. Purified mRNA (2 μ l of 10 μ l total volume) was subjected to RT-PCR using β HCG-F and DT-5R primers as described earlier. All samples were re-amplified using DT-3R, a nested DT-A primer and biotinylated β HCG-F and the products were analyzed by electrophoresis on a 2% agarose gel. Samples that produced a band were processed into single stranded DNA using M280 Streptavidin Dynabeads and sequenced using a toxin specific primer (DT-3R).

6.2. RESULTS

6.2.1. SYNTHESIS OF PTM

A prototypical *trans*-splicing mRNA molecule, pcPTM+Sp (Figure 1A) was constructed that included: an 18 nt target binding domain (complementary to β HCG6 intron 1), a 30 nucleotide spacer region, branch point (BP) sequence, a polypyrimidine tract (PPT) and an AG dinucleotide at the 3' splice site immediately upstream of an exon encoding diphtheria toxin subunit A (DT-A) (Uchida *et al.*, 1973, J. Biol. Chem. 248:3838). Later DT-A exons were modified to eliminate translation initiation sites at codon 14. The PTM constructs were designed for maximal activity

WO 02/053581

45

PCT/US02/00416

in order to demonstrate *trans*-splicing; therefore, they included potent 3' splice elements (yeast BP and a mammalian PPT) (Moore *et al.*, 1993, In The mRNA World, R.F. Gesteland and J.F. Atkins, eds. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press). β HCG6 pre-mRNA (Talmadge *et al.*, 1984,

- 5 Nucleic Acids Res. 12:8415) was chosen as a model target as this gene is expressed in most tumor cells. It is not expressed in normal adult cells, with the exception of some in the pituitary gland and gonads. (Acevedo *et al.*, 1992, Cancer 76:1467; Hoon *et al.*, 1996, Int J. Cancer 69:369; Bellet *et al.*, 1997, Cancer Res. 57:516). As shown in Figure 1C, pcPTM+Sp forms conventional Watson-Crick base pairs by its binding
10 domain with the 3' end of β HCG6 intron 1, masking the intronic 3' splice signals of the target. This feature is designed to facilitate *trans*-splicing between the target and the PTM.

- HeLa nuclear extracts were used in conjunction with established splicing procedures (Pasman & Garcia-Blanco, 1996, Nucleic Acids Res. 24:1638) to
15 test if a PTM construct could invade the β HCG6 pre-mRNA target. The products of *in vitro trans*-splicing were detected by RT-PCR, using primers specific for chimeric mRNA molecules. The predicted product of a successful *trans*-splicing reaction is a chimeric mRNA comprising the first exon of β HCG6, followed immediately by the exon contributed from pcPTM+Sp encoding DT-A (Figure 1C). Such chimeric
20 mRNAs were readily detected by RT-PCR using primers β HCG-F (specific to β HCG6 exon 1) and DT-3R (specific to DT-A, Figure 2A, lanes 1-2). At time zero or in the absence of ATP, no 466 bp product was observed, indicating that this reaction was both ATP and time dependent.

- The target binding domain of pcPTM+Sp contained 18 nucleotides
25 complementary to β HCG6 intron 1 pre-mRNA and demonstrated efficient *trans*-splicing (Figure 2A, lanes 1-2). *Trans*-splicing efficiency decreased at least 8 fold (Figure 2, lanes 3-4) using non-targeted PTM-Sp, which contains a non-complementary 18 nucleotide "non-binding domain". *Trans*-splicing efficiencies of PTM mRNAs with or without a spacer between the binding domain and BP were also
30 compared. This experiment demonstrated a significant increase in the efficiency of *trans*-splicing by the addition of a spacer (Figure 2B, lanes 2 + 5). To facilitate the

recruitment of splicing factors required for efficient *trans*-splicing, some space may be needed between the 3' splice site and the double-stranded secondary structure produced by the binding domain/target interaction.

- To investigate the effect of PTM length on *trans*-splicing specificity, shorter PTMs were synthesized from *AccI* cut PTM plasmid (see Figure 1). This eliminated 479 nt from the 3' end of the DT-A coding sequence. Figure 2B shows the *trans*-splicing ability of a targeted short PTM(+) (lanes 10-12), compared to a non-targeted short PTM(-) (lanes 14-17). Short PTM+ produced substantially more *trans*-spliced product (Figure 2B, lane 12) than its counterpart, non-targeted short PTM (Figure 2B, lane 17). These experiments indicate that longer PTMs may have increased potential to mediate *trans*-splicing non-specifically.

6.2.2. ACCURACY OF PTM SPLICEOSOME MEDIATED *TRANS*-SPLICING

- To confirm that *trans*-splicing between the pcPTM+Sp and β HCG6 target is precise, RT-PCR amplified product was produced using 5' biotinylated β HCG-F and nonbiotinylated DT-3R primers. This product was converted into single stranded DNA and sequenced directly with primer DT-3R (DT-A specific reverse primer) using the method of Mitchell and Merrill (1989, *Anal. Biochem.* 178:239). *Trans*-splicing occurred exactly between the predicted splice sites (Figure 3), confirming that a conventional pre-mRNA can be invaded by an engineered PTM construct during splicing; moreover, this reaction is precise.

- In addition selective *trans*-splicing of a double splicing PTM (DS-PTM) was observed (Figure 8B). The DS-PTM can produce *trans*-splicing by contributing either a 3' or 5' splice site. Further, DS-PTMs can be constructed which will be capable of simultaneously double-*trans*-splicing, at both a 3' and 5' site, thereby permitting exon replacement. Figure 8B demonstrates that in this construct the 5' splice site is most active at a 1:1 concentration of target β HCG pre-mRNA:DS-PTM. At a 1:6 ratio the 3' splice site is more active.

6.2.3. 3' SPLICE SITES ARE ESSENTIAL FOR PTM TRANS-SPLICING

In general, the 3' splice site contains three elements: 1) a BP sequence located 5' of the acceptor site, 2) a PPT consisting of a short run of pyrimidine residues, and 3) a YAG trinucleotide splice site acceptor at the intron-exon border (Senapathy *et al.*, 1990, Cell 91:875; Moore *et al.*, 1993). Deletion or alteration of one of these sequence elements are known to either decrease or abolish splicing (Aebi *et al.*, 1986; Reed & Maniatis 1988, Genes Dev. 2:1268; Reed, 1989, Genes Dev. 3:2113; Roscigno *et al.*, 1993, J. Biol. Chem. 268:11222; Coolidge *et al.*, 1997, Nucleic Acids Res. 25:888). The role of these conserved elements in targeted *trans*-splicing was addressed experimentally. In one case [(BP(-)Py(-)AG(-))], all three *cis*-elements (BP, PPT and AG dinucleotide) were replaced by random sequences. A second splicing mutant [(Py(-)AG(-))] was constructed in which the PPT and the 3' splice site acceptor were mutated and substituted by random sequences. Neither construct was able to support *trans*-splicing *in vitro* (Figure 2A, lanes 5-8), suggesting that, as in the case of conventional *cis*-splicing, the PTM *trans*-splicing process also requires a functional BP, PPT and AG acceptor at the 3' splice site.

6.2.4. DEVELOPMENT OF A "SAFETY" SPLICE SITE TO INCREASE SPECIFICITY

To improve the levels of target specificity achieved by the inclusion of a binding domain or by shortening the PTM, the target-binding domain of several PTM constructs was modified to create an intra-molecular stem to mask the 3' splice site (termed a "safety PTM"). The safety stem is formed by portions of the binding domain that partially base pair with regions of the PTM 3' splice site or sequences adjacent to them, thereby blocking the access of spliceosomal components to the PTM 3' splice site prior to target acquisition (Figure 4A, PTM+SF). Base pairing between free portions of the PTM binding domain and β HCG6 target region unwinds the safety stem, allowing splicing factors such as U2AF to bind to the PTM 3' splice site and initiate *trans*-splicing (Figure 4B).

This concept was tested in splicing reactions containing either PTM+SF (safety) or pcPTM+Sp (linear), and both target (β HCG6) and non-target (β -

globin) pre-mRNA. The spliced products were subsequently analyzed by RT-PCR and gel electrophoresis. Using β HCG-F and DT-3R primers, the specific 196 bp *trans*-spliced band was demonstrated in reactions containing β HCG target and either linear PTM (pcPTM+Sp, Figure 5, lane 2) or safety PTM (PTM+SF, Figure 5, lane 8).

- 5 Comparison of the targeted *trans*-splicing between linear PTM (Figure 5, lane 2) and safety PTM (Figure 5, lane 8) demonstrated that the safety PTM *trans*-spliced less efficiently than the linear PTM.

- Non-targeted reactions were amplified using β -globin-F (specific to exon 1 of β -globin) and DT-3R primers. The predicted product generated by non-specific PTM *trans*-splicing with β -globin pre-mRNA is 189 bp. Non-specific *trans*-splicing was evident between linear PTM and β -globin pre-mRNA (Figure 5, lane 5). In contrast, non-specific *trans*-splicing was virtually eliminated by the use of safety PTM (Figure 5, lane 11). This was not unexpected, since the linear PTM was designed for maximal activity to prove the concept of spliceosome-mediated *trans*-splicing. The open structure of the linear PTM combined with its potent 3' splice sites strongly promotes the binding of splicing factors. Once bound, these splicing factors can potentially initiate *trans*-splicing with any 3' splice site, in a process similar to *trans*-splicing in trypanosomes. The safety stem was designed to prevent splicing factors, such as U2AF from binding to the PTM prior to target acquisition. This result is consistent with a model that base-pairing between the free portion of the binding domain and the β HCG6 target unwinds the safety stem (by mRNA-mRNA interaction), uncovering the 3' splice site, permitting the recruitment of splicing factors and initiation of *trans*-splicing. No *trans*-splicing was detected between β -globin and β HCG6 pre-mRNAs (Figure 5, lanes 3, 6, 9 and 12).

25 6.2.5. IN VITRO TRANS-SPLICING OF SAFETY PTM AND VARIANTS

- To better understand the role of *cis*-elements at the 3' splice site in *trans*-splicing a series of safety PTM variants were constructed in which either the PPT was weakened by substitution with purines and/or the BP was modified by base substitution (see Table I). *In vitro trans*-splicing efficiency of the safety (PTM+SF) was compared to three safety variants, which demonstrated a decreased ability to

trans-splice. The greatest effect was observed with variant 2 (PTM+SFPy2), which was *trans*-splicing incompetent (Figure 4C, lanes 5-6). This inhibition of *trans*-splicing may be attributed to a weakened PPT and/or the higher T_m of the safety stem. In contrast, variations in the BP sequence (PTM+SFBP3) did not markedly effect *trans*-splicing (Figure 4C, lanes 7-8). This was not surprising since the modifications introduced were within the mammalian branch point consensus range YNYURAC (where Y = pyrimidine, R = purine and N = any nucleotide) (Moore *et al.*, 1993). This finding indicates that the branch point sequence can be removed without affecting splicing efficiency. Alterations in the PPT (PTM+SF-Pyl) decreased the level of *trans*-splicing (lanes 3-4). Similarly, when both BP and PPT were altered PTM+SFBP3-Pyl, they caused a further reduction in *trans*-splicing (Figure 4C, lanes 9-10). The order of *trans*-splicing efficiency of these safety variants is PTM+SF>PTM+SFBP3>PTM+SFPyl>PTM+SFBP3-Pyl>PTM+SFPy2. These results confirm that both the PPT and BP are important for efficient *in vitro trans*-splicing (Rosciuno *et al.*, 1993, J. Biol. Chem. 268:11222).

6.2.6. COMPETITION BETWEEN CIS- AND TRANS- SPLICING

To determine if it was possible to block pre-mRNA *cis*-splicing by increasing concentrations of PTM, experiments were performed to drive the reaction towards *trans*-splicing. Splicing reactions were conducted with a constant amount of βHCG6 pre-mRNA target and various concentrations of *trans*-splicing PTM. *Cis*-splicing was monitored by RT-PCR using primers to βHCG-F (exon 1) and βHCG-R2 (exon 2). This amplified the expected 125 bp *cis*-spliced and 478 bp unspliced products (Figure 6A). The primers βHCG-F and DT-3R were used to detect *trans*-spliced products (Figure 6B). At lower concentrations of PTM, *cis*-splicing (Fig. 6A, lanes 1-4) predominated over *trans*-splicing (Figure 6B, lanes 1-4). *Cis*-splicing was reduced approximately by 50% at a PTM concentration 1.5 fold greater than target. Increasing the PTM mRNA concentration to 3 fold that of target inhibited *cis*-splicing by more than 90% (Figure 6A, lanes 7-9), with a concomitant increase in the *trans*-spliced product (Figure 6B, lanes 6-10). A competitive RT-PCR was performed to simultaneously amplify both *cis* and *trans*-spliced products by including all three

primers (βHCG-F, HCG-R2 and DT-3R) in a single reaction. This experiment had similar results to those seen in Figure 6, demonstrating that under *in vitro* conditions, a PTM can effectively block target pre-mRNA *cis*-splicing and replace it with the production of an engineered *trans*-spliced chimeric mRNA.

5 6.2.7. TRANS-SPLICING IN TISSUE CULTURE

To demonstrate the mechanism of *trans*-splicing in a cell culture model, the human lung cancer line H1299 (βHCG6 positive) was transfected with a vector expressing SP+CRM (a non-functional diphtheria toxin) or vector alone (pcDNA3.1) and grown in the presence of neomycin. Four neomycin resistant colonies were individually collected after 14 days and expanded in the continued presence of neomycin. Total mRNA was isolated from each clone and analyzed by RT-PCR using primers βHCG-F and DT-3R. This yielded the predicted 196 bp *trans*-spliced product in three out of the four selected clones (Figure 7A, lanes 2, 3 and 4). The amplified product from clone #2 was directly sequenced, confirming that PTM driven *trans*-splicing occurred in human cells exactly at the predicted splice sites of endogenously expressed βHCG6 target exon 1 and the first nucleotide of DT-A (Figure 7B).

6.2.8. TRANS-SPLICING IN AN *IN VIVO* MODEL

To demonstrate the mechanism of *trans*-splicing *in vivo*, the following experiment was conducted in athymic (nude) mice. Tumors were established by injecting 10⁷ H1299 cells into the dorsal flank subcutaneous space. On day 14, PTM expression plasmids were injected into tumors. Most tumors were then subjected to electroporation to facilitate plasmid delivery (see Table 2, below). After 48 hrs, tumors were removed, poly-A mRNA was isolated and amplified by RT-PCR. *Trans*-splicing was detected in 8 out of 19 PTM treated tumors. Two samples produced the predicted *trans*-spliced product (466 bp) from mRNA after one round of RT-PCR. Six additional tumors were subsequently positive for *trans*-splicing by a second PCR amplification using a nested set of primers that produced the predicted 196 bp product (Table 2). Each positive sample was sequenced, demonstrating that βHCG6 exon 1

was precisely *trans*-spliced to the coding sequence of DT-A (wild type or CRM mutant) at the predicted splice sites. Six of the positive samples were from treatment groups that received cotransfected plasmids, pcPTM+CRM and pcHCG6, which increased the concentration of target pre-mRNA. This was done to enhance the probability of detecting *trans*-spliced events. The other two positive tumors were from a group that received only pcPTM+Sp (wild type DT-A). These tumors were not transfected with β HCG6 expression plasmid, demonstrating once again, as in the tissue culture model described in Section 6.2.7, that *trans*-splicing occurred between the PTM and endogenous β HCG6 pre-mRNA produced by tumor cells.

WO 02/053581

52

PCT/US02/00416

Table 2. <i>Trans</i> -splicing in tumors in nude mice.							
Mouse	Plasmid	Left	Right	Electroporation	RT-PCR Left Right	Nested PCR	Nucleotide Sequence
B1	PCMV-Sport	B1-1	B1-2	-	- -	- -	- -
B2	PCMV-Sport	B1-3	B1-4	^a 1000V/cm	- -	- -	- -
B3	pcSp+CRM	B3-1	B3-2	^a 1000V/cm	- -	- -	- -
		B3-3	B3-4	^a 1000V/cm	- -	- -	- -
B4	pcSp+CRM	B4-1	B4-2	^b 50V/cm	- -	- -	- -
		B4-3	B4-4	^c 25V/cm	- -	- -	- -
B5	pcSp+CRM/ pcHCG6	B5-1	B5-2	^a 1000V/cm	+ -	+ +	ATGTTCCAGTGGCGTGATGA (SEQ ID NO:53)
		B5-3	B5-4	^a 1000V/cm	+ -	+ +	ATGTTCCAGTGGCGTGATGA (SEQ ID NO:53)
B6	pcSp+CRM/ pcHCG6	B6-1	B6-2	^b 50V/cm	- -	- -	- -
		B6-3	B6-4	^c 25V/cm	- -	+ +	ATGTTCCAGTGGCGTGATGA (SEQ ID NO:53)
B7	pc PTM+Sp	B7-1		^a 1000V/cm	-	-	-
B8	Pc PTM+Sp	B8-1		^b 50V/cm	-	+	ATGTTCCAGTGGCGTGATGA (SEQ ID NO:53)
B9	Pc PTM+Sp	B9-1		-	-	+	ATGTTCCAGTGGCGTGATGA (SEQ ID NO:53)

^a: 6 pulses of 99 μ s sets of 3 pulses administered orthogonally^b: 8 pulses of 10ms sets of 4 pulses administered orthogonally^c: 8 pulses of 50ms sets of 4 pulses administered orthogonally⁺: positive for RT-PCR trans-spliced produce⁻: did not receive electroporation

7. EXAMPLE: *lacZ* TRANS-SPLICING MODEL

In order to demonstrate and evaluate the generality of the mechanism of spliceosome mediated targeted *trans*-splicing between a specific pre-mRNA target and a PTM, a simple model system based on expression of enzyme β -galactosidase was developed. The following section describes results demonstrating successful spliceosome mediated targeted *trans*-splicing between a specific target and a PTM.

7.1. MATERIALS AND METHODS7.1.1. PRIMER SEQUENCES

The following primers were used for testing the *lacZ* model system:

5' Lac-1F
 5 GCATGAATTCGGTACCATGGGGGGTTCTCATCATCATC
 5' Lac-1R
 CTGAGGATCCTCTTACCTGTAAACGCCCATACTGAC
 3' Lac-1F
 GCATGGTAACCCCTGCAGGGCGGCTTCGTCTGGGACTGG
 10 3' Lac-1R
 CTGAAAGCTTGTAACTTATTATTTTACACCCAGACC
 3' Lac-Stop
 GCATGGTAACCCCTGCAGGGCGGCTTCGTCTAATAATGGGACTGGGT
 G
 15 HCG-In1F
 GCATGGATCCTCCGAGGGCCCTGGGCACCTTCAC
 HCG-In1R
 CTGACTGCAGGGTAACCGACAAGGACACTGCTTCACC
 HCG-Ex2F
 20 GCATGGTAACCCCTGCAGGGGCTGCTGCTGTGCTG
 HCG-Ex2R
 CTGAAAGCTTGTAAACCAGCTACCATGGTGGGCAG
 Lac-TR1 (Biotin): 7-GGCTTTCGCTACCTGGAGAGAC
 Lac-TR2 GCTGGATGCGGCGTGCGGTGC
 25 HCG-R2: CGGCACCGTGCCGAAGTGG

7.1.2. CONSTRUCTION OF THE *lacZ* PRE-mRNA TARGET MOLECULE

The *lacZ* target 1 pre-mRNA (pc3.1 lacT1) was constructed by cloning of the following three PCR products: (i) the 5' fragment of *lacZ*; followed by (ii)

30 βHCG6 intron 1; (iii) and the 3' fragment of *lacZ*. The 5' and 3' fragment of the *lacZ*

gene were PCR amplified from template pcDNA3.1/His/lacZ (Invitrogen, San Diego, CA) using the following primers: 5' Lac-1F and 5' Lac-1R (for 5' fragment), and 3' Lac-1F and 3' Lac-1R (for 3' fragment). The amplified lacZ 5' fragment is 1788 bp long which includes the initiation codon, and the amplified 3' fragment is 1385 bp long and has the natural 5' and 3' splice sites in addition to a branch point, polypyrimidine tract and β HCG6 intron 1. The β HCG6 intron 1 was PCR amplified using the following primers: HCG-In1F and HCG-In1R.

The lacZ target 2 is an identical version of lacZ target 1 except it contains two stop codons (TAA TAA) in frame four codons after the 3' splice site.

10 This was created by PCR amplification of the 3' fragment (lacZ) using the following primers: 3' Lac-Stop and 3' Lac 1R and replacing the functional 3' fragment in lacZ target 1.

7.1.3. CONSTRUCTION OF pc3.1 PTM1 and pc3.1 PTM2

The pre-trans-splicing molecule, pc3.1 PTM1 was created by digesting pPTM +Sp with PstI and HindIII and replacing the DNA fragment encoding the DT-A toxin with the a DNA fragment encoding the functional 3' end of lacZ. This fragment was generated by PCR amplification using the following primers: 3' Lac-1F and 3' Lac-1R. For cell culture experiments, an EcoRI and HindIII fragment of pc3.1 PTM2 which contains the binding domain to HCG intron 1, a 30 bp spacer, a yeast branch point (TACTAAC), and strong polypyrimidine tract followed by the lacZ cloned was cloned into pcDNA3.1.

The pre-trans-splicing molecule, pc3.1 PTM2 was created by digesting pPTM +Sp with PstI and HindIII and replacing the DNA fragment encoding the DT-A toxin with the β HCG6 exon 2. β HCG6 exon 2 was generated by PCR amplification using the following primers: HCG-Ex2F and HCG-Ex2R. For cell culture experiments, an EcoRI and HindIII fragment of pc3.1 PTM2 which contains the binding domain to HCG intron 1, a 30 bp spacer, a yeast branch point (TACTAAC), and strong polypyrimidine tract followed by the β HCG6 exon 2 cloned was used.

7.1.4. CO-TRANSFECTION OF THE *lacZ* SPLICE TARGET PRE-mRNA AND PTMS INTO 293T CELLS

Human embryonic kidney cells (293T) were grown in DMEM medium supplemented with 10% FBS at 37°C in a 5% CO₂. Cells were co-transfected with
 5 pc3.1 LacT1 and pc3.1 PTM2, or pc3.1 LacT2 and pc3.1 PTM1, using Lipofectamine Plus (Life Technologies, Gaithersburg, MD) according to the manufacturer's instructions. 24 hours post-transfection, the cells were harvested; total RNA was isolated and RT-PCR was performed using specific primers for the target and PTM molecules. β -galactosidase activity was also monitored by staining the cells using a
 10 β -gal staining kit (Invitrogen, San Diego, CA).

7.2. RESULTS

7.2.1. THE *lacZ* SPLICE TARGET *CIS*-SPLICES EFFICIENTLY TO PRODUCE FUNCTIONAL β -GALACTOSIDASE

To test the ability of the splice target pre-mRNA to *cis*-splice
 15 efficiently, pc3.1 *lacT1* was transfected into 293 T cells using Lipofectamine Plus reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD) followed by RT-PCR analysis of total RNA. Sequence analysis of the *cis*-spliced RT-PCR product indicated that splicing was accurate and occurred exactly at the predicted splice sites (Fig. 12B). In addition, accurate *cis*-splicing of the target pre-mRNA molecule results in formation of a
 20 mRNA capable of encoding active β -galactosidase which catalyzes the hydrolysis of β -galactosidase, *i.e.*, X-gal, producing a blue color that can be visualized under a microscope. Accurate *cis*-splicing of the target pre-mRNA was further confirmed by successfully detecting β -galactosidase enzyme activity.

Repair of defective *lacZ* target 2 pre-mRNA by trans-splicing of the
 25 functional 3' *lacZ* fragment (PTM1) was measured by staining for β -galactosidase enzyme activity. For this purpose, 293T cells were co-transfected with *lacZ* target 2 pre-mRNA (containing a defective 3' fragment) and PTM1 (contain normal 3' *lacZ* sequence). 48 hours post-transfection cells were assayed for β -galactosidase enzyme activity. Efficient trans-splicing of PTM1 into the *lacZ* target 2 pre-mRNA will

result in the production of functional β -galactosidase activity. As demonstrated in Figure 11B-E, trans-splicing of PTM 1 into lacZ target 2 results in restoration of β -galactosidase enzyme activity up to 5% to 10% compared to control.

7.2.2. TARGETED TRANS-SPLICING BETWEEN THE *lacZ* TARGET PRE-mRNA and PTM2

To assay for *trans*-splicing, *lacZ* target pre-mRNA and PTM2 were transfected into 293 T cells. Following transfection, total RNA was analyzed using RT-PCR. The following primers were used in the PCR reactions: *lacZ*-TR1 (*lacZ* 5' exon specific) and HCGR2 (β HCGR exon 2 specific). The RT PCR reaction produced the expected 195 bp *trans*-spliced product (Fig. 11, lanes 2 and 3) demonstrating efficient *trans*-splicing between the *lacZ* target pre-mRNA and PTM 2. Lane 1 represents the control, which does not contain PTM 2.

The efficiency of the *trans*-splicing was also measured by staining for β -galactosidase enzyme activity. To assay for *trans*-splicing, 293T cells were co-transfected with *lacZ* target pre-mRNA and PTM 2. 24 hours post-transfection, cells were assayed for β -galactosidase activity. If there is efficient *trans*-splicing between the target pre-mRNA and the PTM, a chimeric mRNA is produced consisting of the 5' fragment of the *lacZ* target pre-mRNA and β HCGR6 exon 2 is formed which is incapable of coding for an active β -galactosidase. Results from the co-transfection experiments demonstrated that *trans*-splicing of PTM2 into *lacZ* target 1 resulted in the reduction of β -galactosidase activity by compared to the control.

To further confirm that *trans*-splicing between the *lacZ* target pre-mRNA and PTM2 is accurate, RT-PCR was performed using 5' biotinylated *lacZ*-TR1 and non-biotinylated HCGR2 primers. Single stranded DNA was isolated and sequenced directly using HCGR2 primer (HCG exon 2 specific primer). As evidenced by the sequence of the splice junction, *trans*-splicing occurred exactly as predicted between the splice sites (Fig. 12A and 12B), confirming that a conventional pre-mRNA can be invaded by an engineered PTM during splicing, and moreover, that this reaction is precise.

8. EXAMPLE: CORRECTION OF THE CYSTIC FIBROSIS TRANSMEMBRANE REGULATOR GENE

Cystic fibrosis (CF) is one of the most common genetic diseases in the world. The gene associated with CF has been isolated and its protein product deduced (Kerem, B.S. et al., 1989, Science 245:1073-1080; Riordan et al., 1989, Science 245:1066-1073; Rommans, et al., 1989, Science 245:1059-1065). The protein product of the CF associated gene is referred to as the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). The most common disease-causing mutation which accounts for ~70% of all mutant alleles is a deletion of three nucleotides in exon 10 that encode for a phenylalanine at position 508 ($\Delta F508$). The following section describes the successful repair of the cystic fibrosis gene using spliceosome mediated *trans*-splicing and demonstrates the feasibility of repairing CFTR in a model system.

8.1 MATERIALS AND METHODS

8.1.1. PRE-TRANS-SPLICING MOLECULE

The CFTR pre-trans-splicing molecule (PTM) consists of a 23 nucleotide binding domain complementary to CFTR intron 9 (3' end, -13 to -31), a 30 nucleotide spacer region (to allow efficient binding of spliceosomal components), branch point (BP) sequence, polypyrimidine tract (PPT) and an AG dinucleotide at the 3' splice site immediately upstream of the sequence encoding CFTR exon 10 (wild type sequence containing F508). This initial PTM was designed for maximal activity in order to demonstrate *trans*-splicing; therefore the PTM included a UACUAAC yeast consensus BP sequence and an extensive PPT. An 18 nucleotide HIS tag (6 histamine codons) was included after wild type exon 10 coding sequence to allow specific amplification and isolation of the *trans*-spliced products and not the endogenous CFTR. The oligonucleotides used to generate the two fragments included unique restriction sites. (ApaI and PstI, and PstI and NotI, respectively) to facilitate directed cloning of amplified DNA into the mammalian expression vector pcDNA3.1.

8.1.2. THE TARGET CFTR PRE-mRNA MINI-GENE

The CFTR mini-gene target is shown in Figure 13 and consists of CFTR exon 9; the functional 5' and 3' regions of intron 9 (260 and 265 nucleotides from each end, respectively); exon 10 [AF508]; and the 5' region of intron 10 (96 nucleotides). In addition, as depicted in Figure 16, a mini-target gene comprising CFTR exons 1-9 and 10-24 can be used to test the use of spliceosome mediated *trans*-splicing for correction of the cystic fibrosis mutation. Figure 17, shows a double splicing PTM that may also be used for correction of the cystic fibrosis mutation. As shown, the double splicing PTM contains CFTR BD intron 9, a spacer, a branch point, a polypyrimidine tract, a 3' splice site, CFTR exon 10, a spacer, a branch point, a polypyrimidine tract, a 5' splice site and CFTR BD exon 10.

8.1.3. OLIGONUCLEOTIDES

The following oligonucleotides were used to create CFTR PTM:

Forward CF3
 15 ACCT GGGCCC ACC CAT TAT TAG GTC ATT AT' CCGCGG AAC ATT ATA
 ApaI site. Intron 9 CFTR, -12 to -34.

Reverse CF4
 ACCT CTGCAGGTCGACC CTG CAG GAA AAA AAA GAA G
 PstI BstEI PPT.

20 Forward CF5
 ACCT CTGCAG ACT TCA CTT CTA ATG ATG AT
 PstI Exon 10 CFTR, +1 to +24

Reverse CF6
 25 ACCT GCGGCCGC CTA ATG ATG ATG ATG ATG ATG CTC TTC TAG TTG GCA
 TGC Not I. Stop Polyhistamine tag Exon 10 CFTR, +15 to +132

The following nucleotides were used to create the CFTR TARGET pre-mRNA mini gene (Exon 9 + mini-Intron 9 + Exon 10 + 5' end Intron 10):

WO 02/053581

59

PCT/US02/00416

- Forward CF18
GACCT CTCGAG GGA TTT GGG GAA TTA TTT GAG
XhoI Exon 9 CFTR, 1 to 21.
- 5 Reverse CF19
CTGACCT GCGGCCGC TAC AGT GTT GAA TGT GGT GC
NotI Intron 9 5' end.
- 10 Forward CF20
CTGACCT GCGGCCGC CCA ACT ATC TGA ATC ATG TG
NotI Intron 9 3' end.
- Reverse CF21
GACCT CTTAAG TAG ACT AAC CGA TTG AAT ATG
AflIII Intron 10 5' end.
- 15 The following oligonucleotides were used for detection of trans-spliced products:
- Reverse Bio-His
CTA ATG ATG ATG ATG ATG ATG
Stop. Polyhistidine tag (5' biotin label).
- 20 Reverse Bio-His(2)
CGC CTA ATG ATG ATG ATG ATG
3' UT Stop. Polyhistidine tag (5' biotin label).
- Forward CF8
CTT CTT GGT ACT CCT GTC CTG
Exon 9 CFTR.
- 25 Forward CF18
GACCT CTCGAG GGA TTT GGG GAA TTA TTT GAG
XhoI Exon 9 CFTR.
- Reverse CF28
AAC TAG AAG GCA CAG TCG AGG
30 Pc3.1 vector sequence (present in PTM 3' UT but not target).

8.2. RESULTS

The PTM and target pre-mRNA were co-transfected in 293 embryonic kidney cells using lipofectamine (Life Technologies, Gaithersburg, MD). Cells were harvested 24 h post transfection and RNA was isolated. Using PTM and target-specific primers in RT-PCR reactions, a *trans*-spliced product was detected in which mutant exon 10 of the target pre-mRNA was replaced by the wild type exon 10 of the PTM (Figure 14). Sequence analysis of the *trans*-spliced product confirmed the restoration of the three nucleotide deletion and that splicing was accurate, occurring at the predicted splice sites (Figure 15), demonstrating for the first time RNA repair of the cystic fibrosis gene, CFTR (Mansfield et al., 2000, Gene Therapy 7:1885-1895).

9. EXAMPLE: DOUBLE-TRANS-SPLICING

The following example demonstrates accurate replacement of an internal exon by a double-*trans*-splicing between a target pre-mRNA and a PTM RNA containing both 3' and 5' splice sites leading to production of full length functionally active protein.

As described herein, any pre-mRNA can be reprogrammed by providing a *trans*-reactive RNA molecule containing either a 3'-splice site, a 5'-splice site or both. The following example describes successful targeting and replacement of a single internal exon utilizing pre-*trans*-splicing molecules (PTMs) containing both the 5' and 3' splice sites. Such PTMs can promote two *trans*-splicing reactions with the intended target gene mediated by the spliceosome(s). To test this mechanism, a splicing lacZ model target gene consisting of lacZ 5' "exon" - CFTR mini-intron 9 - CFTR exon 10 (ΔF508) - CFTR mini-intron 10 followed by lacZ 3' "exon" was created. In this target transcript, a 124 bp central portion of the β-galactosidase ORF was substituted by exon 10 (ΔF508) of CFTR, thus it produces non-functional protein. A PTM consisting of the missing 124 bp lacZ "mini-exon" and a 5' and 3' *trans*-splicing domain containing binding domains (BDs) complementary to the target introns and exons was created. Transfection of HEK 293T cells with either target alone or PTM alone showed no detectable levels of β-gal activity. In contrast, 293T cells transfected with target plus PTM produced substantial levels of β-gal activity

indicating the restoration of protein function. The accuracy of *trans*-splicing between the target and PTM was confirmed by sequencing the appropriate RT-PCR product, which revealed the predicted internal exon substitution. The feasibility of this approach in a disease model was tested by replacing the CFTR Δ F508 exon 10 with normal exon 10 containing F508 in cystic fibrosis. These results demonstrate that a *trans*-splicing technology can be easily adapted to correct many of the genetic defects whether they are associated with the 5' exon or 3' exon or any internal exon of the gene.

Figure 18 is a schematic of a model lacZ target consisting of lacZ 5' exon - CFTR mini-intron 9 - CFTR exon 10 (delta 508) - CFTR min-intron 10 followed by the lacZ 3' exon. In this target, a 124 bp central portion of the lacZ gene is substituted with CFTR exon 10 which has a mutation at position 508 (delta 508). The pre-mRNA target undergoes normal *cis*-splicing to produce an mRNA consisting of lacZ 5' exon - CFTR exon 10 (delta 508) followed by the lacZ 3' exon. Because of the disruption in β -galactosidase ORF it produces truncated proteins which are non-functional.

To restore β -gal function by double-*trans*-splicing, three PTMs were created consisting of the missing 124 bp lacZ "mini-exon" and a 5' and 3' *trans*-splicing domain containing binding domains complementary to the target introns and exons as shown in Figure 19. These PTMs have an 120 bp 3' binding domain (complementary to intron 9) from PTM24 (see below) used in 3' exon replacement, spacer sequence, yeast branch point, polypyrimidine tract, 3' acceptor AG dinucleotide, lacZ "mini-exon", 5' splice site, spacer sequence followed by the 5' binding domain. These PTMs differ only in their 5' binding domain sequences. DSPTM5 has a 27 bp BD which is complementary to intron 10 and blocks just the 5' splice site of the target. DSPTM6 has 120 bp 5' BD and covers both 5' and 3' splice sites of the target, while, DSPTM7 has 260 bp BD which masks both the splice sites (5' and 3') and also covers the entire exon of the target.

A schematic representation of a double-*trans*-splicing reaction showing the binding of DSPTM7 with DSCFT1.6 target pre-mRNA is shown in Figure 20. 3' BD: 120 bp binding domain complementary to mini-intron 9; 5' BD

WO 02/053581

62

PCT/US02/00416

(260 bp); second binding domain complementary to mini-intron 10 and exon 10. ss: splice sites; BP: branch point, and PPT: polypyrimidine tract.

The important structural elements of DSPTM7 (Figure 21) are as

follows:

5 (1) 3' BD (120 BP):

GATTCACCTGCTCCAATTATCATCCTAAGCAGAAGTGATATTCCTTA
TTTGTAAGATTCTATTAACTCATTGATTCAAAATATTAAAATACCTCCT
GTTTCATACTCTGCTATGCAC

10 (2) Spacer sequences (24 bp): AACATTATTATAACGTGCTCGAA

(3) Branch point, pyrimidine tract and acceptor splice site:

BP Kpn I PPT EcoRV 3' ss
15 TACTAAC T GGTACC TCTCTTTTTTTT GATATC CTGCAG |GGC GGC|
↓ lacZ mini-exon

(4) 5' donor site and 2nd spacer sequence:

5' ss
20 lacZ mini-exon ↓
[TGA ACG] GTAAGT
GTTATCACCAGATATGTGTCTAACCTGATTCGGGCCTTC
GATACGCTAAGATCCACCGG

25 (5) 5' BD (260 BP):

TCAAAAAGTTTTACATAATTTCCTACCTCTTCT
TGAATTCATGCTTTGATGACGCTTCTGTATCTATATC
ATCATTGGAAACACCAATGATTTTCTTTAATGGTGCC
TGGCATAATCCTGGAAACTGATAACACAATGAAATT
30 CTCCACTGTGCTTAAAAAACCTCTTGAATCTCCA
TTTCTCCATAATCATCATTACAACCTGAACCTGCGAAA
TAAACCCATCATTATTAACTCATTATCAAATCACGC

To determine whether the restoration of β -gal function is RNA *trans*-
35 splicing mediated, the mutants are depicted in Figure 22. DSPTM8 is a 3' splice
mutant in which the 3' splice elements such as BP, polypyrimidine tract and the 3'
acceptor AG dinucleotides were deleted and replaced with random sequences. This
PTM still has 3' and 5' binding domains and the functional 5' splice site. PTM29 lacks
the 2nd binding domain + 5' ss but still has the 3' binding domain 3' splice site, while

PTM30 lacks the 1st binding domain + 3' splice site but has the functional 5' splice site and 2nd binding domain.

To examine the double-*trans*-splicing mediated restoration of β -gal function, 293T cells were either transfected with 2 μ g of target or PTM alone or co-transfected with 2 μ g of target + 1.5 μ g of PTM using Lipofectamine Plus reagent. 48 hrs. after transfection, total RNA was isolated and analyzed by RT-PCR using K1-1F and Lac-6R primers. These primers amplify both *cis*- and *trans*-spliced products in a single reaction which were identified based on the size. The *cis*-spliced product is 295 bp in size while the *trans*-spliced product is 230 bp in size. To confirm that *trans*-splicing between DSPTM7 and DSCFT1.6 pre-mRNA is precise, RT-PCR amplified products were excised, re-amplified using K1-2F and Lac-6R primers and sequenced directly using K1-2F or Lac-6R primers. As shown in Figure 23 *trans*-splicing occurred exactly at the predicted splice sites, confirming the precise internal exon substitution by two *trans*-splicing events.

The repair of defective lacZ pre-mRNA by double *trans*-splicing events and subsequent production of full-length β -gal protein was investigated in co-transfection assays. 293T cells were co-transfected with DSCFT1.6 target and DSPTM7 expression plasmids, as well as with DSCFT1.6 target or DSPTM7 alone as controls. Western blot analysis of total cell lysates using polyclonal anti- β -galactosidase antiserum specifically recognized a ~ 120 kDa protein only in cells co-transfected with DSCFT1.6 target + DSPTM7 plasmids (Fig. 24, lanes 3 and 4) but not in cells transfected with either DSCFT1.6 target (Lane 1) or DSPTM7 plasmid alone (Lane 2). Similarly, no full-length protein was detected in cells co-transfected with DSCFT1.6 target + 3' splice mutant (Lane 5 and 6) or PTM29 or 30 in which either 3' *trans*-splicing domain or 5' *trans*-splicing domains has been deleted (Lane 7). In addition, the 120 kDa protein band co-migrated with the full-length functional β -gal produced using lacZ-T1 plasmid (positive control, data not shown). These results not only confirmed the production of full-length protein by double-*trans*-splicing between the target and PTM but also demonstrated that both the 3' splice site and 5' splice sites are essential for this process.

To determine whether the full-length protein produced by double-*trans*-splicing between the target pre-mRNA and DSPTM7 RNA is functionally active, 293T cells were co-transfected with DSCFT1.6 targeted + one of the double splicing PTMs 5, 6 or 7 expression plasmids, or transfected with DSCFT1.6 target or DSPTM7 alone. Total cell extracts were prepared and assayed for β -gal activity using ONPG assay (Invitrogen). β -gal activity in extracts prepared from cells transfected with either DSCFT1.6 target or DSPTM7 alone was almost identical to the background levels detected in mock transfection (Fig. 25). In contrast, 293T cells co-transfected with DSCFT1.6 target and DSPTM7 produced ~ 21 fold higher levels of β -gal activity over the background (Fig. 25). These results confirmed the accurate double-*trans*-splicing between the target pre-mRNA and PTM RNA and production of the full-length functional protein.

To confirm that restoration of β -gal activity by double-*trans*-splicing reaction is absolutely depended on the presence of both 3' and 5' splice sites of the PTM, we constructed several mutants: (a) DSPTM8, is identical to DSPTM7 except the functional 3' splice elements (branch point, polypyrimidine tract and the 3' acceptor AG dinucleotides) were deleted and substituted with random sequences (see Fig. 22 for details); (b) PTM29 lacks 5' splice site as well as the 5' binding domain but has the 3' binding domain and 3' splice site, and (c) PTM30 lacks 3' binding domain and 3' splice site but has the 5' splice site and 5' binding domain. β -gal activity in extracts prepared from cells transfected with either DSCFT1.6 target or DSPTM7 alone was almost identical to the background levels detected in mock transfection (Fig. 26). Similarly, no significant increase in β -gal activity was detected in cells transfected with either DSPTM8 alone (3' splice site mutant) or co-transfection of DSCFT1.6 target + one of the above mutant PTMs. On the other hand, cells co-transfected with DSCFT1.6 target and DSPTM7 with functional 3' and 5' splice sites produced substantial levels of β -gal activity over the background (Fig. 26). These results confirmed the requirement of both splice sites in the double-splicing PTM and also eliminated the possibility that restoration of β -gal activity was due to complementation between the truncated proteins (Fig. 26).

Different concentrations of the target and PTM were co-transfected and analyzed for β -gal activity restoration. As expected, 293T cells co-transfected with DSCFT1.6 target + DSPTM7 showed substantial levels of β -gal activity (~ 30 fold) over the controls. Increasing the concentrations of the PTM by 2 and 3 fold did
 5 increase the level of β -gal activity, but not significantly (Fig. 27). These results further confirmed the double-*trans*-splicing mediated restoration of β -gal enzyme function.

The specificity of double-*trans*-splicing reaction was examined by constructing a non-specific target (DSHCGT1.1) which is similar to that of specific target (DSCFT1.6) but has β HCG intron 1 - β HCG exon 2 and β HCG intron 2 instead
 10 of CFTR mini-intron 9 - CFTR exon 10 (delta 508) and CFTR mini-intron 10 (Fig. 28). RT-PCR analysis of the total RNA isolated from cells transfected with either DSHCGT1.1 (non-specific target) alone or in combination DSPTM7 (targeted to DSCFT1.6 target) failed to produce the expected 314 bp double-*trans*-spliced product.
 15 On the other hand, RT-PCR analysis of the total RNA prepared from cells co-transfected with specific target + PTM produced the expected 314 pb product. This was further confirmed by β -gal activity assay of the total cellular extract. The level β -gal activity detected in cells transfected with non-specific target alone or in combination with DSPTM7 targeted to DSCFT1.6 target was almost identical to the
 20 background level. In contrast substantial levels of β -gal activity was detected in cells co-transfected with specific target (DSCFT1.6) + DSPTM7 (Fig. 27). These results confirmed that the double-*trans*-splicing is highly specific.

The repair model in Fig. 30 shows a portion of a target CFTR pre-mRNA consisting of exons 1-9, mini-intron 9, exon 10 containing the delta 508
 25 mutation, mini-intron 10 and exons 11-24 (Fig. 30). The PTM shown in the figure consists of exon 10 coding sequences (containing codon 508) and two *trans*-splicing domains each with its own splicing elements (acceptor and donor sites, branchpoint and pyrimidine tract) and a binding domain complementary to intron 9 splice site, part
 30 of exon 10 (5' and 3' ends) and intron 10 5' splice site (Fig. 31 (DS-CF1)). Exon 10 of the PTM also has modified codon usage throughout to reduce antisense effects between exon 10 of the PTM and its own binding domains and for PTMs that have

binding domains which are complementary to exon sequences (Fig. 31). A double-*trans*-splicing event between the PTM and target should produce a repaired full-length mRNA.

Fig. 32 shows the sequence of a single PCR product showing target exon 9 correctly spliced to PTM 20 exon 10 (with modified codons) (upper panel), codon 508 in exon 10 of the PTM (middle panel) and PTM exon 10 correctly spliced to target exon 11 (lower panel). The sequence of a repaired target was generated by RT-PCR followed by PCR.

10. EXAMPLE: TRANS-SPLICING REPAIR OF THE
CYSTIC FIBROSIS GENE USING A PTM
THAT CAN PERFORM 5' EXON REPLACEMENT

The key advantage of using 5' exon replacement for gene repair are

- (a) it permits replacement of the 5' portion of a gene
- (b) the construct requires less sequence and space than a full-length gene construct,
- (c) PTMs can be produced that lack a polyA signal which should prevent PTM translation, and (d) the 5' end can be modified to increase translation.

10.1 MATERIALS AND METHODS

10.1.1 PLASMID CONSTRUCTION

The CFTR coding sequences (exons 1-10) for PTM30 were generated by PCR using a partial cDNA plasmid template (61160; American Type Culture Collection, Manassas, VA). The *trans*-splicing domain (TSD) [including the binding domain, spacer sequence, polypyrimidine tract (PPT), branchpoint (BP) and 3' splice site] was generated from a PCR product (using an existing plasmid template) and by annealing oligonucleotides. The different fragments (the TSD and coding sequences) were then cloned into pcDNA3.1(-) using appropriate restriction sites. Oligodeoxynucleotide primers were procured from Sigma Genosys (The Woodlands, TX). All PCR products were generated with either REDTaq (Sigma, St. Louis, MO), or cloned *Pfu* (Stratagene, La Jolla, CA) DNA Polymerase. PCR primers for

amplification contained restriction sites for directed cloning. PCR products were digested with the appropriate restriction enzymes and cloned into the mammalian expression plasmid pc3.1DNA(-) (Invitrogen, Carlsbad, CA).

10.2 CELL CULTURE AND TRANSFECTIONS

5 Constructs were cotransfected in human embryonic kidney (HEK) 293T or 293 cells (1.25 x 10⁶ cells per 60 mm poly-d-lysine coated dish) using LipofectaminePlus (Life Technologies, Gaithersburg, MD) and the cells were harvested 48 h after the start of transfection. Total RNA was isolated as described in the manufacturers instructions (Epicenter Technologies, Inc.). HEK 293T cells were
10 grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Life Technologies) supplemented with 10% v/v fetal bovine serum (Hyclone, Inc., Logan, UT). All cells were kept in a humidified incubator at 37°C and 5% CO₂.

10.1.3 REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR)

15 RT-PCR was performed using an EZ-RT-PCR kit (Perkin-Elmer, Foster, CA). Each reaction contained 0.03 to 1.0 µg of total RNA and 80 ng of a 5' and 3' specific primer in a 40 µl reaction volume. RT-PCR products were electrophoresed on 2% Seaken agarose gels. The PTM- and target-specific oligonucleotides used to generate *trans*-spliced products are
20 5'-CGCTGGAAAAACGAGCTTGTG-3' (primer CF93) and 5'-ACTCAGTGTGATTCCACCTTCTC-3' (primer CF111), respectively. The PTM- and target-specific oligonucleotides used to generate *cis*-spliced products were CF1 and CF93. The sequence of oligonucleotide CF1 is 5'-GACCTCTGCAGACTTCACTTCTAATGATGATTATGG-3'.

25 The repair model in Fig. 33 shows a portion of a target CFTR pre-mRNA consisting of exons 1-9, mini-intron 9, exon 10 containing the delta 508 mutation, mini-intron 10 and exons 11-24 (Fig. 33). The PTM shown in the figure consists of exon 1-10 coding sequences (containing codon 508) and a *trans*-splicing domain with its own splicing elements (donor site, branchpoint and pyrimidine tract)
30 and a binding domain. Several PTMs have been constructed with different binding

domains. Three examples are shown in Figure 34. In Fig. 34A the binding domain is complementary to the splice site of intron 9 and part of exon 10 (3' end; CF-PTM 11). In Fig. 34B the PTM has an extended binding domain which also covers the 5' end of exon 10 and the 3' splice site of intron 9 (CF-PTM 20). In the last example (Fig. 34C) the binding domain is the same as that shown in panel B except the binding domain extends the full-length of exon 10 (CF-PTM 30). In the latter case the PTM exon 10 has modified codon usage to reduce antisense effects with its own binding domain (Fig. 34). Further examples of binding domains are shown in Figure 35.

Figure 36 shows the sequence of *cis*- and *trans*-spliced products. The top panel of Fig. 36A shows target exon 10 with its three missing nucleotides (CTT), whilst the lower panel shows exon 10 and 11 of the target correctly spliced together. Figure 36B is a partial sequence of a single PCR product showing the modified codons in exon 10 of the PTM (upper panel), codon 508 in exon 10 of the PTM (middle panel), and PTM exon 10 correctly spliced to target exon 11 (lower panel), indicating that *trans*-splicing is accurate. The sequence of the repaired target was generated by RT-PCR followed by PCR.

11. EXAMPLE: PTMs WITH A LONG BINDING DOMAIN,
WHICH MAY BE DISCONTINUOUS, HAVE
INCREASED *TRANS*-SPLICING EFFICIENCY
AND SPECIFICITY

11.1. MATERIALS AND METHODS

11.1.1. CELL CULTURE

Human embryonic kidney cells (293 or 293T) were from the University of North Carolina tissue culture facility at Chapel Hill (Chapel Hill, NC). Cells were maintained at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies, Bethesda, MD) supplemented with 10% v/v fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT). Cells were passaged every 2-3 days using 0.5% trypsin and re-plated at the desired density. Stable cells, expressing an endogenous mutant *lacZ* pre-mRNA (*lacZCF9*) were maintained in the presence of 0.5 mg/ml G418 (Calbiochem, San Diego, CA).

11.1.2. RECOMBINANT PLASMIDS

Targets: pc3.1lacZCF9, pc3.1lacZCF9m, and pc3.1lacZHCG1m. pc3.1lacZCF9 encodes for a normal *lacZ* pre-mRNA was constructed using *lacZ* coding sequences nucleotides 1-1788 as 5' exon, CFTR mini-intron 9 followed by *lacZ* coding sequences nucleotides 1789-3174 as 3' exon. This is similar to pc3.1lacZ-T2 construct but without stop codons in the *lacZ* 3' exon and has CFTR mini-intron 9 instead of β HCG6 intron 1 (Fig. 37A). CFTR mini-intron 9 was PCR amplified using plasmid T5 as template and primers CFIN-9F (5'-CTAGGATCCCGTTCCTTTGTTCTTCACT ATTAA) and CFIN-9R (5'-CTAGGGTTACCGAAGTAAAACCATACTTATTAG, restriction sites underlined), digested with *Bam*HI and *Bst*EII and cloned in place of BHCG6 intron 1 of pc3.1lacZ-T2 plasmid. pc3.1lacZCF9m expresses a defective *lacZ* pre-mRNA and is identical to pc3.1lacZCF9 but contains two in-frame non-sense codons in the 3' exon (Fig. 37A). pc3.1lacZHCG1m is a chimeric target, which includes the *lacZ* 5' exon followed by intron 1 and exon 2 of β HCG6. This is similar to pc3.1lacZCF9m except that it contains exon 2 of β HCG6 in place of mutant *lacZ* 3' exon. β HCG6 exon 2 was PCR amplified using β HCG6 plasmid (accession # X00266) as template DNA and primers HCGEx-2F (5'-GCATGGTTACCTGCAGGGGCTGCTGCTGTGCTG) and HCGEx-2R (5'-CTGAAAGCTTGTTAACCAGCTCACCATGGTGGGGCAG, restriction sites underlined) digested with *Bst*EII and *Hind*III and cloned in place of the *lacZ* 3' exon of pc3.1lacZCF9m. Plasmid pcDNA3.1/HisB/*lacZ* (Invitrogen, Carlsbad, CA) was used as DNA template to produce 5' and 3' *lacZ* exons. The *lacZ* 5' exon is 1788 bp long, has an ATG initiation codon, *lacZ* 3' exon (without stop codons) is 1385 bp long and has a transcription termination signal at the end of the 3' exon. CFTR mini-intron 9 and β HCG6 intron 1 are 548 bp and 352 bp in size, respectively, and both have 5' and 3' splice signals. Exon 2 of β HCG6 is 162 bp long and has a transcription termination signal at the end of the exon.

Pre-trans-splicing Molecules (PTMs): PTM-CF14 is an identical version of pcPTM1 with minor modifications in the *trans*-splicing domain (Fig. 37B). PTM-CF14 is a linear version and contains a 23 bp antisense binding domain (BD)

(5'-ACCCATCATTATTAGGTCATTAT) complementary to CFTR mini-intron 9, 18 bp spacer, a canonical branch point sequence (UACUAAC; BP) and an extended polypyrimidine tract (PPT) followed by normal *lacZ* 3' exon. PTM-CF22, PTM-CF24, PTM-CF26 and PTM-CF27 are identical to PTM-CF14 except they differ in length of the BD (Fig. 37B). sPTM-CF18 has a 32 bp BD, sPTM-CF22 and sPTM-CF24 contain the same BD as PTM-CF22 and PTM-CF24, respectively. In these PTMs, the binding domains were modified to create intra-molecular stem-loop structure ("safety") to mask the 3' splice-site of the PTM. Different binding domains were produced by PCR amplification using specific primers (with unique *Nhe* I and *Sac* II sites) and a plasmid containing CFTR mini-intron 9 as template. PCR products were digested with *Nhe* I and *Sac* II and cloned into a PTM plasmid consisting of spacer sequences, 3' splice elements (BP, PPT and acceptor AG dinucleotide) followed by a normal *lacZ* 3' exon.

11.1.3. TRANSFECTION OF PLASMID DNAs INTO 293T CELLS

The day before transfection, 1×10^6 293T cells were plated on 60 mm plates coated with Poly-D-lysine (Sigma, St. Louis, MO) to enhance the adherence of cells and grown for 24 hr at 37°C. Cells were transfected with expression plasmids using LipofectaminePlus reagent according to standard protocols (Life Technologies, Bethesda, MD). In a typical co-transfection, 2 µg of pc3.1lacZCF9m target and 1.5 µg of PTM expression plasmids were transfected into cells and for controls (target and PTM alone transfections) total DNA concentration was normalized to 3.5 µg with pcDNA3.1 vector.

Forty-eight hours after transfection the plates were rinsed with PBS, cells harvested and total RNA or DNA was isolated using MasterPure RNA/DNA purification kit (Epicenter Technologies, Madison, WI). Contaminating DNA in the RNA preparation was removed by treating with DNase I, while, contaminating RNA in the DNA preparation was removed by digesting with RNase A at 37°C for 30-45 min.

11.1.4. REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR)

RT-PCR was performed as suggested by manufacturer using an EZ *rTth* RNA PCR kit (Perkins-Elmer, Foster City, CA). A typical reaction (50 μ l) contained 25-500 ng of total RNA, 100 ng of 5' target specific primer (common to *cis*- and *trans*-spliced products) (Lac-9F, 5'-GATCAAATCTGTGATCCITCC) and 100 ng of 3' primer (Lac-3R, 5'-CTGATCCACCCAGTCCCATTA, target specific primer for *cis*-splicing, and Lac-5R, 5'-GACTGATCCACCCAGTCCCAAGA, PTM specific primer for *trans*-splicing), 1X reverse transcription buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 900 mM KCL with 1 mM MnCl₂), 200 μ M dNTPs and 10 units of *rTth* DNA polymerase. RT reactions were performed at 60°C for 45 min. followed by 30 sec pre-heating at 94°C and 25-35 cycles of PCR amplification at 94°C for 18 sec, annealing and extension at 60°C for 1 min followed by a final extension at 70°C for 7 min. The reaction products were analyzed by agarose gel electrophoresis.

11.1.5. PROTEIN PREPARATION AND β -GAL ASSAY

Total cellular protein from cells transfected with expression plasmids was isolated by freeze thaw method and assayed for β -galactosidase activity using a β -gal assay kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Protein concentration was measured by the dye-binding assay using Bio-Rad protein assay reagents (BIO-RAD, Hercules, CA).

11.1.6. WESTERN BLOT

About 5-25 μ g of total protein was electrophoresed on a 7.5% SDS-PAGE gel and electroblotted onto PVDF-P membrane (Millipore). After blocking for 1 hr at room temperature (blocking buffer: 5% dry milk and 0.1% Tween-20 in 1X PBS), the blot was incubated with a 1:2500 dilution of polyclonal rabbit anti- β -galactosidase antibody for 1 hr at room temperature (Research Diagnostics Inc. NJ), washed 3x with blocking buffer and then incubated with a 1:5000 diluted anti-rabbit HRP conjugated secondary antibody. After incubating at room temperature for 1 hr,

it was washed 3x in blocking buffer and developed using ECLPlus Western blotting reagents (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

11.1.7. *IN SITU* β -GAL STAINING

Cells were monitored for the expression of functional β -galactosidase using a β -gal staining kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). The percentage of β -gal positive cells were determined by counting stained vs. unstained cells in 5-10 randomly selected fields.

11.1.8. SELECTION OF NEOMYCIN RESISTANT CLONES EXPRESSING AN ENDOGENOUS DEFECTIVE *lacZ* PRE-mRNA TARGET

On day 1, 1×10^6 293 cells were plated on 60 mm plates and grown for 24 hr at 37°C. On day 2, the cells were transfected with 2 μ g of pc3.1lacZCF9m using LipofectaminePlus transfection reagent as described above. 48 hr post-transfection, cells were split (1:20 ratio) and grown in media containing 0.5 mg/ml G418. At the end of 2 weeks, neomycin resistant colonies were selected, pooled, expanded and maintained constantly in the presence of G418.

11.2. RESULTS

A model system was developed that permits facile and versatile analysis of spliceosome mediated RNA *trans*-splicing in cells. The bacterial *lacZ* gene was split with a truncated intron 9 from the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) gene (Figure 37A). This split *lacZ* gene, when introduced into human 293T cells, directed the synthesis of a *lacZ* pre-mRNA that could splice properly. The open reading frame of the *lacZ* gene was mutated by insertion of two in-frame nonsense codons near the 5' end of the second exon (Figure 37A). This *lacZ* gene is referred to as lacZCF9m. In 293T cells, lacZCF9m directs the synthesis of lacZCF9m pre-mRNA, which encodes a truncated β -galactosidase (β -gal) protein that does not have enzymatic activity. Cells bearing the lacZCF9m gene are a model system for genetic disorders caused by loss of function mutations.

Pre-*trans*-splicing molecules (PTMs) were designed to *trans*-splice with lacZCF9m pre-mRNA and repair the mutation caused by the two nonsense codons. PTMs were constructed with binding domains spanning 23, 91 and 153 nucleotides (nt), which we named PTM-CF14, PTM-CF22 and PTM-CF24 (Figure 5 37B). The PTM-CF24 binding domain does not bind 153 contiguous nt in the targeted CFTR gene intron 9, but rather creates a loop of 47 nt in the target in between two regions of complementarity of 27 and 126 nt (Figure 37B). These PTMs were predicted to repair the deficiency created by lacZCF9m (Figure 37C).

Semi-quantitative RT-PCR analysis was used to test the efficiency of *trans*-splicing mediated by PTMs with long target binding domains. Repair of lacZCF9m transcripts by *trans*-splicing was tested in two different ways: co-transfection of PTM and target (lacZCF9m) plasmids or transfection of cells that had been modified to express the target as an endogenous pre-mRNA. Co-transfecting plasmids encoding PTMs with the lacZCF9m plasmid provided a facile method for screening the former for efficiency. PTM-CF22 and PTM-CF24 were approximately 15 3-fold and 10-fold more efficient than PTM-CF14 in a semi-quantitative RT-PCR assay suggesting a significant improvement in mRNA repair (Figure 38). Sequencing of the RT-PCR products showed that *trans*-splicing was accurate, resulting in proper ligation of the exons from the target and the PTM. Moreover, mutation of key *cis*-acting elements in the 3' splice site of the PTMs resulted in an abrogation of *trans*-splicing. In these and all other assays described herein controls were carried out to rule out recombination at the DNA level. Thus, repair of the lacZCF9m transcripts was a result of targeted RNA *trans*-splicing.

Transfection of PTM-CF14, -CF22 or -CF24 into 293 cells bearing an endogenous lacZCF9m gene confirmed that the longer target binding domains 25 provided the PTMs with higher efficiency (Figure 38B). It should be noted that similar levels of RT-PCR *trans*-splicing specific product were obtained after 30 PCR cycles and 35 cycles for PTM-CF24 and PTM-CF14, respectively. The data therefore suggests that PTMs with long binding domains repaired lacZCF9m transcripts at least 30 an order of magnitude better than previously described PTMs.

More than one in ten transcripts of lacZCF9m can be repaired by *trans*-splicing. Quantitative, real-time PCR was used to measure the fraction of lacZCF9m transcripts repaired by PTMs with long binding domains. The co-transfection assay described above was used in these experiments. PTM-CF14, which contains a
5 binding domain of 23 nt, was shown to repair between 1.2 and 1.6% of lacZCF9m RNAs in 293T cells and 2.1% of lacZCF9m RNAs in the H1299 human lung cancer cells. PTM-CF24, which has a 153 nt long binding domain, was significantly more efficient, correcting between 12.1 and 15.2% of lacZCF9m RNAs in 293T cells and 19.7% in H1299 cells. This in effect resulted in a measurable reduction in the levels
10 of lacZCF9m mRNA. These data also confirmed the remarkable capability of this RT-PCR assay to distinguish between the products of *cis*-splicing, the lacZCF9m and mRNA, and the products of *trans*-splicing, repaired lacZCF9m mRNA. This is the first true quantification of the efficacy of *trans*-splicing mediated mRNA repair at the RNA level. These data confirm the suggestions of the semi-quantitative RT-PCR
15 analysis shown above. Similar experiments were carried out using 293 cells that express an endogenous lacZCF9m pre-mRNA target. Consistent with the data shown above, PTM-CF24 was ten times more efficient than PTM-CF14, with the former correcting between 1.3 and 4.1% of endogenous lacZCF9m transcripts. These data confirmed that increasing the length of the PTMs provided a remarkable enhancement
20 in *trans*-splicing efficiency.

Trans-splicing mediated mRNA repair results in the synthesis of active β -galactosidase. At the cellular level, the ultimate criterion for the success of mRNA repair is the production of an active protein. Using a western assay it was determined that full-length β -gal was produced as a result of *trans*-splicing. Full-length β -gal
25 was not observed following transfection of 293T cells with plasmids encoding lacZCF9m or PTM-CF24. Co-transfection of both plasmids, however, resulted in robust production of full-length β -gal protein, which was readily detectable using anti- β -gal antiserum (Figure 39). This result complements enzymatic activity data suggests that the latter was not due to a complementation by truncated β -gal proteins.
30 The Western blot analysis revealed that full-length β -gal protein was made in 293T

cells by *trans*-splicing and furthermore confirmed that the PTMs with long binding domains were efficiently spliced.

Appropriate repair of β -gal mRNA and synthesis of full-length β -gal protein should lead to the production of active enzyme. Indeed, 293T cells co-transfected with lacZCF9m and PTM-CF24 were shown to have β -gal activity measured either *in situ* (Figure 40A) or in extracts (Figure 40B). This activity was shown to depend on the *trans*-splicing between the target pre-mRNA and the PTM. The quantitative in solution assay further confirmed the data presented above: PTM-CF22 and PTM-CF24 were 2.9 and 9.3 fold more efficient respectively than PTM-CF14. Most impressive, however, were results using 293 cells that harbor lacZCF9m as a stable endogenous gene. When these cells were transfected with PTM-CF14 the levels of β -gal activity obtained were barely above background. Transfection with PTM-CF24, however, resulted in a considerable level of β -gal activity (Figure 40C). This was paralleled by the appearance of full-length β -gal protein. These data demonstrate a sizeable increase in the efficiency of *trans*-splicing to repair a mutated pre-mRNA. In fact all prior reports of repair of endogenous RNA in mammalian cells by either group I ribozymes or *trans*-splicing have been only documented using RT-PCR, an indication of the low level of repair.

PTMs with very long binding domains are highly specific. It was shown that a secondary structure within the binding domain could enhance specificity of PTMs in HeLa nuclear extracts. In order to ascertain the specificity of the *trans*-splicing reactions *in vivo* a second target gene was prepared, which could serve as reporter of non-specific reactions. This gene, which is referred to as lacZHCG1m, shares the first exon with lacZCF9m. The intron in lacZHCG1m is intron 1 of the β -subunit of the human chorionic gonadotropin gene 6 (hCG6) and the second exon is exon 2 of the same gene. lacZHCG1m drives the synthesis of a pre-mRNA that is spliced correctly to yield a chimeric mRNA that does not encode a full-length β -gal (see below). PTM-CF14, -CF22 and -CF24 are not targeted to lacZHCG1m pre-mRNA since there is no complementarity between the binding domains in these PTMs and the target gene. Any *trans*-splicing between these PTMs and lacZHCG1m pre-mRNA is therefore non-specific (Figure 41A).

293T cells were transfected with PTM-CF14, -CF22 or -CF24 and the level of non-specific *trans*-splicing was determined by RT-PCR and by in solution β -gal assays. Semi-quantitative RT-PCR suggested that PTM-CF24 was significantly less likely than PTM-CF14 to *trans*-splice with lacZHCg1m pre-mRNA.

5 Measurement of β -gal activity confirmed this; cells co-transfected with lacZHCg1m and PTM-CF24 produced 3.7 fold less β -gal than those co-transfected with lacZHCg1m and PTM-CF14 (Figure 41C). Based on these data it was estimated that PTM-CF24 is 50 times more likely to *trans*-splice to its target than to a non-specific target. A "safety" version of PTM-CF24, sPTM-CF24, did not confer further

10 specificity (Figure 41C). Nonetheless, for PTMs with shorter binding domains a "safety" stem involving the binding domain was seen to improve specificity *in vivo* (Figure 41C). It was concluded from these data that the longer binding domains resulted in PTMs that were not only more efficient but also more specific.

The observation that long binding domains increased the specificity of

15 PTMs suggested that very long binding domains (>200 nt) could further enhance discrimination. Plasmids encoding PTM-CF26 and -CF27, which have binding domains that span 200 nt and 411 nt respectively, were constructed and co-transfected with lacZHCg1m plasmid. Non-specific *trans*-splicing of these two PTMs was barely detectable with RT-PCR (Figure 41B). As measured by the β -gal assay PTM-

20 CF26 and -CF27 had minimal non-specific *trans*-splicing activity (Figure 41C). In a specific *trans*-splicing reaction with lacZCF9m as measured by the solution β -gal assay PTM-CF26 was as active as PTM-CF14 (Figure 41B). It was estimated that PTM-CF26 is 80 times more likely to *trans*-splice to the specific target (lacZCF9m) than to a non-specific target (lacZHCg1m). Therefore, inclusion of very long binding

25 domains confers to these PTMs very high specificity.

12. EXAMPLE: CORRECTION OF THE FACTOR VIII GENE USING 3' EXON REPLACEMENT

Hemophilia is a bleeding disorder caused by a deficiency in one of the blood clotting factors. Hemophilia A, which accounts for about 80 percent of all

30 cases is a deficiency in clotting factor VIII. The following section describes the

successful repair of the clotting factor VIII gene using spliceosome mediated *trans*-splicing and demonstrates the feasibility of repairing the factor VIII using gene therapy.

The coding region for mouse factor VIII PTM (exons 16-24) was PCR amplified from a cDNA plasmid template using primers that included unique restriction sites for directed cloning. All PCR products were generated with cloned Pfu DNA Polymerase (Stratagene, La Jolla, CA). The coding sequence was cloned into pc3.1DNA(-) using EcoRV and PmeI restriction sites. The binding domain (BD) was created by PCR using genomic DNA as a template. Primers included unique restriction sites for directed cloning. The PCR product was cloned into an existing PTM plasmid (PTM-CF24, pc3.1DNA) using NheI and SacII restriction sites. This plasmid already contained the remaining elements of the TSD including a spacer sequence, polypyrimidine tract (PPT), branchpoint (BP) and 3' acceptor site. The whole of the TSD was then subcloned into the vector (described above) containing the factor VIII PTM coding sequences. Finally, bovine growth hormone 3' untranslated sequences from a separate plasmid clone were subcloned into the above PTM using PmeI and BamHI restriction sites.

The whole construct was sequenced and then analyzed by RT-PCR for possible cryptic splicing, and then subcloned into the AAV plasmid pDLZ20-M2 using XhoI and BamHI restriction sites (Chao et al., 2000, *Gene Therapy* 95:1594-1599; Flotte and Carter, 1998, *Methods Enzymol.*, 292:717-32). For some viral (and non-viral) delivery systems, the size of the therapeutic is essential. Viral vectors such as adeno-associated virus are preferred because they are a (i) non-pathogenic virus with a broad host range (ii) it induces a low inflammatory response when compared to adenovirus vectors and (iii) it has the ability to infect both dividing and non-dividing cells. However, the packaging capacity of the rAAV is limited to approximately 110% of the size of the wild type genome, or ~4.9 kB, thus, leaving little room for large regulatory elements such as promoters and enhancers. The B-domain deleted human factor VIII is close to the packaging size of AAV, thus, *trans*-splicing offers the possibility of delivering a smaller transgene while permitting the addition of regulatory elements.

To eliminate cryptic donor sites in the pre-mRNA upstream of the *XhoI* PTM cloning site approximately 170 bp of sequence was eliminated from the original AAV construct that includes part of exon 1 and all of the intron 1 sequence (see Fig. 44C).

5 The repair model in Fig. 44D shows a simplified model of the mouse factor VIII pre-mRNA target (endogenous gene) consisting of exons 1-14, intron 14, exon 15, intron 16, and exon 16-24 containing a neomycin gene insertion. The PTM shown in the figure consists of exon 16-24 coding sequences and a trans-splicing domain with its own splicing elements (donor site, branchpoint and pyrimidine tract) and a binding domain. Details of the binding domain are shown in Fig. 44A and 44B. The binding domain is complementary to the splice site of intron 15 and part of exon 16 (5' end).

10 The key advantages of using 3' exon replacement for gene repair are (i) the construct requires less sequence and space than a full length gene construct, thereby leaving more space for regulatory elements, (ii) SMaRT repair should only occur in those cells that express the target gene, therefore eliminating any potential problems associated with ectopic expression of repaired RNA.

Factor VIII deficient mice were maintained at the animal facilities at the University of North Carolina at Chapel Hill. For plasmid injections each mouse was sedated and placed under a dissecting microscope and a 1 cm vertical midline abdomen incision was made. Approximately 100 micrograms of PTM plasmid DNA in phosphate buffered saline was injected to liver portal vein. Blood was collected from the retro-orbital plexus at intervals of 1, 2, 3 and 20 days after injection and assayed for factor VIII activity using the Coatest assay.

25 Factor VIII activity in blood samples collected from mice were assayed using a standard test called the Coatest assay. The assay was performed according to manufacturer's instructions (Chromagenix AB, Milan, Italy). Data indicating repair of factor VIII in factor VIII knock out mice is demonstrated in Figure 46.

30 Hemophilia A defects in humans are broadly split into several categories that include gross DNA rearrangements, single DNA base substitutions, deletions and insertions. It has been determined that a rearrangement of DNA

involving an inversion and translocation of exons 1-22 (together with introns) away from exons 23-26 is responsible for ~40% of all cases of severe hemophilia A. The canine hemophilia A model also has a very similar gross rearrangement. This mutation will be used as the basis for our human and canine factor VIII PTM designs.

5 Methods for building the human factor VIII PTM will be very similar to that described above for the mouse PTM except that different coding regions (exons 23-26) will be amplified from a human cDNA, the binding domain will be amplified from human genomic sequence templates (whole genomic DNA or a genomic clone), and a C-terminal FLAG tag will be engineered in the PTM to be used
10 to detect repaired factor VIII protein. The remaining elements of the trans-splicing domain including a spacer sequence, polypyrimidine tract (PPT), branchpoint (BP) and 3' acceptor site will be obtained from an existing plasmid. Where necessary changes will be made to the binding domain sequence to eliminate any cryptic splicing within the PTM. The final PTM will be subcloned into the same mouse AAV
15 plasmid vector, pDLZ20-M2 and virus preparation made from this plasmid. The canine factor VIII PTM will be made in an identical fashion but using canine cDNA and genomic plasmid.

13. EXAMPLE: TARGETED *TRANS*-SPLICING OF PAPILLOMAVIRAL RNA

20 The vast majority of cervical cancers are associated with oncogenic human papilloma viruses (HPVs) and express viral mRNAs encoding the E6 and E7 oncoproteins. As described below, PTMs targeted against the E6 region of HPV-16 and splice the TM exon to the 5' end of the E6 ORF using the 5' splice site at the nucleotide 226.

25 13.1 MATERIALS AND METHODS

 The target DNA (p1059) was used to test PTM efficiency and contains the entire HPV-16 early region (nt 79-4468) cloned behind the SV40 early promoter and origin of replication. Specificity was assessed using the heterologous expression vector lacZCF9m as target (Puttaraju *et al.* 2001, Mol Ther 4:105-14). Plasmids were
30 prepared using Qiagen maxi prep kits.

Nearly confluent 6 cm plates of 293 cells were transfected with 2 µg target DNA and 2 µg PTM DNA using LipofectAmine 2000 (Life Technologies). At two days post-transfection, cells were washed on the plate with PBS and lysed on the plate using 300 µl lysis buffer. Total cell RNA was prepared using Ambion

- 5 RNAqueous kit. Transfected DNA was removed from the RNA by LiCl precipitation followed by DNase I treatment using the Ambion DNA-free™ DNase treatment and removal reagents.

RNA was converted to cDNA using RT from the High Capacity cDNA Archive Kit (PE Applied Biosystems) as directed by the manufacturer with the

- 10 following modifications: the amount of random primer was cut in half and 5 µl of a 50 µM stock of oligo(dT16) and 5 µl of a 20 unites/µl stock of RNAse inhibitor were added per 100 µl reaction. RT reactions were diluted to 50 ng/µl and 5 ng/µl (based on original RNA content) for real time Quantitative PCR (QPCR) analysis. Amounts of specific cis and trans spliced mRNAs were quantitated using Real Time
- 15 Quantitative PCR. These assays are referred to as Real Time QRT-PCR. These reactions were carried out on the Bio-Rad iCycler iQ Real Time PCR instrument using the SYBR Green kit from PE Applied Biosystems essentially as described previously (Puttaraju *et al.* 2001 Mol Ther 4:105-14.).

- 20 Total HPV-16 RNA levels (cis and trans-spliced) were assessed using a common amplicon in E6 exon 1 (HPV-16 nt 152-204; 53 bp). This assay uses the HPV-16 primers oJMD-15 (ACAGAGCTGCAAACAATAT) and oJMD-16 (TTGCAGTACACATTCTAA). The amount of RT reaction used for each PCR reaction was 5 ng. Trans-splicing from the HPV-16 nt 226 5' splice site to the PTM lacZ exon was assessed using a 53 bp chimeric amplicon. This assay uses the HPV-
- 25 16 senser primer oCCB-348 (GCAAGCAACAGTTACTGCGA; HPV-16 nt 201-220) and the lacZ antisense primer oCCB-322 (ATCCACCCAGTCCCAGA). The amount of RT reaction used for each PCR reaction was 50 ng. Both assays used the same plasmid (p3671) to generate standard curves for quantitation. Trans-splicing from the HPV-16 nt 880 5' splice site to the PTM lacZ exon was assessed using a 50 bp
- 30 chimeric amplicon. This assay uses the HPV-16 sense primer oCCB-366 (ATCTACCATGGCTGATCCTG; HPV-16 nt 858-877) and the lacZ antisense

primer oCCB-322. The amount of RT reaction used for each PCR reaction was 50 ng. The plasmid p3672 was used to generate the standard curve for this assay.

Plasmids used as standards for real time QPCR were cloned as follows.

An RT reaction from cotransfections of p1059 and HPV-PTM1 in 293T cells was

- 5 used as template for PCR reactions. Primers oCCB-257 (HPV-16 nt 127-147; ACCCAGAAAGTTACCACAGTT) and oCCB-322 gave a 127 bp band which was TOPO-cloned into pCRII-TOPO (Invitrogen) to give p3671. Sequencing showed that this DNA corresponds to trans-splicing from HPV-16 nt 226 into the 3' splice site of the PTM. Primers oJMD-17 (HPV-16 nt 689-708;
- 10 GACAAGCAGAACCGGACAGA) and oCCB-322 gave a 219 bp band which was TOPO-cloned into pCRII-TOPO to give p3672. Sequencing showed that this DNA corresponds to trans-splicing from HPV-16 nt 880 into the 3' splice site of the PTM. Plasmids stocks (1 ng/ μ l) were quantitated using PicoGreen (Molecular Probes) prior to use for standard curves.

- 15 Quantitation of *cis*- and *trans*-splicing for the cotransfections with PTMs and the target lacZCF9m were done exactly as described previously (Puttaraju *et al.* 2001. Mol. Ther. 4:105-14). The amount of RT reaction used for each PCR reaction was 5 ng.

13.2 RESULTS

- 20 HPV and CF PTMs were cotransfected into 293 cells with either the HPV-16 expression vector p1059 to assess *trans*-splicing efficiency or with lacZCF9m (containing a CF intron) to assess *trans*-splicing specificity. Real Time QRT-PCR assays were done as described above to assess levels of *trans*-splicing relative to *cis*-splicing of each target. The results are shown in Table 1. All RNA
- 25 levels are expressed as fg of the DNA standard. The standards p3671 and p3672 are close to the same size so these values can be used to represent relative RNA levels for each assays. HPV-PTM1, 2, 5, and 6 efficiently trans-spliced to the HPV-16 nt 226 5' splice site. Up to 70% trans-splicing was seen for the HPV-PTM1. As expected, HPV-PTM5 *trans*-splicing was abolished by mutations in the branch point and
- 30 polypyrimidine tracts of the PTM. These PTMs showed less than 1% trans-splicing to

the nt 880 5' splice site. This data is consistent with the design of these PTMs which have binding domains complementary to the nucleotide 409 and 526 3' splice sites. HPV-PTM-8 and HPV-PTM-9 *trans* binding domains downstream of the nt 880 5' splice site and show efficient *trans*-splicing to this 5' splice site (37% for HPV-PTM8 and 22% for HPV-PTM9) and somewhat less efficient *trans*-splicing to the nt 226 5' splice site. HPV-PTM9 may interfere sterically with binding of splicing factors to the nt 880 5' splice site. The specificity of HPV-PTM1, 2, 5 and 6 was also assessed by their ability to trans-splice to a target pre-mRNA with a CF intron. Specificity ranged from 274 to 606 fold.

WO 02/053581

PCT/US02/00416

83

MSP Co-transfection 8/2/01

293 cells

Target: p3514 (LacZCF9m) (all cells have target)

6 cm plates; Lipofectamine 2000; 2 ug target and 2 ug PTM

p3517 for cis splicing standard curve

p3519 for trans-splicing standard curve

Specificity Assay

Std curve: p3517 324/323 327/322 p3519
Primers: 1a cis 1a trans

Sample#	Transfection #/PTM	1a cis	1a trans	%Trans
1 #1A HPV-PTM1		1,200.00	1.44	0.1%
2 #1B HPV-PTM1		1,380.00	3.80	0.3%
3 #2A HPV-PTM2		2,640.00	4.10	0.1%
4 #2B HPV-PTM2		2,080.00	3.17	0.2%
5 #3A HPV-PTM5		1,620.00	1.85	0.1%
6 #3B HPV-PTM5		1,790.00	1.82	0.1%
7 #4A HPV-PTM6		1,720.00	0.69	0.1%
8 #4B HPV-PTM6		1,720.00	2.05	0.1%
9 #5A HPV-PTM8		2,570.00	5.06	0.2%
10 #5B HPV-PTM8		1,800.00	3.46	0.2%
11 #6A HPV-PTM9		2,300.00	2.29	0.1%
12 #6B HPV-PTM9		2,690.00	2.74	0.1%
13 #7A CF14		1,350.00	22.20	1.6%
14 #7B CF14		1,320.00	21.50	1.6%
15 #8A CF24		1,520.00	93.90	5.8%
16 #8B CF24		1,500.00	72.00	4.6%
17 #9A CF27 (OK by PCR)		1,410.00	3.83	0.3%
18 #9B CF27 (OK by PCR)		1,370.00	4.53	0.3%
21 #11A pCDNA3.1		1,520.00	0.04	0.0%
22 #11B pCDNA3.1		1,370.00	0.07	0.0%
23 p3517 (10 pg)		0.00	0.17	
24 p3519 (10 pg)		0.00	0.17	

Note: the identity of the CF PTMs was rechecked by PCR of both the plasmids and the RNA samples (before DNase treatment) and are OK.

14. EXAMPLE: DESIGN OF TARGETED PAPILLOMA VIRUS PTMs

Initial pre-therapeutic RNA molecules ("PTMs") are developed based on the abundance and splicing patterns of HPV mRNA. The transcription map of HPV-16 in benign infections is shown in Figure 48. *Cis* and *trans* splicing assays are performed on the initial PTMs and the data obtained from the assays is used to create specific PTMs with optimized efficacy in spliceosome-mediated RNA *trans*-splicing reactions.

The most effective PTM is one that *trans*-splices an HPV target transcript with a PTM encoding a toxic product which will kill the infected cell. In targeting the most frequently used HPV splice sites, two viable 5' splice site targets and two viable 3' splice site targets can be used. Less frequently used splice sites can also make good targets if the PTM is designed to block the more frequently used site. Choice of target splice sites is further restricted if the intention is to treat cancers, since integration of HPV-16 in many cervical cancers leads to expression of only the E6 and E7 regions in these cancers.

The following target splice sites are used in the development of the initial PTMs which leads to the expression of a toxic product:

i) 5' splice site targets:

- nt 226: This splice site is used in the synthesis of all E6* species. In most tumors and cell lines, the vast majority of P97 promoter transcripts will be spliced using this 5' splice site.
- nt 880: This splice site is used in the synthesis of all E6US (unspliced) and E6* species except E6*III, both splice sites are good targets in both productive infections and cancers; and

ii) 3' splice site targets:

- nt 409: This 3' splice site is used in the splicing of E6*I species which are generally more abundant than E6*II species. This splice site is used in cancers and productive HPV infection.

—nt 3358: This target is used for splicing of most mRNAs, but only if the viral DNA is extrachromosomal. This splice site is not a good target for the treatment of most cancers.

In addition, a double *trans*-splicing PTM is developed to replace the internal exons nt 409-880 or nt 526-880 in productively infected tissue and in cancers.

Alternatively, initial PTMs are designed in which *trans*-splicing produces an mRNA encoding a fusion protein that is part viral and part exogenous peptide encoded by the PTM. The fusion protein will change the function of the viral protein so that it inhibits an essential viral function. The splice sites listed above are targeted to produce three viral fusion proteins:

- (i) The E6 N terminus, using the nt 226 5' splice site as the target;
- (ii) The E6 C terminus, using the nt 409 (best) or nt 526 3' splice sites as the targets; and
- (iii) The E2 C terminus, using the nt 3358 3' splice site as target.

This fusion protein is produced in productive infections and cancers containing extrachromosomal viral DNA. The C terminal domain of E2 is the DNA binding and dimerization domain, and can be used to target a fusion protein to the P97 promoter and block transcription. At high concentrations, the E2 viral protein binds just upstream of the P97 promoter and inhibits transcription by competing with the transcription factors, SP1 and TFIIID, for binding. However, these E2 binding sites are weaker than those upstream in the Long Control Region (LCR) and are only saturated at high concentrations of the viral E2 protein. At low concentrations of E2, the protein binds to the E2 binding sites in the upstream LCR and activates transcription. Thus, a "repressor" domain can be added to the fusion protein resulting in a block of transcription through binding to any E2 binding site. This fusion protein is also useful to block viral DNA replication, since an E1/E2 complex binds the origin of replication. It has been demonstrated, however, that a complex of the E2 DNA binding domain and E1 does not bind to the origin. Since E2 is a dimer, heterodimerization of the E2 fusion protein with full length E2 protein would probably eliminate E2 function in DNA replication.

PTM(s) based on their ability to target and *trans*-splice to the HPV target splice sites depicted in Figure 48 listed above are constructed and screened such that splicing results in the expression of diphtheria toxin sub unit A (DT-A) product, which will kill the infected cells or express a marker gene which can be easily detected. Other peptide or protein toxins may also be encoded. A typical prototype PTM (3' *trans*-splicing) consists of an antisense target binding domain (25 or more) complementary to HPV sequences, spacer sequence, canonical branchpoint sequence (UACUAAAC), an extensive polypyrimidine tract (12-15 U's), AG dinucleotide of the 3' splice site followed by the delivered gene. PTMs are also constructed to carry out PTM-mediated trans-splicing with HPV 3' splice sites (Fig. 66B). The *trans*-splicing domain (TSD) of the PTMs are constructed in modular fashion. Unique restriction sites are incorporated between each of the PTM elements, facilitating the replacement of individual elements. Schematic diagrams of 3' exon replacement and 5' exon replacement models are shown (Figure 66A-B), respectively. It has previously been demonstrated that both efficiency and specificity of *trans*-splicing can be modulated substantially by altering several sequences in the TSD, including, the length of the binding domain, spacer sequences, strength of the PPT etc.

"Linear" PTMs are designed initially to maximize the *trans*-splicing efficiency, thereby identifying the PTM sequences that provide highest *trans*-splicing efficiency. Linear PTMs refer to the binding domain in the PTM as single stranded in configuration. To achieve a higher degree of targeting specificity, another form of TSD referred to as a "safety stem" can be constructed. In these PTMs, the splice site of the PTM is protected from reacting with other pre-mRNA targets by binding to itself in a folded structure. Contact with the specific target promotes unwinding of the safety stem exposing and activating the PTM's 3' splice site for spliceosome formation.

To further enhance the *trans*-splicing specificity, a PTM that requires two *trans*-splicing events to produce the expected therapeutic effect is also constructed (Fig. 65). This PTM will have an upstream 3' splice site that will *trans*-splice into an HPV 5' splice site, producing a singularly *trans*-spliced product. This product does not contain the required polyadenylation signals and would be inactive

due to failure in nucleocytoplasmic transport and translation of the mRNA. A second *trans*-splicing event with a HPV 3' splice site is necessary to provide the PTM with the signals required for polyadenylation (Fig. 65). Polyadenylation is necessary for PTMs with linear binding domains in which both 3' and 5' binding domains are linear, or with 3' safety + 5' linear binding domains, are also designed for inhibition of viral expression. In addition, PTMs are designed as "double safety" PTMs with both 3' and 5' safety splice sites or 3' linear or 5' safety sites.

Testing of the PTMs is performed using *in vitro* splicing assays and cell culture-based assays. HPV-16-containing cell lines are used for testing the ability of PTMs to *trans*-splice. W12 cells (80263 cells) contain extrachromosomal HPV-16 DNA and express the full HPV-16 early region and can be used to test PTMs targeting. SiHa and CaSki cell lines contain integrated HPV-16 and express only the viral E6/E7/5'E1 regions. These cell lines are useful because they express viral pre-mRNAs characteristic of those expressed in cervical cancers. However, they may not be useful cell lines for testing a PTM targeting the nt 3358 3' splice site. CaSki cells express considerably higher levels of HPV-16 mRNAs than any of the other cell lines tested and therefore may be the best cells for assaying other PTMs.

Cell culture-based cotransfection experiments with a PTM expression vector and an HPV-16 early region expression vector are assayed for expression of the PTM. Several plasmids driving the expression of HPV-16 have been constructed. For example, two plasmids that can be used in co-transfection experiments include ones that express HPV-16 under the direction of either the SV40 early promoter (p1059) or the K14 promoter (p2571; pK14-1203).

Combined isoform-specific (i.e. splice-specific) primers with quantitative real time reverse transcription polymerase chain reaction (QRT/PCR) are used to assay for alternative splicing. This assay is very isoform specific, relatively insensitive to RNA degradation, sensitive to one molecule of cDNA, has a wide dynamic range (at least seven orders of magnitude), and gives absolute quantitation of each isoform. Primer pairs specific for each PTM/target pre-mRNA combination are used. The sequence specificity of the assay permits the monitoring of the specificity of the *trans*-splicing reactions. The sensitivity and quantitative nature of the assay as

well as the rapidity with which assays can be developed and performed is useful for the optimization of PTMs targeted against papillomaviral pre-mRNAs.

The specificity of PTM induced *trans*-splicing (i.e. to determine the specificity of targeted *trans*-splicing to HPV target pre-mRNA) is also evaluated by 5' and/or 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) according to standard procedures. This method is relatively fast compared to the conventional cDNA library construction, and gives complete sequences of 5' and/or 3' cDNA ends, so that the number of specific and non-specific splicing events can be determined. Initially, two cDNA libraries are constructed comprised of RNA isolated from cells co-transfected with a (i) linear PTM + HPV mini-gene target and (ii) safety PTM + HPV mini-gene target. For example, in order to identify the 5' ends of the *trans*-spliced RNAs (3' exon replacement), a 5' RACE assay is performed with a PTM antisense primer. Similarly, to identify the 3' ends of the *trans*-spliced RNAs (5' exon replacement), a 3' RACE assay is performed using a PTM sense primer. The cDNA is amplified by PCR, digested with restriction enzymes and cloned into a plasmid vector. The cDNA clones are initially screened by colony hybridization using a PTM specific probe. From each cDNA library, positive clones are selected and sequenced, and the sequence information is used to compare the specificity of linear vs. safety PTM. This permits identification of non-specific targets that *trans*-splice at high frequencies. Analysis of these targets provides useful information about the sequences that are responsible for non-specific *trans*-splicing and helps in the construction of specific PTMs.

The *trans*-splicing efficiency and specificity data obtained from the analysis of the initial candidate PTMs in *trans*-splicing assays is used to formulate and develop PTMs with optimal *trans*-splicing capabilities. The optimal PTMs are analyzed using the *trans*-splicing assays described above.

A mouse model for papillomavirus infections using an organotypic "raft/xenograft" technique. Papillomaviruses are generally species and cell type specific. Productive infections have been established in nude mice using bovine keratinocytes and bovine papillomaviruses. In this system, keratinocytes are initially plated onto a collagen "raft" containing fibroblasts and allowed to grow to confluence

in tissue culture. The keratinocytes are then infected or transfected with papillomavirus or viral genomic DNA, respectively, and allowed to grow in culture for a few days. These rafts are then grafted onto the backs of nude mice where they develop into productively infected bovine tissue. Human papillomavirus infections
5 can be established using the same techniques combined with human papillomaviruses and keratinocytes. This system is useful for testing the *in vivo* efficacy of anti-papillomavirus PTMs. In addition, grafting of cervical carcinoma tissue or cervical cancer cell lines onto nude mice is used. In addition, testing can be done using several animal models including bovine papillomavirus (BPV-1), Canine oral
10 papillomavirus (COPV), and Cottontail rabbit papillomavirus (CRPV). COPV, in particular, has served as a good model for vaccine development.

The present invention is not to be limited in scope by the specific embodiments described herein. Indeed, various modifications of the invention in addition to those described herein will become apparent to those skilled in the art
15 from the foregoing description and accompanying Figures. Such modifications are intended to fall within the scope of the appended claims. Various references are cited herein, the disclosure of which are incorporated by reference in their entireties.

WE CLAIM:

1. A cell comprising a nucleic acid molecule wherein said nucleic acid molecule comprises:
 - a) one or more target binding domains wherein said target binding domain is between 10 and 600 nucleotides in length and that target binding of the nucleic acid molecule to a target pre-mRNA expressed within a cell;
 - b) a 3' splice region comprising a branchpoint, a pyrimidine tract and a 3' splice acceptor site;
 - c) a spacer region that separates the 3' splice region from the target binding domain; and
 - d) nucleotide sequence to be trans-spliced to the target pre-mRNA; wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.
2. A cell comprising a nucleic acid molecule wherein said nucleic acid molecule comprises:
 - a) one or more target binding domains wherein said target binding domain is between 10 and 600 nucleotides in length and that target binding of the nucleic acid molecule to a target pre-mRNA expressed within a cell

WO 02/053581

91

PCT/US02/00416

- b) a 5' splice site;
- c) a spacer region that separates the 5' splice site from the target binding domain; and
- d) a nucleotide sequence to be trans-spliced to the target pre-mRNA;

wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.

- 3. The cell of claim 1 wherein the nucleic acid molecule further comprises a 5' donor site.
- 4. The cell of Claim 1 wherein the nucleic acid molecule further comprises a safety nucleotide sequence comprising one or more complementary sequences that bind to one or more sides of the 3' splice region.
- 5. The cell of Claim 2 wherein the nucleic acid molecule further comprises a safety nucleotide sequence comprising one or more complementary sequences that bind to one or more sides of the 5' splice region.
- 6. The cell of Claim 1 wherein the nucleic acid molecule further comprises sequences encoding a translatable protein product.

7. The cell of Claim 1 or 3 wherein the nucleic acid molecule further comprises a nucleotide sequence containing a translational stop codon.
8. A cell comprising a recombinant vector wherein said vector expresses a nucleic acid molecule comprising:
- a) one or more target binding domains wherein said target binding domain is between 10 and 600 nucleotides in length and that target binding of the nucleic acid molecule a target pre-mRNA expressed within a cell;
 - b) a 3' splice region comprising a branchpoint, a pyrimidine tract and a 3' splice acceptor site;
 - c) a spacer region that separates the 3' splice region from the target binding domain; and
 - d) a nucleotide sequence to be trans-spliced to the target pre-mRNA; wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.
9. A cell comprising a recombinant vector wherein said vector expresses a nucleic acid molecule comprising:
- a) one or more target binding domains wherein said target binding domain is between 10 and 600 nucleotides in length and that target

WO 02/053581

93

PCT/US02/00416

binding of the nucleic acid molecule a target pre-mRNA
expressed within a cell;

- b) a 5' splice site;
 - c) a spacer region that separates the 5' splice site from the target binding domain; and
 - d) a nucleotide sequence to be trans-spliced to the target pre-mRNA; wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.
10. The cell of claim 8 wherein the nucleic acid molecule further comprises a 5' donor site.
11. A method of producing a chimeric RNA molecule in a cell comprising:
contacting a target pre-mRNA expressed in the cell with a nucleic acid molecule recognized by nuclear splicing components wherein said nucleic acid molecule comprises:
- a) one or more target binding domains wherein said target binding domain is between 10 and 600 nucleotides in length and that target binding of the nucleic acid molecule to a target pre-mRNA expressed within a cell;
 - b) a 3' splice region comprising a branchpoint, a pyrimidine tract and a 3' splice acceptor site;

- c) a spacer region that separates the 3' splice region from the target binding domain; and
- d) a nucleotide sequence to be trans-spliced to the target pre-mRNA; under conditions in which a portion of the nucleic acid molecule is trans-spliced to a portion of the target pre-mRNA to form a chimeric RNA within the cell.

12. A method of producing a chimeric RNA molecule in a cell comprising: contacting a target pre-mRNA expressed within the cell with a nucleic acid molecule recognized by nuclear splicing components wherein said nucleic acid molecule comprises:
- a) one or more target binding domains wherein said target binding domain is between 10 and 600 nucleotides in length and that target binding of the nucleic acid molecules target pre-mRNA expressed within a cell;
 - b) a 5' splice site;
 - c) a spacer region that separates the 5' splice site from the target binding domain; and
 - d) a nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA;
- wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.

WO 02/053581

95

PCT/US02/00416

13. A method of claim 11 wherein the nucleic acid molecule further comprises a 5' donor site.
14. The method of claim 11, wherein the chimeric RNA molecule comprises sequences encoding a translatable protein.
15. The method of claim 11, wherein the chimeric RNA molecule comprises sequences encoding a toxin.
16. A nucleic acid molecule comprising:
 - a) one or more target binding domains wherein said target binding domain is between 10 and 600 nucleotides in length and that target binding of the nucleic acid molecule to a target pre-mRNA expressed within a cell;
 - b) a 3' splice region comprising a branchpoint, a pyrimidine tract and a 3' splice acceptor site;
 - c) a spacer region that separates the 3' splice region from the target binding domain;
 - d) a safety sequence comprising one or more complementary sequences that bind to one or both sides of the 3' splice site; and

WO 02/053581

96

PCT/US02/00416

- e) a nucleotide sequence to be trans-spliced to the target pre-mRNA;
wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear
splicing components within the cell.
17. A nucleic acid molecule comprising :
- a) one or more target binding domains wherein said target binding
domain is between 10 and 600 nucleotides in length and that target
binding of the nucleic acid molecule a target pre-mRNA
expressed within a cell;
 - b) a 5' splice site;
 - c) a spacer region that separates the 5' splice site from the target
binding domain;
 - d) a safety sequence comprising one or more complementary
sequences that bind to one or both sides of the 5' splice site; and
 - e) a nucleotide sequence to be trans-spliced to the target pre-mRNA;
wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear
splicing components within the cell.
18. The nucleic acid molecule of claim 16 wherein the nucleic acid molecule
further comprises a 5' donor site.

19. The nucleic acid molecule of claim 16 or 17 wherein the nucleic acid molecule further comprises sequences encoding a translatable protein product.
20. The nucleic acid molecule of claim 16 or 17 wherein the translatable protein product is a toxin.
21. An expression vector wherein said vector expresses a nucleic acid molecule comprising:
- a) one or more target binding domains wherein said target binding domain is between 10 and 600 nucleotides in length and that target binding of the nucleic acid molecule to a target pre-mRNA expressed within a cell;
 - b) a 3' splice region comprising a branchpoint, a pyrimidine tract and a 3' splice acceptor site;
 - c) a spacer region that separates the 3' splice region from the target binding domain; and
 - d) nucleotide sequence to be trans-spliced to the target pre-mRNA; wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.

22. A eukaryotic expression vector wherein said vector expresses a nucleic acid molecule comprising:
- a) one or more target binding domains wherein said target binding domain is between 10 and 600 nucleotides in length and that target binding of the nucleic acid molecule to a target pre-mRNA expressed within a cell;
 - b) a 5' splice site;
 - c) a spacer region that separates the 5' splice site from the target binding domain; and
 - d) a nucleotide sequence to be trans-spliced to the target pre-mRNA;
- wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.
23. The vector of claim 21 wherein the nucleic acid molecule further comprises a 5' donor site.
24. The expression vector of claim 21 or 22 further comprising a safety sequence comprising one or more complementary sequences that bind to one or both sides of the splice site.

25. A cell comprising a nucleic acid molecule wherein said nucleic acid molecule comprises:
- a) a 3' splice region comprising a branch point, a pyrimidine tract and a 3' splice acceptor site; and
 - b) a nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA; wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.
26. A cell comprising a nucleic acid molecule wherein said nucleic acid molecule comprises:
- a) a 5' splice site;
 - c) a spacer region that separates the 5' splice site from the target binding domain; and
 - d) a nucleotide sequence to be trans-spliced to the target pre-mRNA; wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.
27. The cell of claim 25 wherein the nucleic acid molecule further comprises a 5' donor site.
28. The cell of claim 25 or 26 wherein the nucleotide sequences to be trans-spliced to the target pre-mRNA comprises a nucleotide sequence tag.

WO 02/053581

100

PCT/US02/00416

29. A cell comprising a recombinant vector wherein said vector expresses a nucleic acid molecule comprising:
- a) a 3' splice region comprising a branchpoint, a pyrimidine tract and a 3' splice acceptor site; and
 - b) a nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA; wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.
30. A cell comprising a recombinant vector wherein said vector expresses a nucleic acid molecule comprising:
- a) a 5' splice site; and
 - b) a nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA; wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.
31. The cell of claim 29 wherein the nucleic acid molecule further comprises a 5' donor site.
32. A method of producing a chimeric RNA molecule in a cell comprising:
- contacting a target pre-mRNA expressed in the cell with a nucleic acid molecule recognized by nuclear splicing components wherein said nucleic acid molecule comprises:

WO 02/053581

101

PCT/US02/00416

- a) a 3' splice region comprising a branch point, a pyrimidine tract and a 3' splice acceptor site; and
 - b) a nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA; under conditions in which a portion of the nucleic acid molecule is trans-spliced to a portion of the target pre-mRNA to form a chimeric RNA within the cell.
33. A method of producing a chimeric RNA molecule in a cell comprising: contacting a target pre-mRNA expressed within the cell with a nucleic acid molecule recognized by nuclear splicing components wherein said nucleic acid molecule comprises:
- a) a 5' splice site; and
 - d) a nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA; wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.
34. A method of claim 32 wherein the nucleic acid molecule further comprises a 5' donor site.
35. The method of claim 32, wherein the chimeric RNA molecule comprises a nucleotide sequence tag.
- 100

36. An eukaryotic expression vector wherein said vector expresses a nucleic acid molecule comprising:
- a) a 3' splice region comprising a branchpoint, a pyrimidine tract and a 3' splice acceptor site; and
 - b) a nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA; wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.
37. An eukaryotic expression vector wherein said vector expresses a nucleic acid molecule comprising:
- a) a 5' splice site; and
 - d) a nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA; wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.
38. The vector of claim 36 wherein the nucleic acid molecule further comprises a 5' donor site.
39. An expression library comprising recombinant expression vectors wherein said vectors expresses a nucleic acid molecule comprising:
- a) a 3' splice region comprising a branchpoint, a pyrimidine tract and a 3' splice acceptor site; and

WO 02/053581

103

PCT/US02/00416

- d) a nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA;
wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear
splicing components within the cell.
40. An expression library comprising recombinant expression vectors wherein
said wherein said vector expresses a nucleic acid molecule comprising:
- a) a 5' splice site; and
- b) a nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA;
wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear
splicing components within the cell.
41. The expression library of claim 39 wherein the nucleic acid molecule
further comprises a 5' donor site.
42. The expression library of claim 39 or 40, wherein the nucleotide sequence
to be spliced to the target pre-mRNA comprises a nucleotide sequence tag.
43. A method for mapping exon-intron boundaries in pre-mRNA molecules
comprising:
- (i) contacting a nucleic acid molecule to a target pre-mRNA molecule,
under conditions in which a portion of the nucleic acid molecule is

WO 02/053581

104

PCT/US02/00416

trans-spliced to a portion of the target pre-mRNA to form a chimeric mRNA;

- (ii) amplifying the chimeric mRNA molecule;
- (iii) selectively purifying the amplified molecule; and
- (iv) determining the nucleotide sequence of the amplified molecule thereby identifying the intron-exon boundaries.

103

44. A nucleic acid molecule comprising:
- a) two or more target binding domains that target binding of the pre-trans-splicing molecule to a target pre-mRNA;
 - b) a 3' splice region comprising a branch point, a pyrimidine tract and a 3' splice acceptor site and a 5' splice donor site;
 - c) spacer regions that separate the 3' splice region and the 5' splice donor site from the target binding domains; and
 - d) a nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA; wherein said nucleic acid molecules is recognized by nuclear splicing components within the cell.

45. The nucleic acid molecule of claim 44 wherein the spacer regions separate the 3' splice region and the 5' splice donor site from the target binding domains.

46. The nucleic acid molecule of claim 44 wherein the nucleic acid molecule further comprises sequences encoding a translatable protein product.

47. The nucleic acid molecule of claim 46 wherein the translatable protein product is a toxin.

48. The nucleic acid molecule of claim 44 wherein the nucleic acid molecule further comprises sequences containing a translational stop codon.

49. The molecule of claim 44 wherein the nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA comprises nucleotide sequences encoding the cystic fibrosis trans-membrane conductance regulator.

WO 02/053581

106

PCT/US02/00416

50. The molecule of claim 49 wherein the nucleotide sequences encoding the cystic fibrosis trans-membrane conductance regulator comprise exon 10 of the cystic fibrosis trans-membrane regulator conductance gene.

51. A recombinant expression vector wherein said vector expresses a nucleotide sequence comprising:

- a) two or more target binding domains that target binding of the pre-trans-splicing molecule to a target pre-mRNA;
- b) a 3' splice region comprising a branchpoint, a pyrimidine tract and a 3' splice acceptor site and a 5' splice donor site;
- c) spacer regions that separate the 3' splice region and the 5' splice donor site from the target binding domains; and
- d) a nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA; wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.

52. The molecule of claim 49 or 51 further comprising a safety nucleotide sequence comprising one or more complementary sequences that bind to one or more sides of the pre-trans-splicing molecule branch point, pyrimidine tract, 3' splice site or 5' splice site.

53. A cell comprising a nucleic acid molecule wherein said nucleic acid molecule comprises:

- a) two or more target binding domains that target binding of the pre-trans-splicing molecule to a target pre-mRNA;
- b) a 3' splice region comprising a branch point, a pyrimidine tract and a 3' splice acceptor site and a 5' splice donor site;
- c) spacer regions that separate the 3' splice region and the 5' splice donor site from the target binding domains; and

105

WO 02/053581

107

PCT/US02/00416

- d) a nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA;
wherein said nucleic acid molecules is recognized by nuclear
splicing components within the cell.

54. The cell of claim 53 wherein the spacer regions of the nucleic acid
molecule separate the 3' splice region and the 5' splice donor site from the target binding
domains.

55. The cell of claim 53 wherein the nucleic acid molecule further comprises
sequences encoding a translatable protein product.

56. The cell of claim 55 wherein translatable protein is a toxin.

57. The cell of claim 53 wherein the nucleic acid molecule further comprises a
nucleotide sequence containing a translational stop codon.

58. The cell of claim 53 wherein the nucleotide sequence to be *trans*-spliced
to the target pre-mRNA comprises nucleotide sequences encoding the cystic fibrosis
transmembrane conductance regulator.

59. The cell of claim 53 wherein the nucleotide sequences encoding the cystic
fibrosis transmembrane conductance regulator comprise exon 10 cystic fibrosis transmembrane
conductance regulator gene.

60. A cell comprising a recombinant expression vector wherein said vector
expresses a nucleotide sequence comprising:

- a) two or more target binding domains that target binding of the pre-
trans-splicing molecule to a target pre-mRNA;
b) a 3' splice region comprising a branchpoint, a pyrimidine tract and

106

- a 3' splice acceptor site and a 5' splice donor site;
- c) spacer regions that separate the 3' splice region and the 5' splice donor site from the target binding domains; and
- d) a nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA; wherein said nucleic acid molecules is recognized by nuclear splicing components within the cell.

61. A cell comprising the nucleic acid molecule of claim **49** or **51** further comprising a safety nucleotide sequence comprising one or more complementary sequences that bind to one or more sides of the pre-*trans*-splicing molecule branch point, pyrimidine tract, 3' splice site or 5' splice site.

62. A method of producing a chimeric mRNA molecule comprising contacting a pre-*trans*-splicing molecule with a target pre-mRNA under conditions in which a double *trans*-splicing reaction results in a portion of the pre-*trans*-splicing molecule being *trans*-spliced to a portion of the target pre-mRNA to form said chimeric mRNA.

63. The method of claim **62** wherein the pre-*trans*-splicing mRNA comprises nucleotide sequences encoding the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.

64. The method of claim **62** wherein the pre-*trans*-splicing mRNA comprises exon 10 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene.

65. A method of providing a host cell with a chimeric mRNA molecule, said method comprising:

transferring a pre-*trans*-splicing molecule to a host cell expressing a target pre-mRNA wherein the pre-*trans*-splicing molecule binds to the target pre-mRNA under conditions in which a double *trans*-splicing reaction results in a portion of the pre-*trans*-splicing molecule being *trans*-spliced to a portion of the target pre-mRNA to form said chimeric mRNA.

~~66~~. The method of claim ~~63~~ wherein the host cell is a human cell.

~~67~~. The method of claim ~~63~~ wherein the pre-*trans*-splicing molecule comprises nucleotide sequences encoding a protein that is defective or lacking in the host cell.

~~68~~. The method of claim ~~65~~ wherein the pre-*trans*-splicing molecule comprises nucleotide sequences encoding a fragment of the cystic fibrosis trans-membrane regulator protein.

~~69~~. A pharmaceutical composition comprising the nucleic acid molecule of claim 1 and a pharmaceutically acceptable carrier.

~~70~~. A nucleic acid molecule comprising:

- a) one or more target binding domains that target binding of the pre-*trans*-splicing molecule to a target pre-mRNA;
- b) a 5' splice donor site;
- c) a spacer region that separates the 5' splice donor site from the target binding domain; and
- d) a nucleotide sequence comprising the 5' end of a gene to be trans-spliced to the target pre-mRNA;

wherein said nucleic acid molecules is recognized by nuclear splicing components within the cell.

~~71~~. The nucleic acid molecule of claim ~~70~~ wherein the nucleotide sequence to be the *trans*-spliced to the target pre-mRNA encodes a translatable protein product.

~~72~~. The nucleic acid molecule of claim ~~71~~ wherein the translatable protein product is a toxin.

WO 02/053581

110

PCT/US02/00416

~~73.~~ The nucleic acid molecule of claim ~~70~~ wherein the nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA comprises a translational stop codon.

~~74.~~ The nucleic acid molecule of claim ~~70~~ wherein the nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA comprises nucleotide sequences encoding the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.

~~75.~~ The nucleic acid molecule of claim ~~70~~ wherein the nucleotide sequences encoding the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator comprise exons 1-10 cystic fibrosis transmembrane regulator gene.

~~76.~~ A recombinant expression vector wherein said vector expresses a nucleotide sequence comprising:

- a) one or more target binding domains that target binding of the pre-*trans*-splicing molecule to a target pre-mRNA;
- b) a 5' splice donor site;
- c) a spacer region that separates the 5' splice donor site from the target binding domain; and
- d) a nucleotide sequence comprising the 5' end of a gene to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA;

wherein said nucleic acid molecules is recognized by nuclear splicing components within the cell.

~~77.~~ The molecule of claim ~~70~~ or ~~73~~ further comprising a safety nucleotide sequence comprising one or more complementary sequences that bind to one or more sides of the pre-*trans*-splicing molecule branch point, pyrimidine tract, or 3' splice site.

~~78.~~ The recombinant expression vector of claim ~~76~~ further comprising a safety nucleotide sequence comprising one or more complementary sequences that bind to one or more

WO 02/053581

111

PCT/US02/00416

sides of the pre-*trans*-splicing molecule branch point, pyrimidine tract, or 3' splice site.

79. A cell comprising a nucleic acid molecule wherein said nucleic acid molecule comprises:

- a) one or more target binding domains that target binding of the pre-*trans*-splicing molecule to a target pre-mRNA;
- b) a 5' splice donor site;
- c) a spacer region that separates the 5' splice donor site from the target binding domain; and
- d) a nucleotide sequence comprising the 5' end of a gene to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA;

wherein said nucleic acid molecules is recognized by nuclear splicing components within the cell.

80. The cell of claim **79** wherein the nucleic acid molecule further comprises sequences encoding a translatable protein product.

81. The cell of claim **79** wherein the nucleic acid molecule further comprises a nucleotide sequence containing a translational stop codon.

82. The cell of claim **79** wherein the nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA comprises nucleotide sequences encoding the cystic fibrosis transmembrane regulator.

83. The cell of claim **79** wherein the nucleotide sequences encoding the cystic fibrosis trans-membrane regulator comprise exons 1-10 of the cystic fibrosis transmembrane regulator gene.

84. The cell of claim **79** wherein the translatable protein is a toxin.

110

85. A cell comprising a recombinant expression vector wherein said vector expresses a nucleotide sequence comprising:

- a) one or more target binding domains that target binding of the pre-trans-splicing molecule to a target pre-mRNA;
- b) a 5' splice donor site;
- c) a spacer region that separates the 5' splice donor site from the target binding domain; and
- d) a nucleotide sequence comprising the 5' end of a gene to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA;

wherein said nucleic acid molecules is recognized by nuclear splicing components within the cell.

86. A cell comprising the nucleic acid molecule of claim ~~70~~ or ~~72~~ further comprising a safety nucleotide sequence comprising one or more complementary sequences that bind to one or more sides of the pre-*trans*-splicing molecule branchpoint, pyrimidine tract, or 5' splice site.

87. A cell comprising the recombinant expression vector of claim ~~76~~ further comprising a safety nucleotide sequence comprising one or more complementary sequences that bind to one or more sides of the pre-*trans*-splicing molecule branchpoint, pyrimidine tract, or 5' splice site.

88. A method of producing a chimeric mRNA molecule comprising contacting a pre-*trans*-splicing molecule with a target pre-mRNA under conditions in which a *trans*-splicing reaction results in a portion of the pre-*trans*-splicing molecule being *trans*-spliced to the 5' end of the target pre-mRNA to form said chimeric mRNA.

89. The method of claim ~~88~~ wherein the pre-*trans*-splicing mRNA comprises

WO 02/053581

113

PCT/US02/00416

nucleotide sequences encoding the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.

40. The method of claim **39** wherein the pre-*trans*-splicing mRNA comprises exons 1-10 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene.

41. A method of providing a host cell with a chimeric mRNA molecule, said method comprising:
transferring a pre-*trans*-splicing molecule to a host cell expressing a target pre-mRNA wherein the pre-*trans*-splicing molecule binds to the target pre-mRNA under conditions in which a *trans*-splicing reaction results in a portion of the pre-*trans*-splicing molecule being *trans*-spliced to a 5' portion of the target pre-mRNA to form said chimeric mRNA.

42. The method of claim **41** wherein the host cell is a human cell.

43. The method of claim **41** wherein the pre-*trans*-splicing molecule comprises nucleotide sequences encoding a protein that is defective or lacking in the host cell.

44. The method of claim **43** wherein the pre-*trans*-splicing molecule comprises nucleotide sequences encoding a fragment of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein.

45. A pharmaceutical composition comprising the nucleic acid molecule of claim 27 and a pharmaceutically acceptable carrier.

46. A nucleic acid molecule wherein said nucleic acid molecule is CFTR PTM24.

- 113

WO 02/053581

115

PCT/US02/00416

- d) a nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA;

wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.

~~92.~~ The plant cell of claim ~~91~~ wherein the nucleic acid molecule further comprises a 5' donor site.

~~100.~~ The plant cell of claim ~~91~~ wherein the nucleic acid molecule further comprises a UA rich sequence.

~~101.~~ The plant cell of Claim ~~91~~ wherein the nucleic acid molecule further comprises a safety nucleotide sequence comprising one or more complementary sequences that bind at or adjacent to one or more sides of the 3' splice region.

~~102.~~ The plant cell of Claim ~~91~~ wherein the nucleic acid molecule further comprises a safety sequence comprising one or more complementary sequences that bind at or adjacent to one or more sides of the 5' splice region.

WO 02/053581

116

PCT/US02/00416

103. The plant cell of Claim 99 wherein the nucleic acid molecule further comprises sequences encoding a translatable protein product.
104. The plant cell of Claim 99 wherein the nucleic acid molecule further comprises a nucleotide sequence containing a translational stop codon.
105. A plant cell comprising a recombinant vector wherein said vector expresses a nucleic acid molecule comprising:
- a) one or more target binding domains that target binding domain of the nucleic acid molecule to a target pre-mRNA expressed within a plant cell;
 - b) a 3' splice region comprising a 3' splice acceptor site;
 - c) a spacer region that separates the 3' splice region from the target binding domain; and
 - d) a nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA; wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.
106. A cell comprising a recombinant vector wherein said vector expresses a nucleic acid molecule comprising:

115

WO 02/053581

117

PCT/US02/00416

- a) one or more target binding domains that target binding domain of the nucleic acid molecule to a target pre-mRNA expressed within a plant cell;
 - b) a 5' splice site;
 - c) a spacer region that separates the 5' splice site from the target binding domain; and
 - d) a nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA; wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.
107. The cell of claim 105 wherein the nucleic acid molecule further comprises a 5' donor site.
108. The cell of claim 105 wherein the nucleic acid molecule further comprises a UA rich sequence.
109. A method of producing a chimeric RNA molecule in a plant cell comprising:
- contacting a target pre-mRNA expressed in the cell with a nucleic acid molecule recognized by nuclear splicing components wherein said nucleic acid molecule comprises:

116

WO 02/053581

118

PCT/US02/00416

- a) one or more target binding domains that target binding domain of the nucleic acid molecule to a target pre-mRNA expressed within a plant cell;
- b) a 3' splice region comprising a 3' splice acceptor site;
- c) a spacer region that separates the 3' splice region from the target binding domain; and
- d) a nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA; under conditions in which a portion of the nucleic acid molecule is trans-spliced to a portion of the target pre-mRNA to form a chimeric RNA within the cell.

110. A method of producing a chimeric RNA molecule in a plant cell comprising:
- contacting a target pre-mRNA expressed within the cell with a nucleic acid molecule recognized by nuclear splicing components wherein said nucleic acid molecule comprises:
- a) one or more target binding domains that target binding domain of the nucleic acid molecule to a target pre-mRNA expressed within a plant cell;
 - b) a 5' splice site;
 - c) a spacer region that separates the 5' splice site from the target binding domain; and

117

WO 02/053581

119

PCT/US02/00416

- d) a nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA;
 wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear
 splicing components within the cell.

111. The method of claim 109 wherein the nucleic acid molecule further
 comprises a 5' donor site.

112. The method of claim 109 wherein the nucleic acid molecule further
 comprises a UA rich sequence.

113. The method of claim 109, wherein the chimeric RNA molecule comprises
 sequences encoding a translatable protein.

114. The method of claim 109, wherein the chimeric RNA molecule comprises
 sequences encoding a toxin.

115. A nucleic acid molecule comprising:

- a) one or more target binding domains that target binding domain of
 the nucleic acid molecule to a target pre-mRNA expressed within a
 plant cell;
- b) a 3' splice region comprising a 3' splice acceptor site;

118

WO 02/053581

120

PCT/US02/00416

- c) a spacer region that separates the 3' splice region from the target binding domain;
- d) a safety sequence comprising one or more complementary sequences that bind at or adjacent to one or both sides of the 3' splice site; and
- e) a nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA;

wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.

116. A nucleic acid molecule comprising :

- a) one or more target binding domains that target binding domain of the nucleic acid molecule to a target pre-mRNA expressed within a plant cell;
- b) a 5' splice site;
- c) a spacer region that separates the 5' splice site from the target binding domain;
- d) a safety sequence comprising one or more complementary sequences that bind at or adjacent to one or both sides of the 5' splice site; and

WO 02/053581

121

PCT/US02/00416

- c) a nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA; wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.
117. The nucleic acid molecule of claim 115 wherein the nucleic acid molecule further comprises a 5' donor site.
118. The nucleic acid molecule of claim 116 further comprising a safety sequence comprising one or more complementary sequences that bind at or adjacent to one or both sides of the 3' splice site.
119. The nucleic acid molecule of claim 115 or 116 wherein the nucleic acid molecule further comprises a UA rich sequence.
120. A eukaryotic expression vector wherein said vector expresses a nucleic acid molecule comprising:
- a) one or more target binding domains that target binding domain of the nucleic acid molecule to a target pre-mRNA expressed within a plant cell;
 - b) a 3' splice region comprising a 3' splice acceptor site;
 - c) a spacer region that separates the 3' splice region from the target binding domain; and

120

WO 02/053581

122

PCT/US02/00416

- d) a nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA; wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.

121. A eukaryotic expression vector wherein said vector expresses a nucleic acid molecule comprising:

- a) one or more target binding domains that target binding domain of the nucleic acid molecule to a target pre-mRNA expressed within a plant cell;
- b) a 5' splice site;
- c) a spacer region that separates the 5' splice site from the target binding domain; and
- d) a nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA; wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.

122. The vector of claim 120 wherein the nucleic acid molecule further comprises a 5' donor site.

123. The vector of claim 120 or 121 wherein the nucleic acid molecule further comprises a UA rich sequence.

124

- a) one or more target binding domains that target binding domain of the nucleic acid molecule to a target pre-mRNA expressed within a cell wherein said target binding domain comprises random nucleotide sequences;
- b) a 5' splice site;
- c) a spacer region that separates the 5' splice site from the target binding domain; and
- d) a nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA; wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.

125. A cell comprising a nucleic acid molecule wherein said nucleic acid molecule comprises:

- a) one or more target binding domains that target binding of the nucleic acid molecule to a factor VIII or papilloma virus pre-mRNA expressed within the cell;
- b) a 3' splice region comprising a branch point, a pyrimidine tract and a 3' splice acceptor site;
- c) a spacer region that separates the 3' splice region from the target binding domain; and
- d) a nucleotide sequence to be trans-spliced to the target pre-mRNA;

wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.

126. A cell comprising a nucleic acid molecule wherein said nucleic acid molecule comprises:

- a) one or more target binding domains that target binding of the nucleic acid molecule to a factor VIII or papilloma virus pre-mRNA expressed within the cell;
- b) a 3' splice acceptor site;
- c) a spacer region that separates the 3' splice region from the target binding domain; and

WO 02/053581

125

PCT/US02/00416

- d) a nucleotide sequence to be trans-spliced to the target pre-mRNA;

wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.

127 A cell comprising a nucleic acid molecule wherein said nucleic acid molecule comprises:

- a) one or more target binding domains that target binding of the nucleic acid molecule to a factor VIII or papilloma virus pre-mRNA expressed within the cell;
- b) a 5' splice site;
- c) a spacer region that separates the 5' splice site from the target binding domain; and
- d) a nucleotide sequence to be trans-spliced to the target pre-mRNA;

wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.

128. The cell of claim 125 wherein the nucleic acid molecule further comprises a 5' donor site.

WO 02/053581

126

PCT/US02/00416

129. The cell of Claim 125 wherein the nucleic acid molecule further comprises a safety nucleotide sequence comprising one or more complementary sequences that bind to one or more sides of the 3' splice region.

130. The cell of Claim 125 wherein the binding of the nucleic acid molecule to the target pre-mRNA is mediated by complementary, triple helix formation, or protein-nucleic acid interaction.

131. The cell of Claim 125 wherein the nucleotide sequences to be trans-spliced to the target pre-mRNA encode a factor VIII polypeptide or papilloma virus polypeptide.

132. The cell of claim 125 wherein the papilloma virus is an oncogenic papilloma virus.

133. The cell of claim 125 wherein the nucleotide sequences to be trans-spliced to the target pre-mRNA encodes exons 23-26 of canine or human factor VIII protein or exons 16-26 of murine human factor VIII protein.

134. A cell comprising a recombinant vector wherein said vector expresses a nucleic acid molecule comprising:

- a) one or more target binding domains that target binding of the nucleic acid molecule to a factor VIII or papilloma virus pre-mRNA expressed within the cell;

125

WO 02/053581

127

PCT/US02/00416

- b) a 3' splice region comprising a branch point, a pyrimidine tract and a 3' splice acceptor site;
- c) a spacer region that separates the 3' splice region from the target binding domain; and
- d) a nucleotide sequence to be trans-spliced to the target pre-mRNA;

wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.

135. A cell comprising a recombinant vector wherein said vector expresses a nucleic acid molecule comprising:

- a) one or more target binding domains that target binding of the nucleic acid molecule to a factor VIII or papilloma virus pre-mRNA expressed within the cell;
- b) a 3' splice acceptor site;
- c) a spacer region that separates the 3' splice region from the target binding domain; and
- d) a nucleotide sequence to be trans-spliced to the target pre-mRNA;

wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.

136. A cell comprising a recombinant vector wherein said vector expresses a nucleic acid molecule comprising:

126

WO 02/053581

128

PCT/US02/00416

- a) one or more target binding domains that target binding of the nucleic acid molecule to a factor VIII or papilloma virus pre-mRNA expressed within the cell;
- b) a 5' splice site;
- c) a spacer region that separates the 5' splice site from the target binding domain; and
- d) a nucleotide sequence to be trans-spliced to the target pre-mRNA;

wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.

137. The cell of claim 134 wherein the nucleic acid molecule further comprises a 5' donor site.

138. A method of producing a chimeric RNA molecule in a cell comprising:

contacting a target pre-mRNA expressed in the cell with a nucleic acid molecule recognized by nuclear splicing components wherein said nucleic acid molecule comprises:

- a) one or more target binding domains that target binding of the nucleic acid molecule to a factor VIII or papilloma virus pre-mRNA expressed within the cell;
- b) a 3' splice region comprising a branch point, a pyrimidine tract and a 3' splice acceptor site;

127

WO 02/053581

129

PCT/US02/00416

- c) a spacer region that separates the 3' splice region from the target binding domain; and
- d) a nucleotide sequence to be trans-spliced to the target pre-mRNA;

under conditions in which a portion of the nucleic acid molecule is trans-spliced to a portion of the target pre-mRNA to form a chimeric RNA within the cell.

139. A method of producing a chimeric RNA molecule in a cell comprising:

contacting a target pre-mRNA expressed in the cell with a nucleic acid molecule recognized by nuclear splicing components wherein said nucleic acid molecule comprises:

- a) one or more target binding domains that target binding of the nucleic acid molecule to a factor VIII or papilloma virus pre-mRNA expressed within the cell;
- b) a 3' splice acceptor site;
- c) a spacer region that separates the 3' splice region from the target binding domain; and
- d) a nucleotide sequence to be trans-spliced to the target pre-mRNA; under conditions in which a portion of the nucleic acid molecule is trans-spliced to a portion of the target pre-mRNA to form a chimeric RNA within the cell.

WO 02/053581

130

PCT/US02/00416

140. A method of producing a chimeric RNA molecule in a cell

comprising:

contacting a target pre-mRNA expressed within the cell with a nucleic acid molecule recognized by nuclear splicing components wherein said nucleic acid molecule comprises:

- a) one or more target binding domains that target binding of the nucleic acid molecule to a factor VIII or papilloma virus pre-mRNA expressed within the cell;
- b) a 5' splice site;
- c) a spacer region that separates the 5' splice site from the target binding domain; and
- d) a nucleotide sequence to be trans-spliced to the target pre-mRNA;

wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.

141. A method of claim 138 wherein the nucleic acid molecule further comprises a 5' donor site.

142. The method of claim 138, wherein the chimeric RNA molecule comprises sequences encoding a translatable protein.

143. A nucleic acid molecule comprising:

- a) one or more target binding domains that target binding of the nucleic acid molecule to a factor VIII or papilloma virus pre-mRNA expressed within the cell;
- b) a 3' splice region comprising a branch point, a pyrimidine tract and a 3' splice acceptor site;
- c) a spacer region that separates the 3' splice region from the target binding domain;
- d) a safety sequence comprising one or more complementary sequences that bind to one or both sides of the 3' splice site; and
- e) a nucleotide sequence to be trans-spliced to the target pre-mRNA;

wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.

144. A nucleic acid molecule comprising:

- a) one or more target binding domains that target binding of the nucleic acid molecule to a factor VIII or papilloma virus pre-mRNA expressed within the cell;
- b) a 3' splice acceptor site;
- c) a spacer region that separates the 3' splice region from the target binding domain;

WO 02/053581

132

PCT/US02/00416

- d) a safety sequence comprising one or more complementary sequences that bind to one or both sides of the 3' splice site; and
- e) a nucleotide sequence to be trans-spliced to the target pre-mRNA;

wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.

145. A nucleic acid molecule comprising :

- a) one or more target binding domains that target binding of the nucleic acid molecule to a factor VIII or papilloma virus pre-mRNA expressed within the cell;
- b) a 5' splice site;
- c) a spacer region that separates the 5' splice site from the target binding domain;
- d) a safety sequence comprising one or more complementary sequences that bind to one or both sides of the 5' splice site; and
- e) a nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA;

wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.

WO 02/053581

133

PCT/US02/00416

146. The nucleic acid molecule of claim 18 wherein the nucleic acid molecule further comprises a 5' donor site.

147. The nucleic acid molecule of claim 143 wherein the binding of the nucleic acid molecule to the target pre-mRNA is mediated by complementary, triple helix formation, or protein-nucleic acid interaction.

148. The nucleic acid molecule of claim 143 wherein the nucleotide to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA encodes a translatable factor VIII polypeptide or papilloma virus polypeptide and/or a marker protein.

149. The nucleic acid molecule of claim 143 wherein the papilloma virus is an oncogenic papilloma virus.

150. The nucleic acid molecule of claim 149 wherein the papilloma virus is papilloma virus 16.

151. The nucleic acid molecule of claim 145 wherein the papilloma virus is an oncogenic papilloma virus

WO 02/053581

134

PCT/US02/00416

152. The nucleic acid molecule of claim 145 wherein the human papilloma virus is an oncogenic virus.

153. The nucleic acid molecule of claim 143 wherein the nucleotide sequence to be trans-spliced to the target pre mRNA encodes exons 23-26 of canine or human factor VIII protein or exons 16-26 of murine huamn factor VII protein.

154. The nucleic acid molecule of claim 145 wherein the binding of the nucleic acid molecule to the target pre-mRNA is mediated by complementary, triple helix formation, or a protein-nucleic acid interaction.

155. The nucleic acid molecule of claim 145 wherein the nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA encodes a factor VIII polypeptide and/or marker gene sequence.

156. The nucleic acid molecule of claim 145 wherein the nucleotide sequence to be trans-spliced to the target pre-mRNA encodes exons 23-26 of the factor VIII protein.

157. A eukaryotic expression vector wherein said vector expresses a nucleic acid molecule comprising:

- a) one or more target binding domains that target binding of the nucleic acid molecule to a factor VIII or papilloma virus protein pre-mRNA expressed within the cell;

WO 02/053581

135

PCT/US02/00416

- b) a 3' splice region comprising a branch point, a pyrimidine tract and a 3' splice acceptor site;
- c) a spacer region that separates the 3' splice region from the target binding domain; and
- d) a nucleotide sequence to be trans-spliced to the target pre-mRNA; wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.

158. A eukaryotic expression vector wherein said vector expresses a nucleic acid molecule comprising:

- a) one or more target binding domains that target binding of the nucleic acid molecule to factor VIII or papilloma virus protein pre-mRNA expressed within the cell;
- b) a 3' splice acceptor site;
- c) a spacer region that separates the 3' splice region from the target binding domain; and
- d) a nucleotide sequence to be trans-spliced to the target pre-mRNA;

wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.

159. A eukaryotic expression vector wherein said vector expresses a nucleic acid molecule comprising:

134

- a) one or more target binding domains that target binding of the nucleic acid molecule to a factor VIII polypeptide or papilloma virus protein pre-mRNA expressed within the cell;
- b) a 5' splice site;
- c) a spacer region that separates the 5' splice site from the target binding domain; and
- d) a nucleotide sequence to be trans-spliced to the target pre-mRNA;

wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.

160. The vector of claim 157 wherein the nucleic acid molecule further comprises a 5' donor site.

161. The vector of claim 157 wherein said vector is a viral vector.

162. The vector of claim 161 wherein in said viral vector is an adeno-associated viral vector.

163. A composition comprising a physiologically acceptable carrier and a nucleic acid molecule according to any of claims 157-162.

164. A cell comprising a nucleic acid molecule wherein said nucleic acid molecule comprises:

- a) one or more target binding domains that target binding of the nucleic acid molecule to a viral pre-mRNA expressed within the cell;
- b) a 3' splice region comprising a branch point, a pyrimidine tract and a 3' splice acceptor site;
- c) a spacer region that separates the 3' splice region from the target binding domain; and
- d) a nucleotide sequence to be trans-spliced to the target pre-mRNA;

wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.

165. A method for inhibiting the expression of papilloma virus pre-mRNA in a subject having cervical carcinoma comprising administering to said subject a nucleic acid molecule comprising:

- a) one or more target binding domains that target binding of the nucleic acid molecule to a papilloma virus pre-mRNA expressed within the cell; and
- b) a nucleotide sequence to be *trans*-spliced to the target pre-mRNA;

wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.

166. A cell comprising a recombinant vector wherein said vector expresses a nucleic acid molecule comprising:

- a) one or more target binding domains that target binding of the nucleic acid molecule to a papilloma virus pre-mRNA expressed within the cell;
- b) a 3' splice acceptor site; and
- c) a nucleotide sequence to be trans-spliced to the target pre-mRNA;

wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.

167. A cell comprising a recombinant vector wherein said vector expresses a nucleic acid molecule comprising:

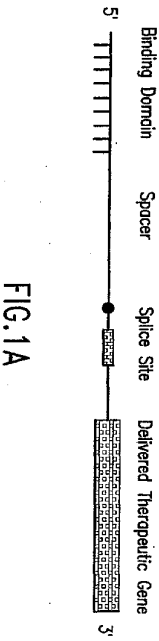
- a) one or more target binding domains that target binding of the nucleic acid molecule to a papilloma virus pre-mRNA expressed within the cell;
- b) a 5' splice site; and
- c) a nucleotide sequence to be trans-spliced to the target pre-mRNA;

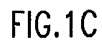
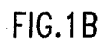
wherein said nucleic acid molecule is recognized by nuclear splicing components within the cell.

168. A method of producing a chimeric RNA molecule in a cell comprising:

contacting a target pre-mRNA expressed in the cell with a nucleic acid molecule recognized by nuclear splicing components wherein said nucleic acid molecule comprises:

- a) one or more target binding domains that target binding of the nucleic acid molecule to a papilloma virus pre-mRNA expressed within the cell;
- b) a 3' splice acceptor site; and
- c) a nucleotide sequence to be trans-spliced to the target pre-mRNA; under conditions in which a portion of the nucleic acid molecule is trans-spliced to a portion of the target pre-mRNA to form a chimeric RNA within the cell.





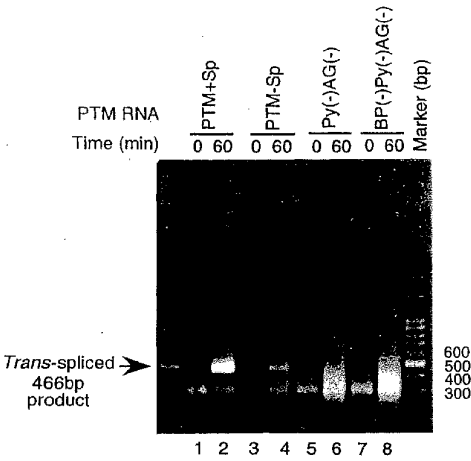
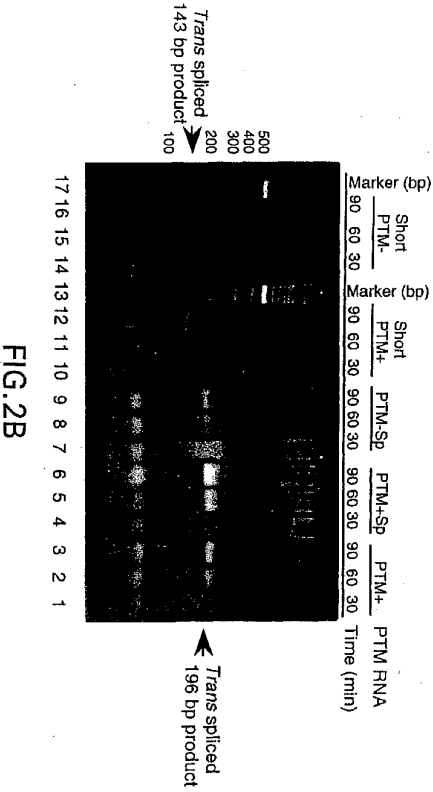


FIG.2A



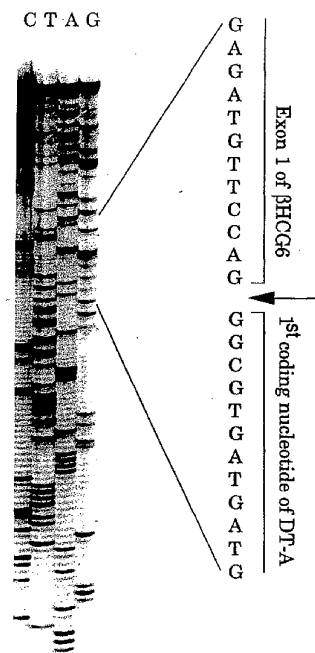


FIG.3



FIG.4A

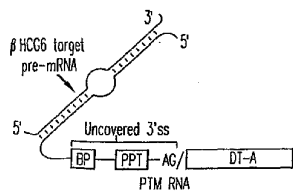


FIG.4B

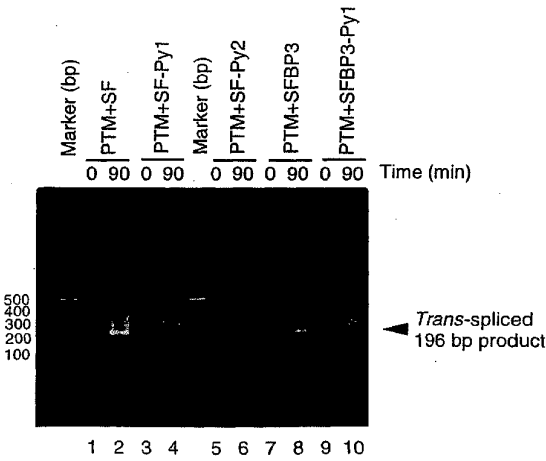
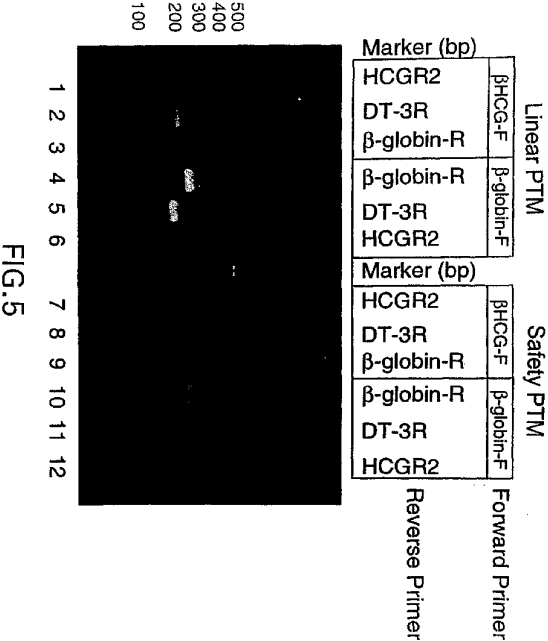
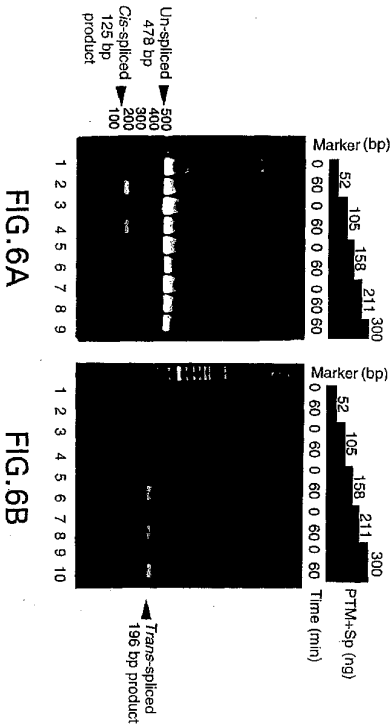


FIG.4C





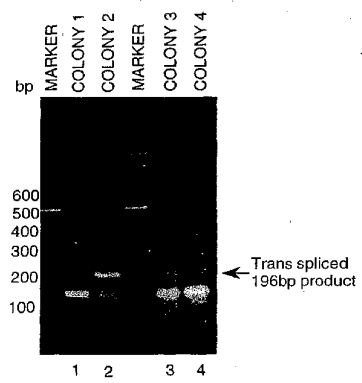
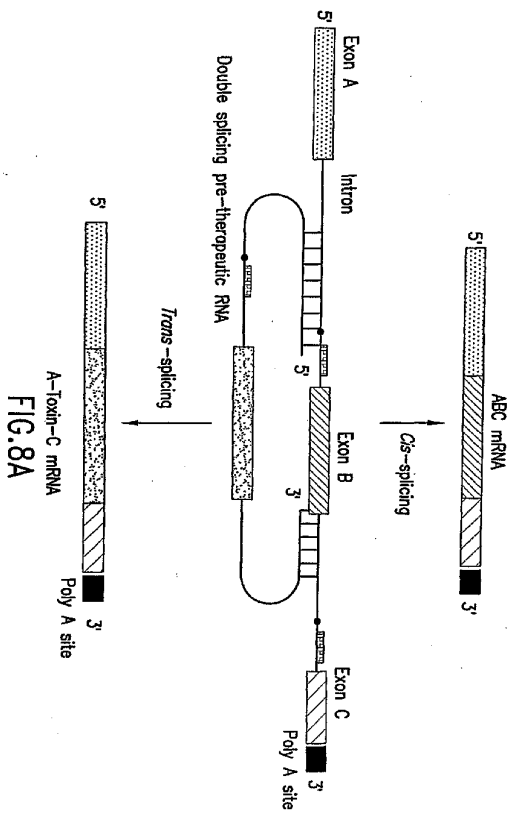


FIG.7A

EXON 1 OF *PHOS* ↓
5'-CAGGGGACGACCAAGGATGGAGATGTTCCAG-GGGCGTGATGATGTTGTT
↓ 1ST CODING NUCLEOTIDE OF DT-A
GATTCCTTAATGCTTTTGATGCGAAGCTTTCTTGCTACACGGGACTA
AACCTGGTTATGATGATTCATTCAAAA-3'

FIG.7B



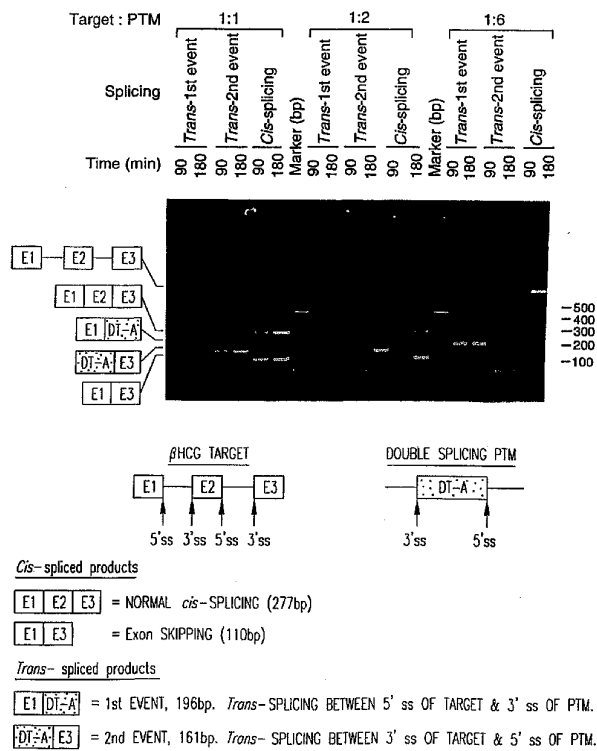


FIG.8B

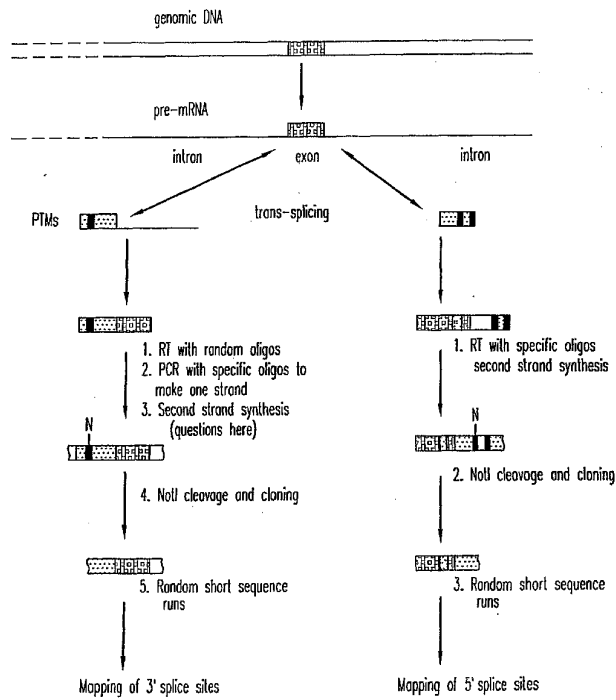
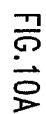


FIG.9



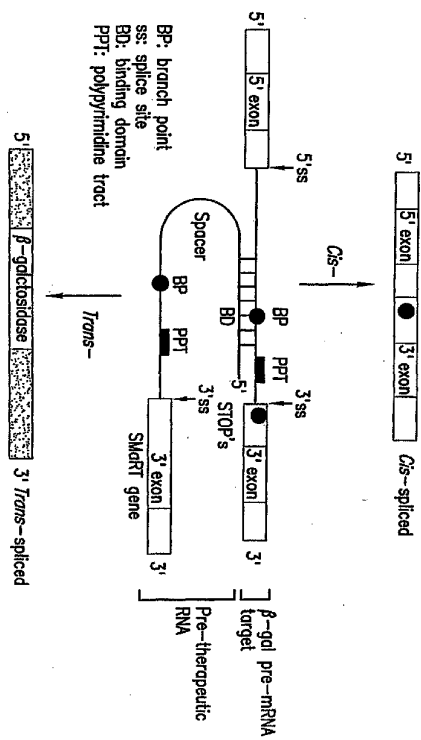
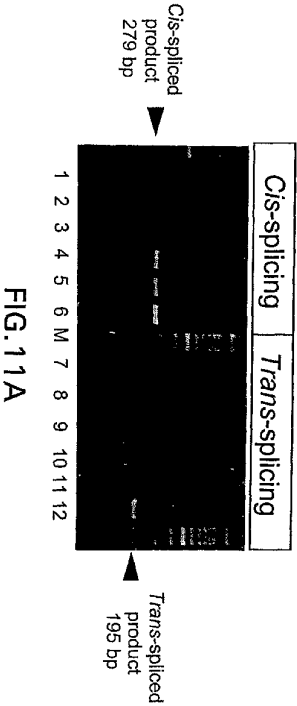


FIG.10B



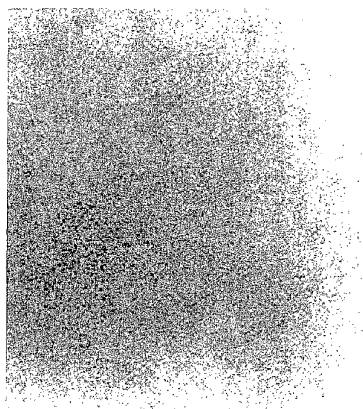


FIG.11B

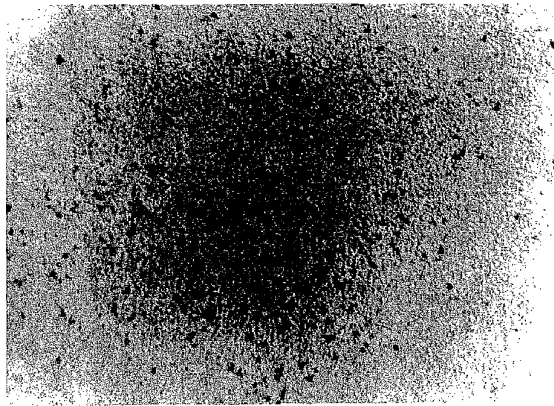


FIG.11C

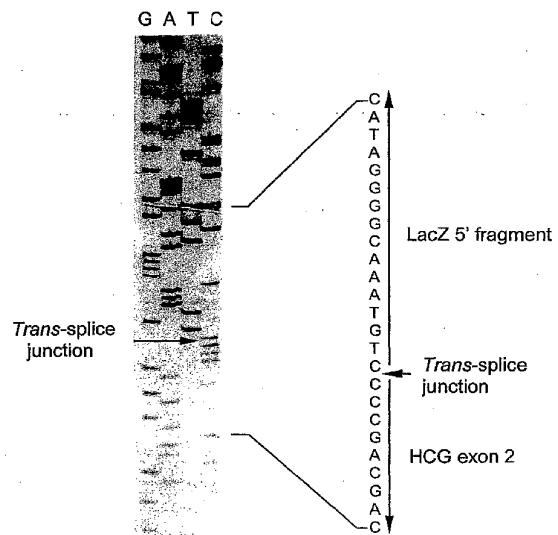


FIG.12A

FIG. 12B

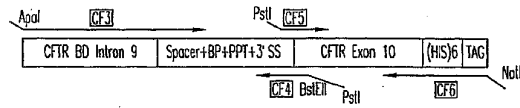
FIG. 12B

WO 02/053581

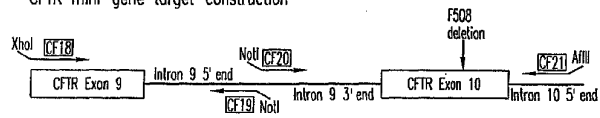
22/89

PCT/US02/00416

CFTR Pre-therapeutic molecule (PTM or "bullet")



CFTR mini-gene target-construction



Trans-splicing Repair

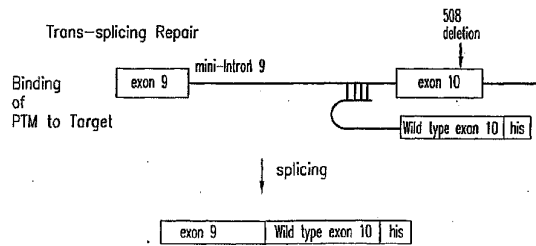


FIG.13

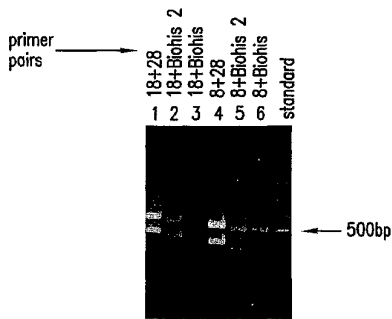


FIG.14

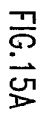


FIG. 15B

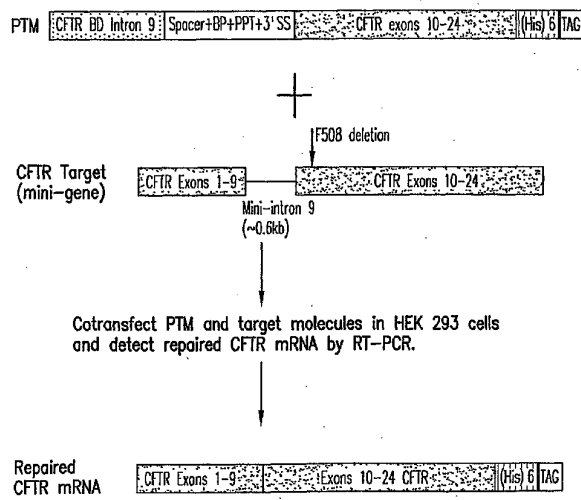


FIG.16

Double Splicing
PTM

CTTR BD action 9	Spacer+BP+PP1+3'SS	CTTR exon 10	Spacer+BP+PP1+3'SS	CTTR BD in/on 10

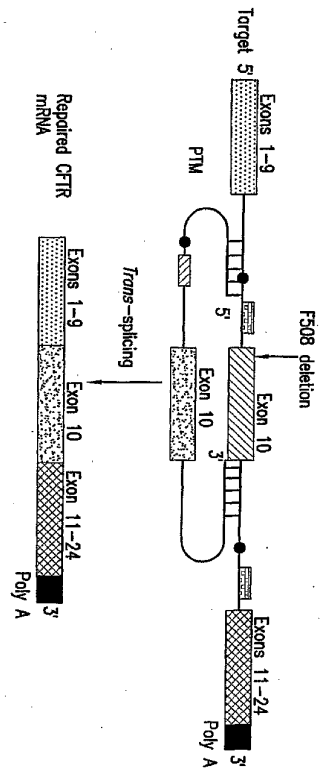


FIG.17

WO 02/053581

28/89

PCT/US02/00416

Double Trans-splicing Specific Target

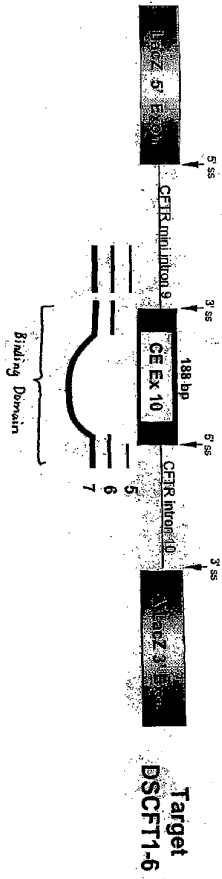
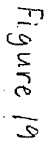


Figure 18

Double Trans-splicing PTMs



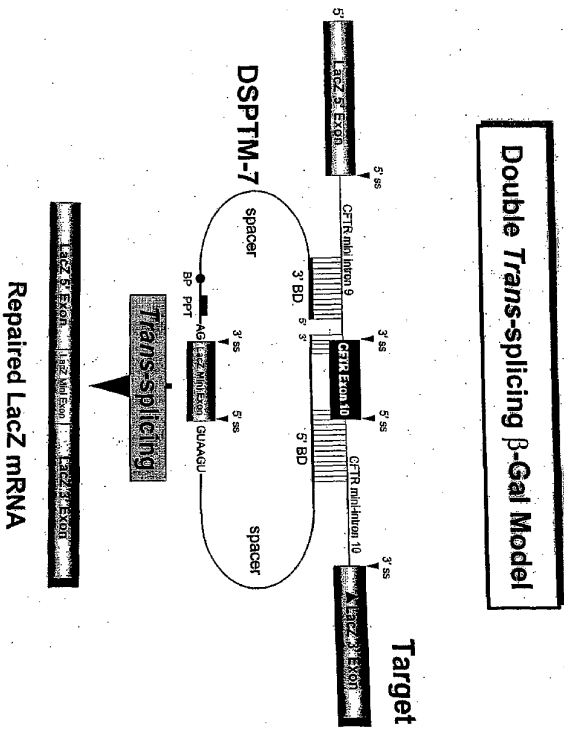
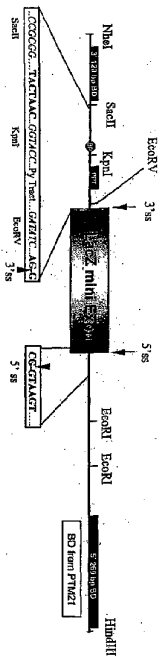


Figure 20

splice elements i.e. has both 3' and 5' functional splice sites and the binding domains,



AAAAATTTAAATACTCGTTCATACGCTGCTATGCAC
GAITCACCTGCCTCAATATCATCCCTATACAGCAGATGTAATTCATATGGTAAAGAATCTATTAACCATTTGAT

ces (24 bp): AACATTATTATACGTTGCTCGAA

priming tract and acceptor splice site: TACTAAC TGGTACCC TCTCTTTTTTTTTT GATATC CTGGAG **GGG GGG**

Id 2nd spacer sequence:

LacZ' nhl S ss
↓
TGGTATGAGTTCTAACCACCGATATGTCGTAACTGCATGCAGCCCTTGATACG
CTAAGATTCAACCGG

1: TCAAAAAGTTTTCACATATTTCTACCTGTCCTTGAAATTCATGCTTGATGACGCTTGTGATCTGTAATATTCATCATCTGGAA
2: CAGCCAGATATTTTCTTTATGTGTGCGTGGCAATATCTGGGAAAGCTGTATATACATCATGAAATTTCTTCACGTGTCTTAA
3: AAAAAAGCTCTGAAATTTCTGCAATTCATCTGCAATATCATCTTACCATGAACTGTGGAAATTAACCCGATCATTTATTAAGCTA
4: ATTCATATCAGCG

Figure 21

DSP1M8 : ▲ 3' ss: 3' splice elements i.e. BP, PPT & AG dinucleotide has been deleted and replaced with random sequences, but still has the functional 5' splice site)

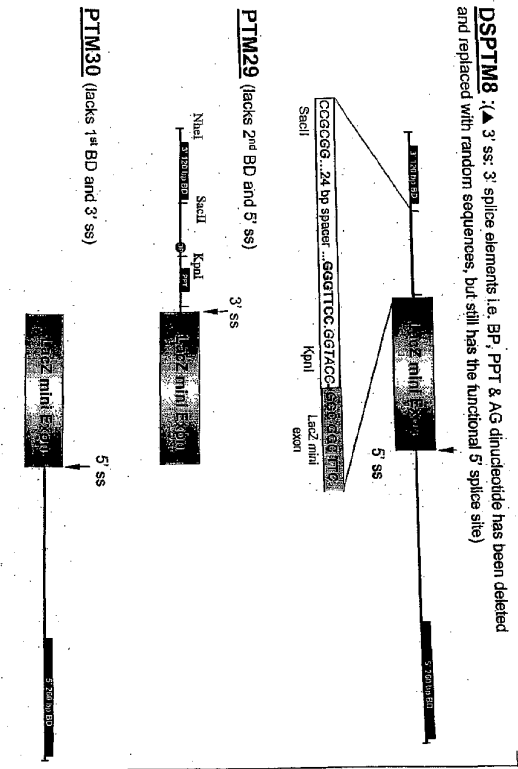


Figure 22

Mutants

WO 02/053581

PCT/US02/00416

33/89

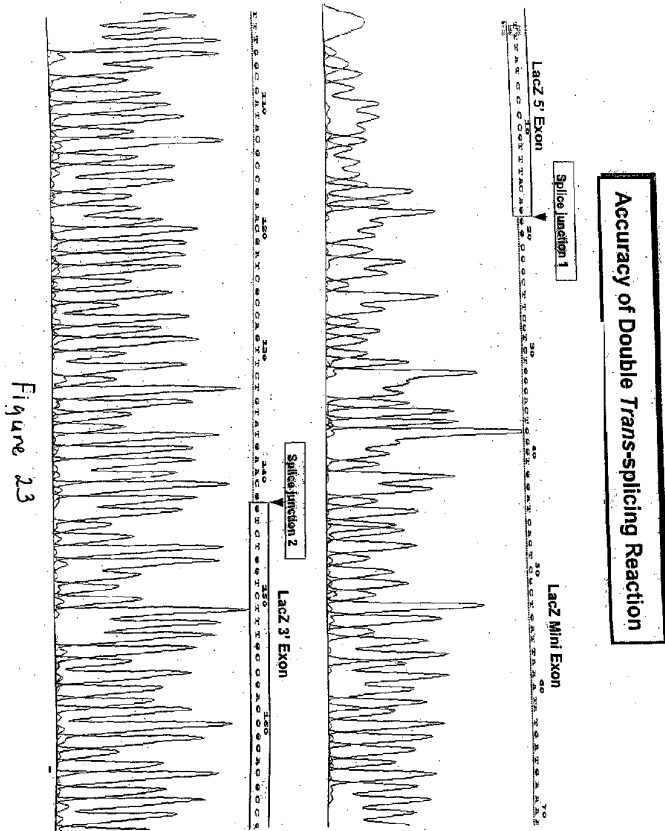


Figure 23

WO 02/053581

34/89

PCT/US02/00416

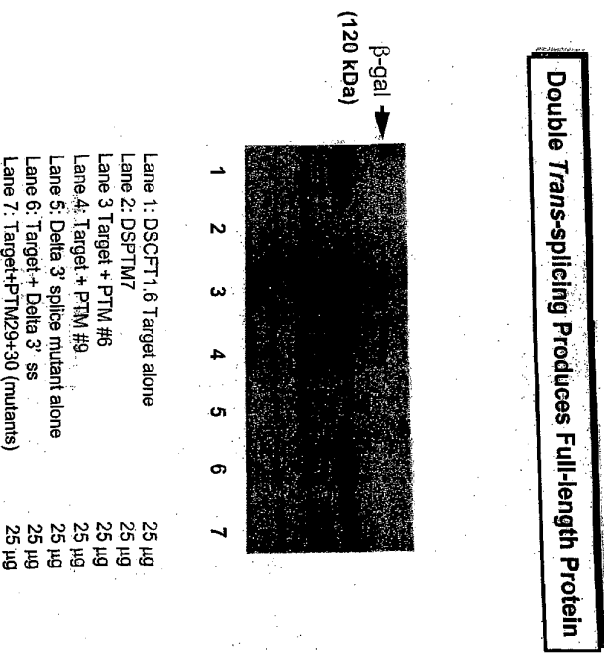
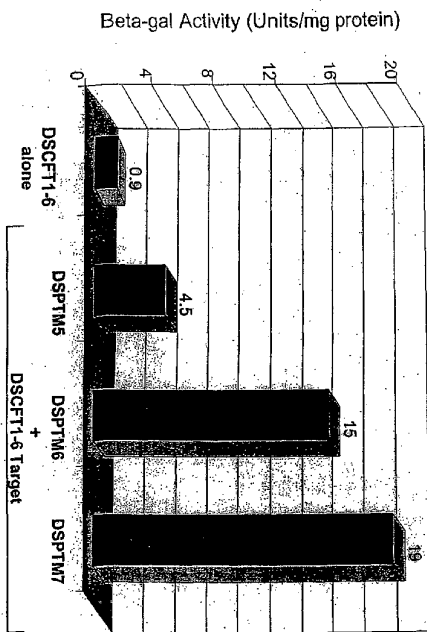


Figure 24

WO 02/053581

35 2. 89 PCT/US02/00416 6
35/89

Restoration of β -Gal Function by Double Trans-splicing

Beta-gal Activity above the
Background level

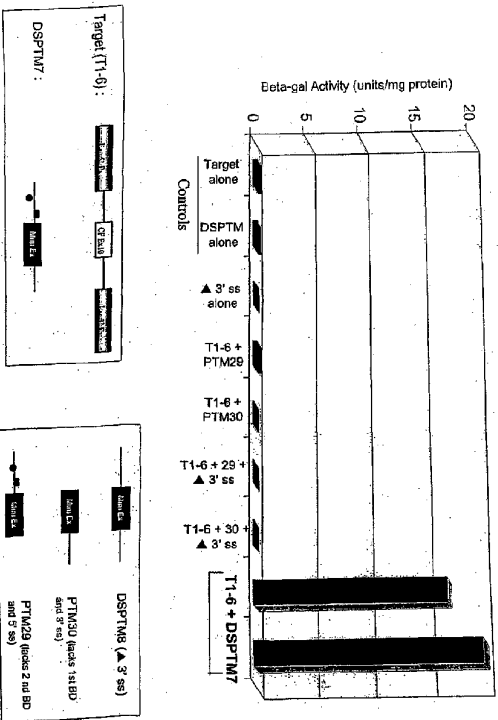
DSPTM5:	5 fold
DSPTM6:	17 fold
DSPTM7:	21 fold

Figure 25

WO 02/053581

36/89

PCT/US02/00416



Restoration of β-gal activity is due to double RNA trans-splicing events

Figure 26

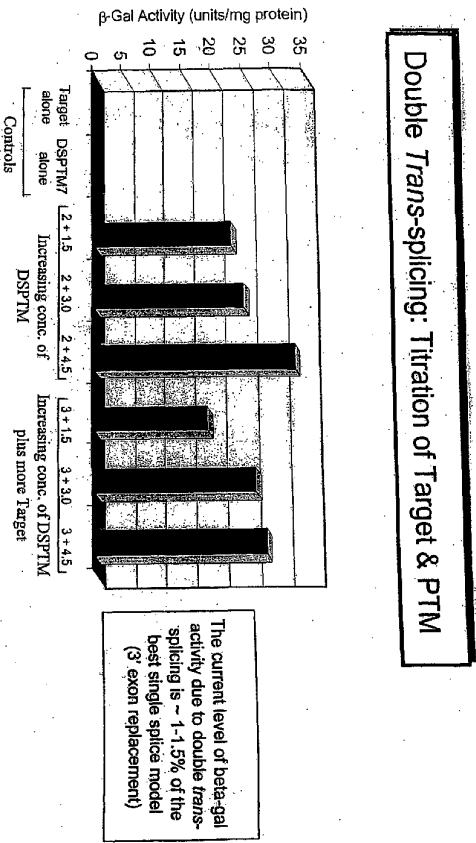
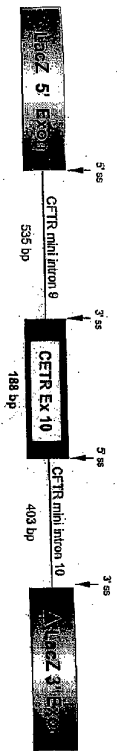


Figure 27

DSCFT1-6 (Specific Target):



DSHCCT1 (Non-specific Target):

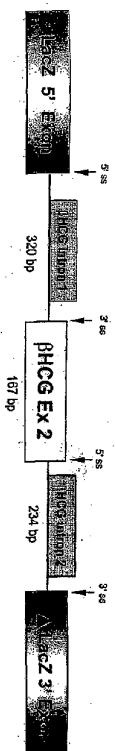


Figure 28

Specificity of double *trans*-splicing Reaction

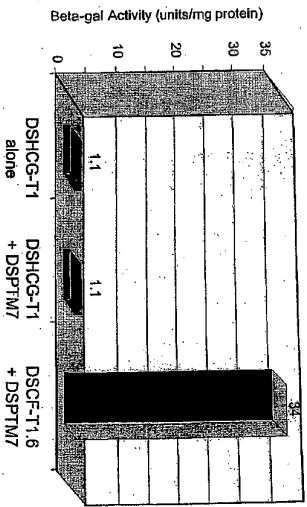


Figure 29

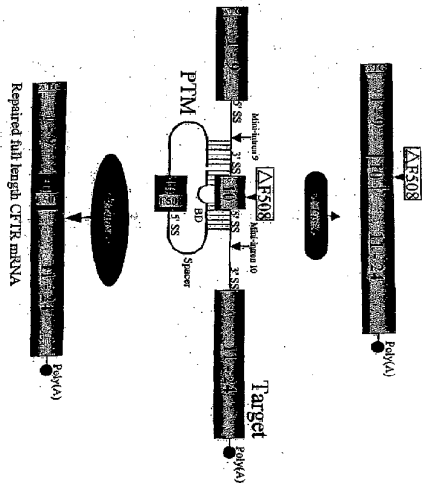
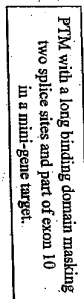


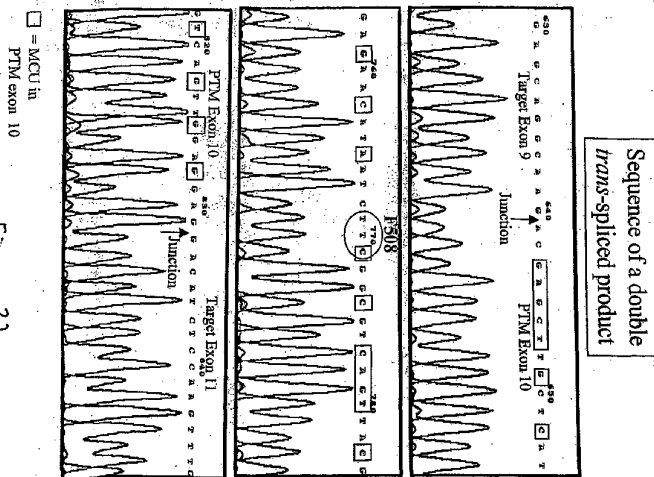
Figure 30



MCU in exon 10 of PTM

88 of 192 (46%) bases in PTM exon 10 are not complementary to its binding domain (bold and underlined).

Figure 31



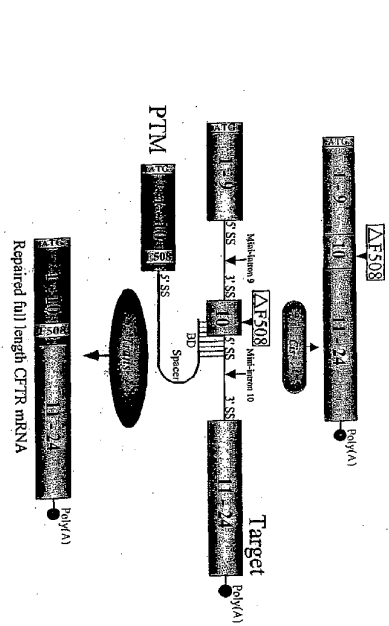
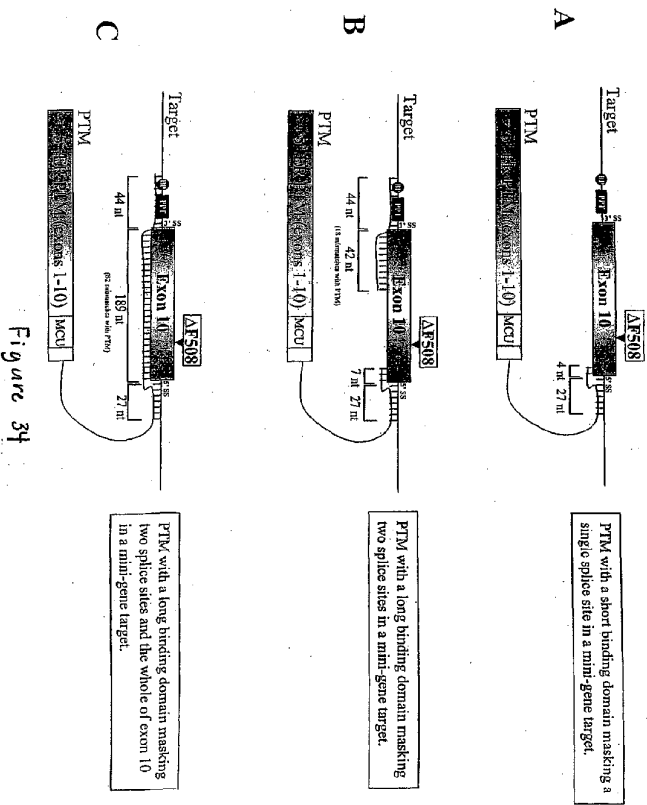


Figure 33

WO 02/053581

44/89

PCT/US02/00416



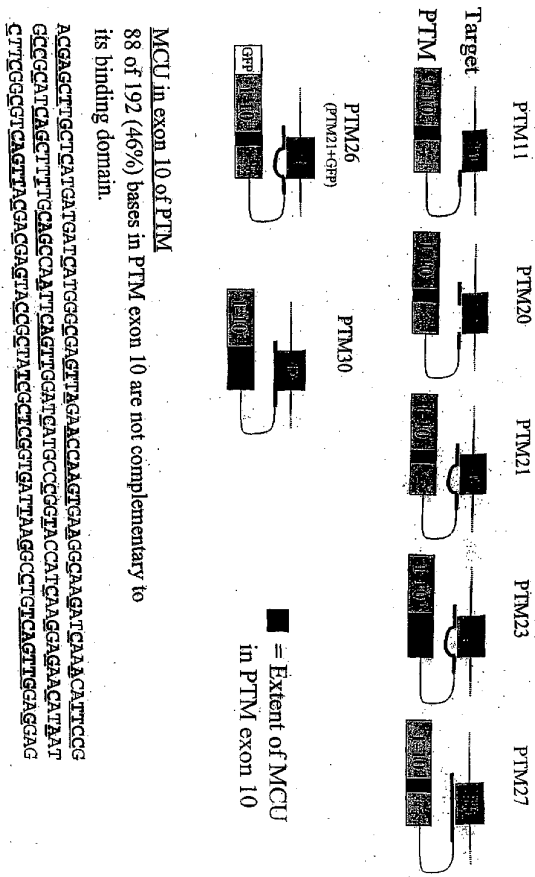
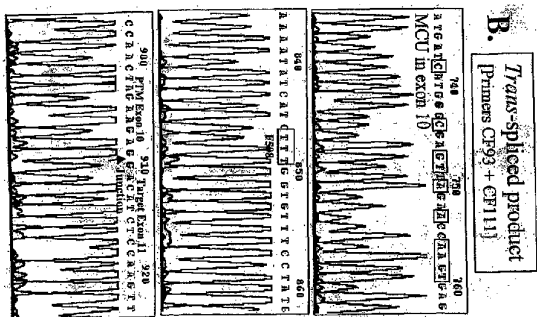
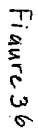


Figure 35



WO 02/053581

47/89

PCT/US02/00416

A

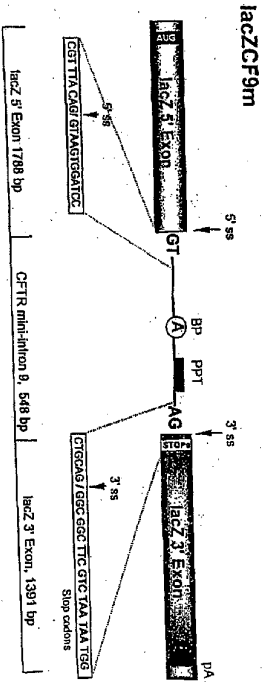


Figure 37 A

WO 02/053581

48/89

PCT/US02/00416

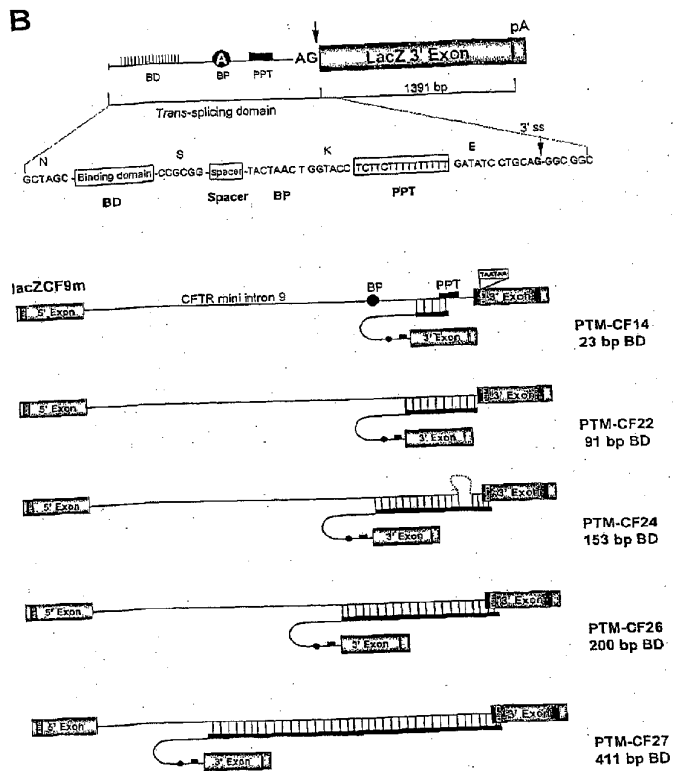


Figure 37B

WO 02/053581

49/89

PCT/US02/00416

C

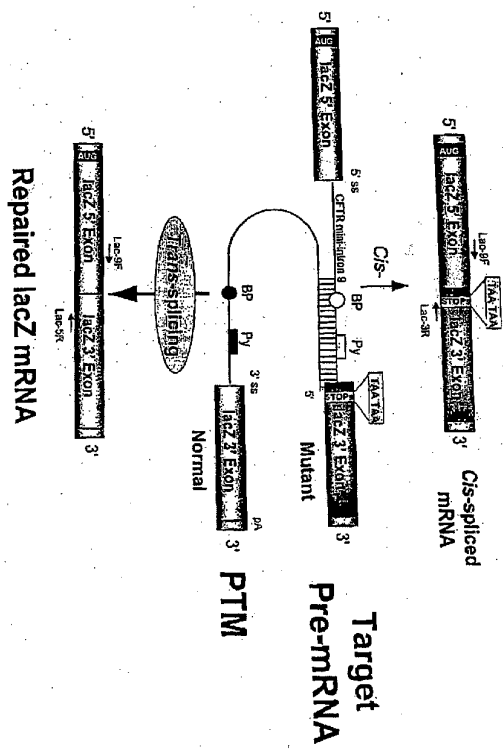
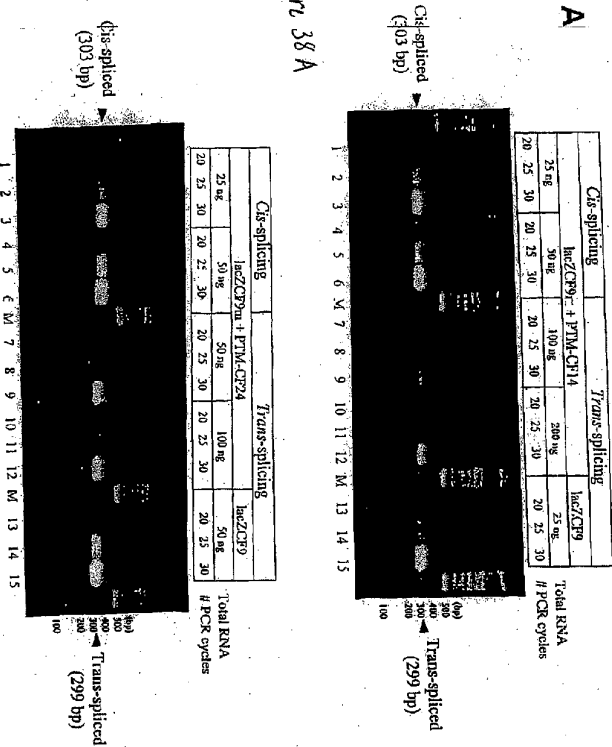


Figure 37C

Figure 38 A



B

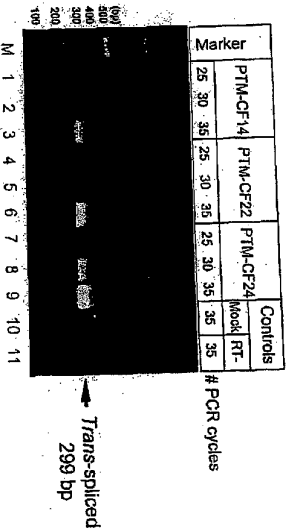
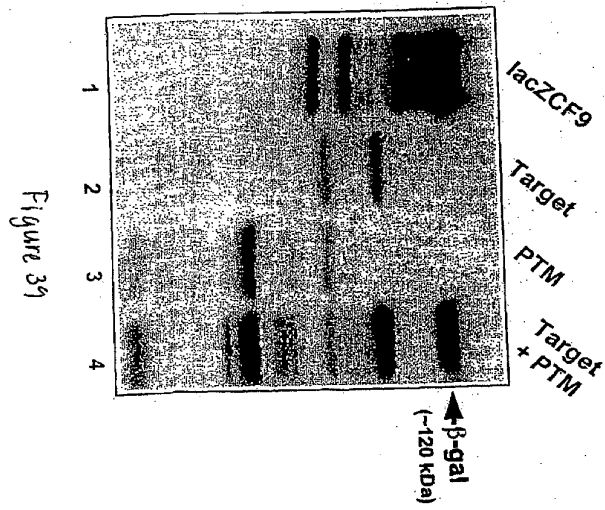


Figure 38B

WO 02/053581

52/89

PCT/US02/00416

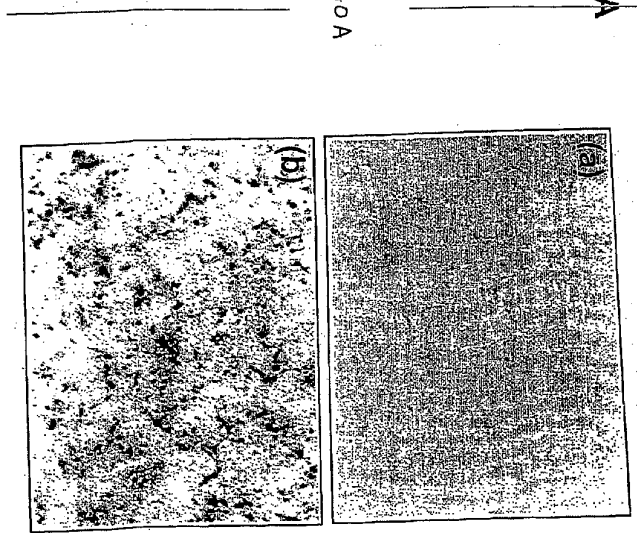


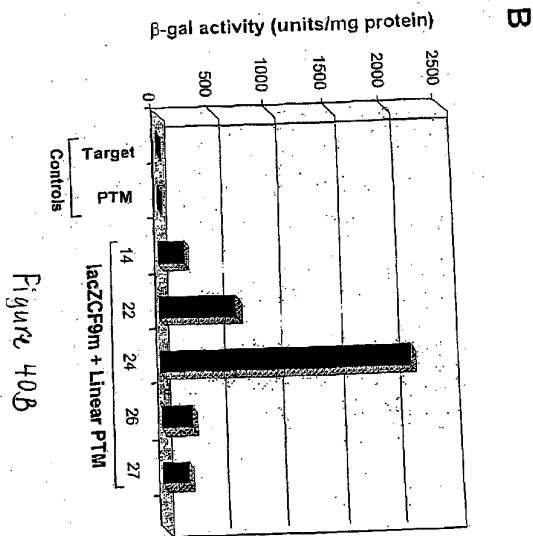
WO 02/053581

PCT/US02/00416

53/89

Figure 40A





C

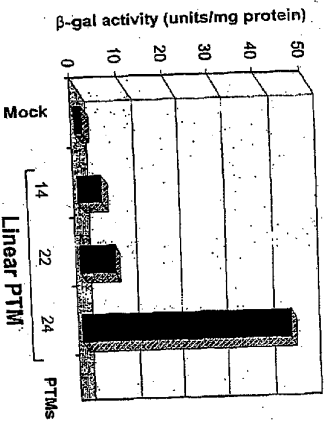


Figure 40c

WO 02/053581

56/89

PCT/US02/00416

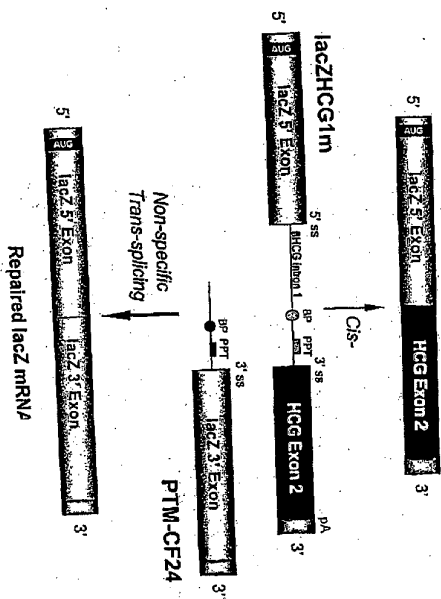


Figure 41A

WO 02/053581

57/89

PCT/US02/00416

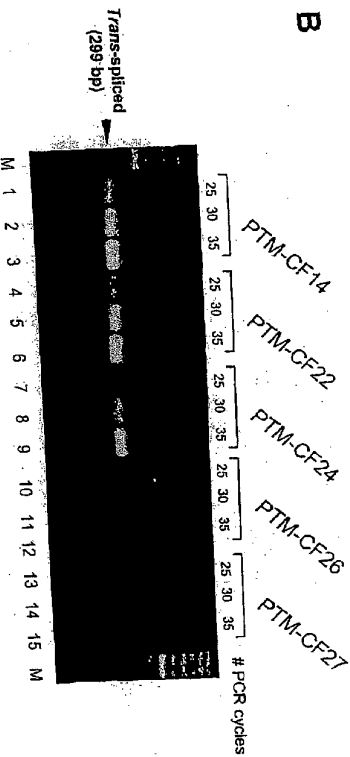


Figure 4B

WO 02/053581

58/89

PCT/US02/00416

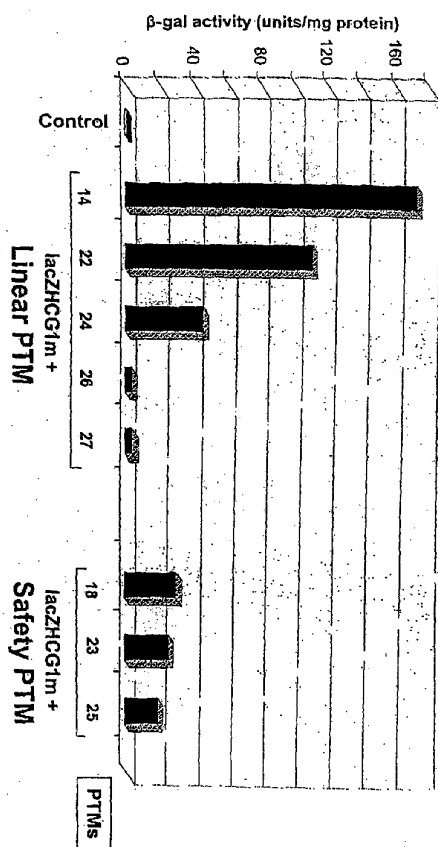


Figure 41C

WO 02/053581

59/89

PCT/US02/00416

Exons 1-10
 ATGCAGAGGTCGCTCTGGAAAGGCCAGCGTTGTCTCCAACTTTTTCAGCTGGACGACCAATTTTGAGGAAAG
 GATACAGACAGCGCTGGAATTTGTCAGACATATACCAATCCCTCTGTGTGATTCTGCTGACAACTATCTGAAAAATF
 GGAAGAGRAATGGGATAGAGAGCTGGCTTCAAGAAAAATCCTAACTCATTAAGGCTTCGGCGATGTTTTCTGG
 AGATTATGTTCTATGGGAATCTTTATATTAGGGAATCACAGACAGTACAGCTCTCTACTGGGAGAAATCA
 TAGCTTCTATGACCGGATACAGAGAGAGAGCTCTATCGGATTTATCTAGGCAATAGGCTTATGCTCTCTTTAT
 TGTGAGGACATCTGCTCTACACCCAGCCTTTTGGCTTCACTACATTTGGAATGCGATGAGAATAGCTATGTTTAT
 TTGATTATAGAAGACTTTAAAGCTGTCTAGGCGTGTCTAGATAAATAAGTATTGGACAACTTGTAGTCTCCTTT
 CCAACACCTGAACAAATTTGATGAAGGACTTGCATTTGCACATTTCTGTGGATGCTCCTTGCAGTGGCACTCCT
 CATGGGCTAATCTGGGAGTTGTTACAGGCTGTGCTTCTGTGAATTTGTTCTGTATGCTCTGCTCTTTCTCAG
 GCTGGGCTAGGGAGATGATGATGAATACAGAGATCAGAGAGCTGGAGAGATCAGTGAAGACTTGTGATTACCTCAG
 AATGATCGAGAACATCCAACTCTGTTAAGGCATCTGCTGGGAGAGCAATGGAAAAATGATTGAACCTTAAGACA
 AACAGAACTGAACCTGACTCGGAAGGCAAGCTATGTGAGTACTTCAATAGCTCAGGCTTCTCTCTCAGGTTCTTT
 GTGGGTTTTTATCTGTGCTTCCCTATGCACTATCAAGGAATCTCTCCGGAATATTCCCAACCATCTCATTTCT
 GCATGTTCTCTGCGCATGGCGCTCACTCGGCAATTTCCCTGGGCTGTACAAACATGGTATGACTCTCTCTGGAGCAATAA
 CAATATACAGGATTTCTTACAAAGCAAGAAATATAGACATTGGAAATATACTTAACGACTACAGAAGTAGTATGGAG
 AATGTACAGGCTTCTGGGAGAGGGGATTTGGGAATATTGAGAAAGCAAAACAAACATAACATAGAAAAACTT
 CTAATGGTGATGACAGCTCTTCTTCACTAATTTCTCACTTCTGTGATCTCTGCTCTGAAAGATATTATTTCAAGAT
 AGAAGAGGACAGTTGTGGCGGTTGCTGGATCCACTGGAGCAGGCAAGACAGCTTCTCATGATGATCATGGGCGAG
 TTAGAACCACTGAGGCAAGATCAATCTCCGGCGGATCAGCTTTTCCAGCCAACTCAGTTGGATCATGCGGGTA
 CCATCAAGAGAACATTAATCTGGGCTCAGTTAGGAGAGTACGCTATCTGCTGATTAAGGCTGTGAGTTTGA
 GAG
 Trans-splicing domain
 GTAGATATCACCGATGTTGTTCTTACCTGATTGCGGCTTGGATCGCTAGATCCACCG
 TCAAAAGTTTTCACATAATTTCTTACCTCTCTTGAATCATGCTTTGATGACGCTTCTGTATCTATATTCATCATG
 GAAACACCAATGATATTTCTTTAATGTTGCTGSCATATCTGGAATACTGATACCAATGAAATTTCTTCCACTGT
 GCTTATTTTACCTCTGATTTCTCCATTTCTCCATATCATCATTAACACTGAACTCTGGAAATAAAACCATCATTT
 ATTACTCATTTACATCAGCT

Figure 42

60/89

PCT/US02/00416

153 bp PTM24 Binding Domain:

Five I

153 bp BD underlined

GCTTACG ~~ATATGATG~~ GACGAGAGCGCCGCCCTCAAGCTAGATTCCTGGCTCTCAATTATCACTCTAAGCAGAGCTGTATA
 TTCTATTGTGAAGATTCATTAACTCATTTGATTCGAAATTTAAAAATCTCTGTTTCACTCACTCTGCTATGCGG

Sac II

AC-CCGCCG

Figure 43A

WO 02/053581

61/89

PCT/US02/00416

Trans-splicing domain
 AATAATGAGGAGGCGCCCTTCACCCCTCGGATTGCACTTGCCTCCCAATTATCCTTCCAGCAGAGGTGTATTTCTTA
 TTCTGTAAAGATTCTATTAACTCACTTGTATTCAGAAATTTAAATACTCTCTGTTTCACCTACTCTGTATGACCCGCG
 GGAACATATTATAACGTTGCTCGAATCACTACTGCTACTCTCTCTTTTCTTTTGGATATCTGTCAG
 Exons 10-24
 ACTTCACCTCTCAATGATGATTATGGGAGAACTGGAGCCTTCAGAGGGTAAATTAAGCACAGTGGAGAAATTCATTCT
 GTTCTCAGTCTTCTCTGGATTATGCTGGCACCATTAAAGAAAAATATCATCTTTGGTGTTCCTATGATGAATATAGATA
 CAGAGGCTCATCAAGCATGCGAACTAGAGAGGACATCTCAGGTTTCAGAGAGAGACATATAGTCTTCTGGAGAA
 GGTGATACACATGAGTGGAGGTCAACGAGCAGAAATTTCTTTAGCAGAGCAGTATACAGAGATGCTGATTGTATT
 TATTAGACTCTCTCTTTGGATACCTAGATGTTTACAGAAAAAGAAATTTGAAAGCTGTGTCTTAACTGATGGC
 TAACAAATCTAGAGTTTGTCTCACTTCAAAATGAAATTTAAAGAGCTTAAAGATTTAATTTGGATGAGGT
 AGCAGCTATTTTATGGGACATTTTCAGACTCCAAATCTACAGCCAGACTTATAGCTCAAACTCATGGATGTGATT
 CTCTGACCAATTTAGTGCAGAAAGAAATTTCAATCTACTGAGAGCTTACACGTTTCTCATTAAGAGGAGATGC
 TCTCTCTCTCTGGACAGAAACAAAAACAATTTTAAACAGACTGAGAGGTTTGGGAAAAAGGAGAGATTTCTATT
 CTCAATCAATCAATCTATACAGAAATTTTCCATTGTGCAAAAGACTCCCTTACAAATGAATGGCATGGAAGGAT
 CTGATGAGCCTTTAGAGAGAGGCTGTCTTATGATCCAGATTCTGAGCAGGAGAGGCGATACCTGCTCGCATCAGCGT
 GATCAGCACTGGCCCGAGGCTTCAGGCAAGAGAGGAGCTCTCTCTGAACTGATGACACTCTGTTTACCAAGGT
 CAGACATTTCCGAAAGACAGAGGACTCACAAGAAAGTGTCTCTGGCCCTCAGGCAACTGTACTGAGCTGATATA
 TATATTCAAGAGGTTTCTCAGAACTGTCTTGGAAATTAAGTGAAGATTAACAGAGAGCTTAAGAGAGTGTCTT
 TTTGATGATGAGAGAGCCTACAGCAGTGACTACTGGAACACATCTTCTGATATATATCTGTCCACAGAGCTTA
 ATTTTGTGCTAATTTGTGCTTAGTAAATTTTCTGGCAGAGGTGCTGCTTCTTGGTTGTGTGGCTCTTGGAA
 ACATCTCTCTTCAAGACAAAGGGAATAGTACTCATAGTAGAAATTAAGCTATGAGTATATCACCAGCACCAGTTC
 GTATTATGTGTTTACATTTACGTGGGAGTAGCCAGCACTTTGCTGCTATGGAGATTTCTCAGAGGCTTACCACTGGTG
 CATATCTCATACAGTGTGAAATTTTACACCAAAATGTTACATTTCTGTTCTTCAAGCCTATGTCAACCTCA
 ACACCTTAAAGCAGGTGGATTCTTAATAGATTCTCCAAGATATAGCAATTTTGGATGACCTTCTGCTCTTACCAT
 ATTTGATCTTATCCAGTGTGTTATTAATTGATTGGAGCTATGAGCTGTGCTGAGTTTACACCTTCACTATTTGTT
 GCAGCTGCTGAGTGTATGCTTTTATATTGAGAGGCTATTTCTTCCAACTCTCAGCACTCAACACACTGG
 AATCTGAGAGCAGGAGTCCAAATTTCACTCATCTGTGTACAGCTTAAAGGACTATGACACTTCTGCTCTGGAGC
 GCACCTTACTTTTGAATCTCTGTTCCCAAGCTCTGAATTTTACATCTGCTGCTTCTTGTACTGTCTCAACACTG
 CGCTGCTTCAATGAGAAATAGAAATGATTTTGTCTCATCTTCTCATCTGTTTACCTTCAATTTTCAACACAG
 GAGAGAGAGAGAGAGTGGTATTATCTGACTTATGCAATGAATATCATGAGTACATTTGAGTGGCTGTAAACTC
 CAGCATAGATGTGATAGCTTGTATGCGATCTGTGAGCCGAGTCTTTAAGTTTCAATGACATGCCACAGAGGTAAACCT
 ACCAGTCAACCAACATACAGAGATGGCACTCTCGAAAGTATGATTAATGAGATTTCACTGAGAGAGATG
 AACTCTGCCCCCTCAGGGGCCAAATGACTTCAAGATCTCAGACAAATACAGAGAGGTGAAATGCCATTAGA
 GACATTTCTTCTCATAGTCTCTGCCAGAGGGTGGGCTCTTGGGAAGACTTGAATCAGGGAAGATCTTTGTTA
 TCMGCTTTTGAAGTCTGAACTGAAAGGAGAAATCCAGATGAGTGTGTCTTGGGATTCATTAATCTTTGCAAC
 AGTGAGGAGAGGCTTTGGAGTATACCAAGAAATTTTATTTTCTGGAACATTTAGAAAACTTGGATCCCTA
 TGAACAGTGGATGATCAAGAAATAGGAAGTTGAGATGAGGTTGGGCTCAGATCTGTGATAGACAGTTTCTGGG
 AAGCTGACTTTGCTTGTGGATGGGGCTGTCTTAAAGCCATGCGCAAGCAGTTGATGTGCTTGGCTAGTCTG
 TTCTCAGTAAAGGCGAGATCTTGTGCTTGTATGAACCAAGTGTCTTGTGATCCAGTAAACATACCAATATTAAGAG
 AACTCTAAACAGAGCTTTTGTGATGACAGTAATTTCTGTGAAACAGAGTGAAGCTGTGATGAGTCCACAA
 TTTTGTGTCATGAGAGAGACAAAGTGGCCAGTAACTTCTGTAACAGAACTGTGAACAGAGAGGAGCTTCCGGC
 AAGCCATCGGCCCTCCAGAGGTGAGGCTTTTCCACCGGAACTCAGCAGTGCAGTCTAAGCCCGAGATTGC
 Histidine tag Stop
 TGCTCTGAAGAGGAGACAGAGAGAGGTGCAAGATACAGGCTTCATCATCATCATCATTAG

Figure 43B

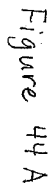


Figure 44A

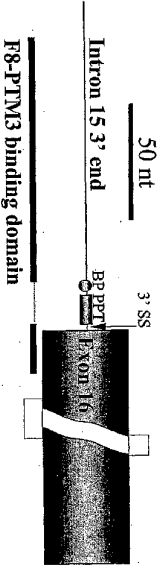


Figure 44B

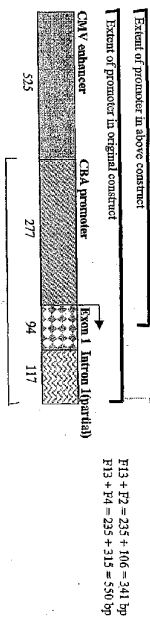
Figure 44C

Chicken β -actin Promoter

[illegible]

Nucleotide changes are shown in blue
Boxed = CAT box, TATA box
Boxed + Arrow = Transcription Start
Oval = Downstream elements
Bold = Binding domain
Italicized = Spacert-PPT+BP+AG dinucleotide

Sequence not included in construct
CGCGCGCTCGGCGCCGCGCGCGCGGCTCTGACTGACCGGCTTACTGCCGACAGGTATGAC
CGGGCGGAGAGGCCCTCTCTCCGCGGCTGTATATAGCGCTGGTCTTATATGACGCGCT
TCTTCTTCTCTGTCGTGATGAAAGCTTGAAGGCGCTCCGATGAGGAATTCGTA



Chicken Beta Actin Promoter (including exon 1 and part of intron 1)

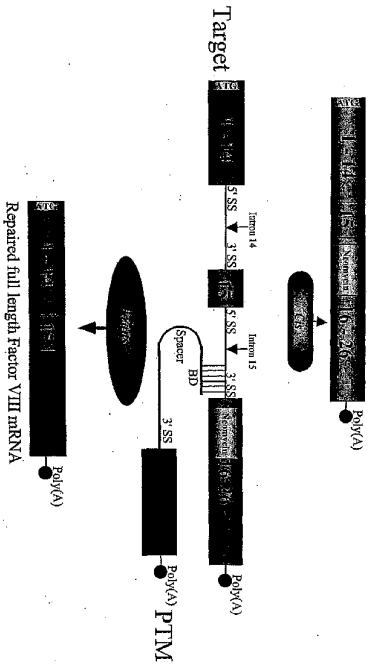
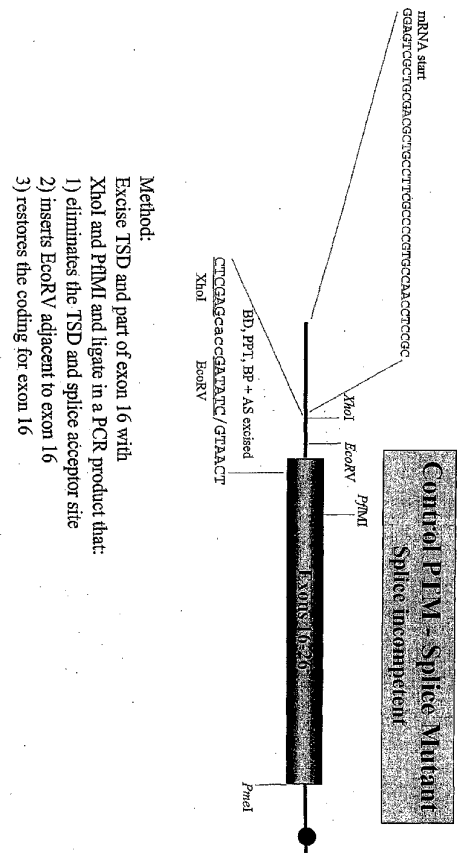


Figure 44D

Figure 45



Method:
Excise TSD and part of exon 16 with
XhoI and PfuII and ligate in a PCR product that:
1) eliminates the TSD and splice acceptor site
2) inserts EcoRV adjacent to exon 16
3) restores the coding for exon 16

WO 02/053581

67/89

PCT/US02/00416

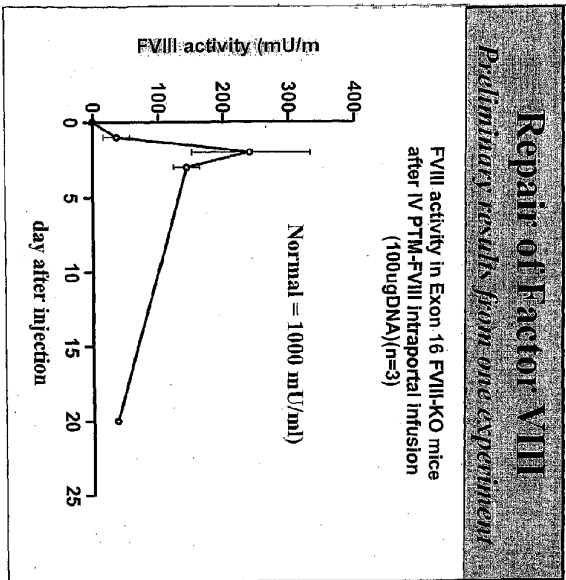


Figure 46

METHODS

Inject plasmid intraportally
↓
Sample blood (1, 2, 3, 20 d)
↓
Assay for factor VIII activity

Detailed structure of a mouse factor VIII P1M containing normal sequences for exons 16-26 and a C-terminal FLAG tag. BGH = bovine growth hormone 3' UTR; Binding domain = 125 bp.

REFERENCE FOR DESIGN OF FLAG TAG

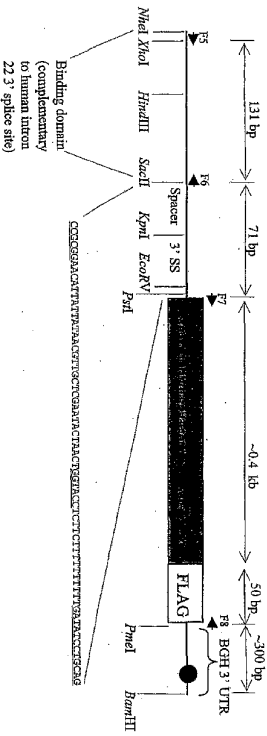
Brann T, Koyda D, Lyons RM, Shirley P, Roy S, Kalisto M, Smith T. Adenoviral vector-mediated expression of physiologic levels of human factor VIII in nonhuman primates. *Hum Gene Ther* 1999 Dec 10;10(18):2299-3011

Figure 47A

WO 02/053581

69/89

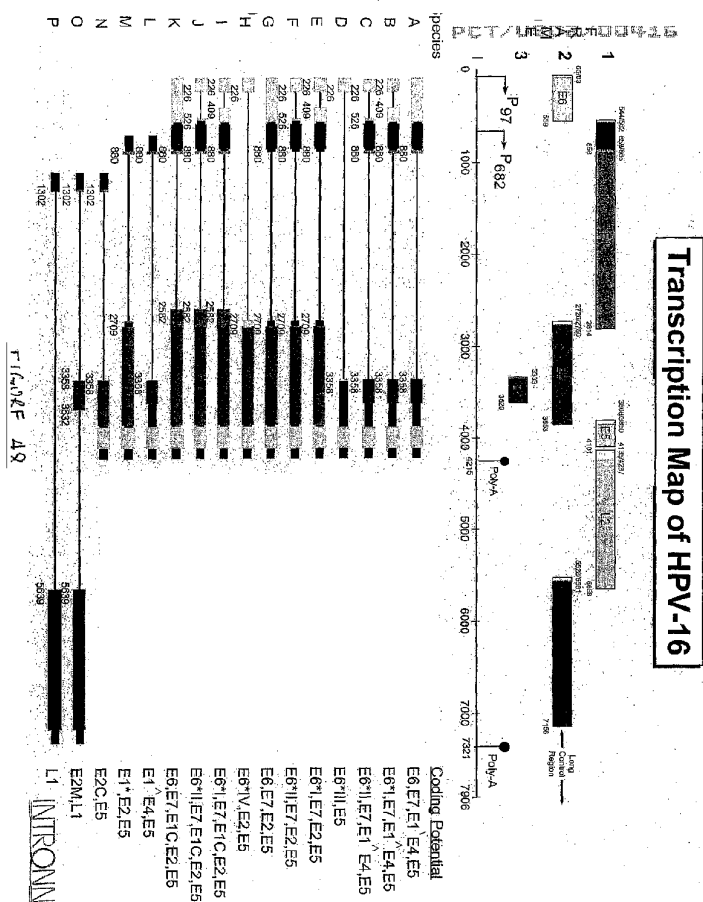
PCT/US02/00416

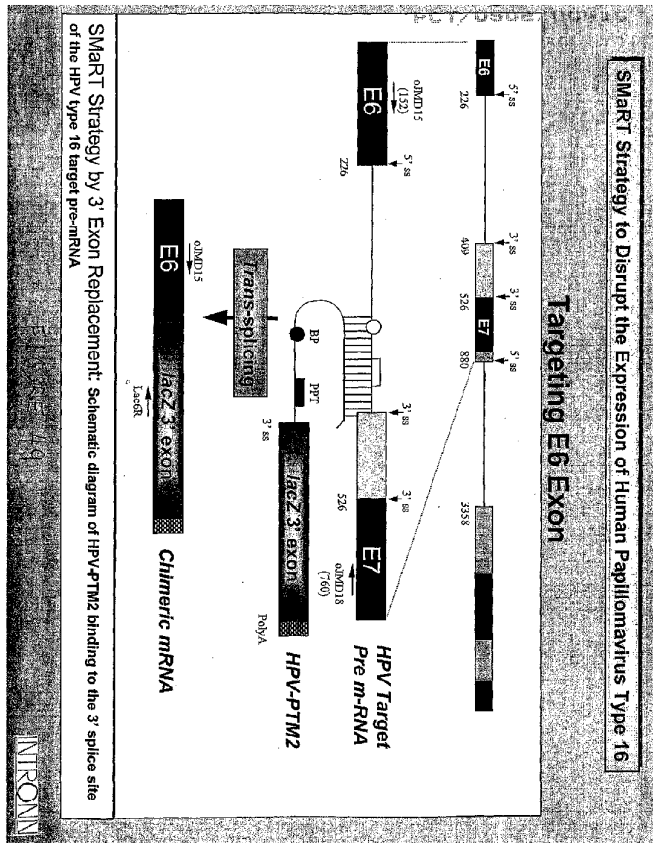


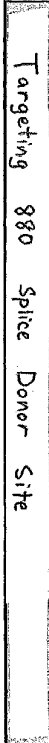
FLAG = C-terminal tag to be used to detect repaired factor VIII protein.

Figure 47B

70/89

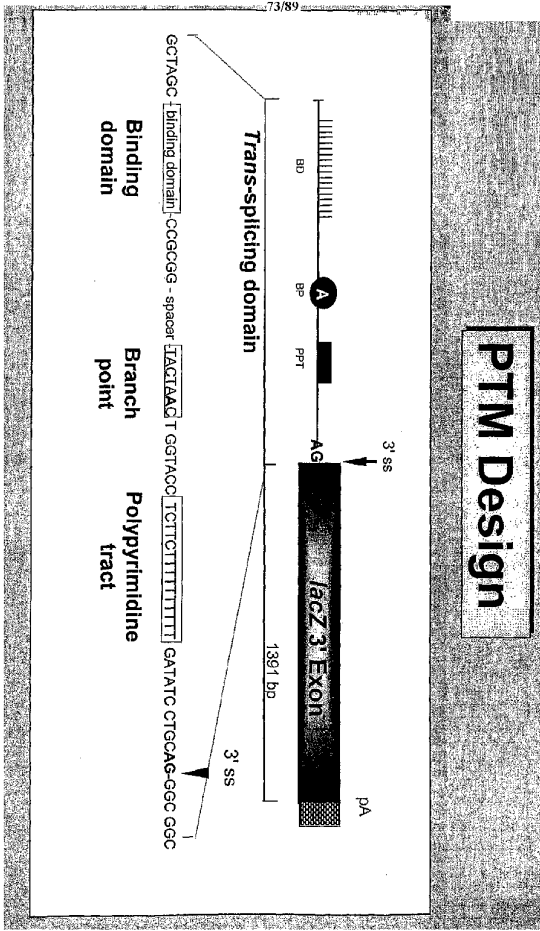






WO 02/053581

PCT/US02/00416

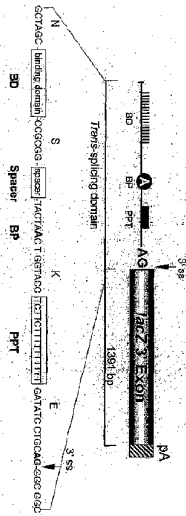


WO 02/053581

74/89

PCT/US02/00416

HPV-PTM1 with 80 bp binding domain targeted to 3' ss at 408:



Binding domain sequence: CAGTTAATAC AGCTAATTA CAATACAC AACGTTTGT TGTATTGCTG
TTCTAATGTT GTTGTATCA CAGTTAATCA CAGTTAATCA

A

HPV-PTM2 with 149 bp binding domain targeted to 3' ss at 408:



Binding domain sequence: CAGTTAATAC AGCTAATTA CAATACAC AACGTTTGT TGTATTGCTG
TTCTAATGTT GTTGTATCA CAGTTAATCA CAGTTAATCA
TTTAAATTA AAGCTTAA CATTATGAC ATACAGATA TCGATTCC

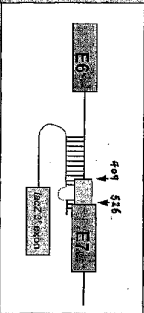
B

FIGURE 52

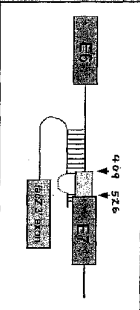
INTRON

Binding Domains of HPV-PTM3 and 4

HPV-PTM3 Binding domain (covers both 3' ss at 403 and 526, has 53 bp bubble)
GATGATCTGCACAGACATACATACACCGGTCCA (53 nt bubble) CTTGAGACACAGTGGCTTTTGAC
AGTTATTCACCTAATTAAACAATCACACGGTTGTGTATTCAGTCTTAATGTTTTCACATACACTA
TACAAAT



HPV-PTM4 Binding domain (covers both 3' ss at 403 and 526, has 76 bp bubble)
GAATATCTGCACACAGAC (76 nt bubble) GACACATGGCTTTTACAGTTAATACCTAATTACAAATC
ACACACGGTTTGTATTCAGTCTTAATGTTTTCACATACACTAAT

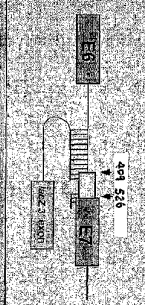


HPV-PTM5. Binding domain (140 nt, has 53 nt bubble, covers 3' ss at position 40q and 52s)

GATGATCTGGGACACAGACATCATCTGTAAGCGGTCGA. CTTCAGGACACAGAGGCTTTACAGCTTAATACACTCTATTTACCAATATACACACACAGG
 TTCTTTGATATACAGCTTCTAATGCTGTCTCCATACACACTATACAA

CCGT

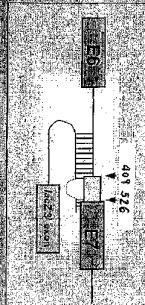
CCGT



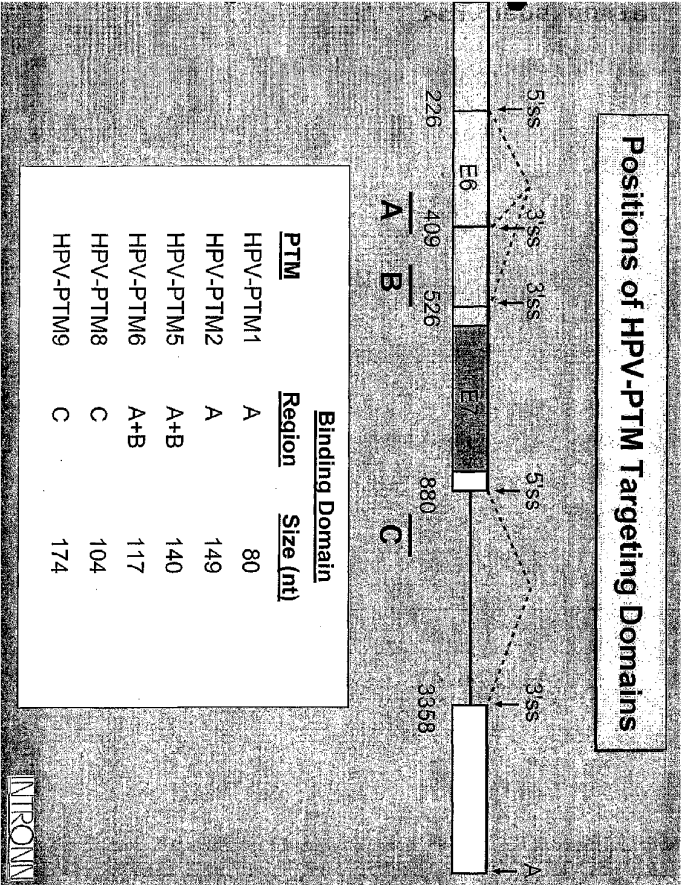
HPV-PTM6, binding domain (117 nt, has 76 nt bubble, covers 3' ss at position 409 and 526)

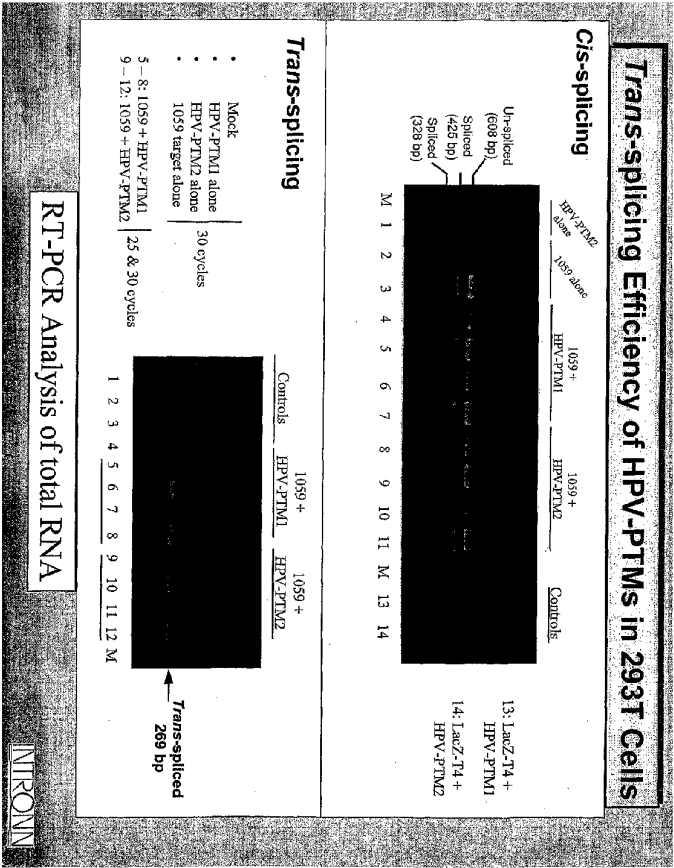
[illegible]

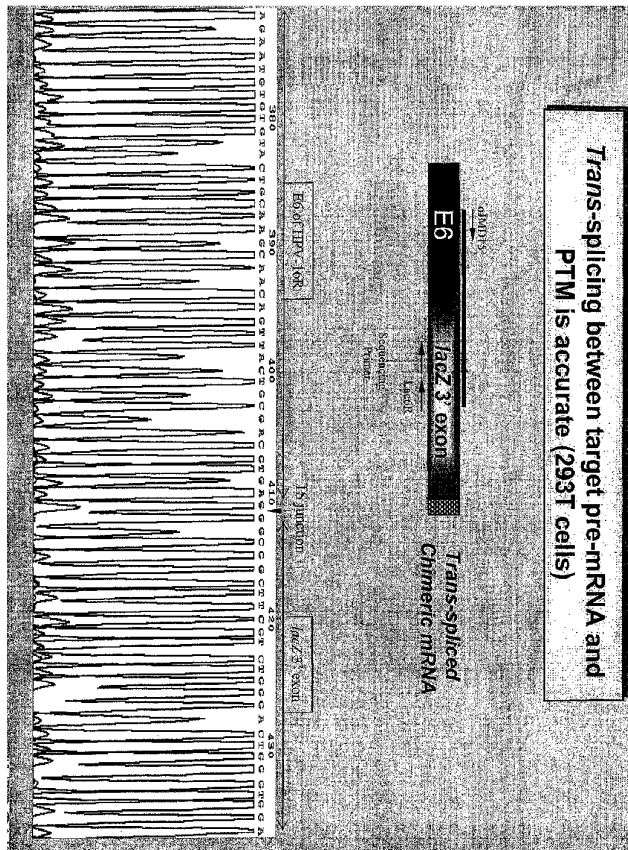
CCGT

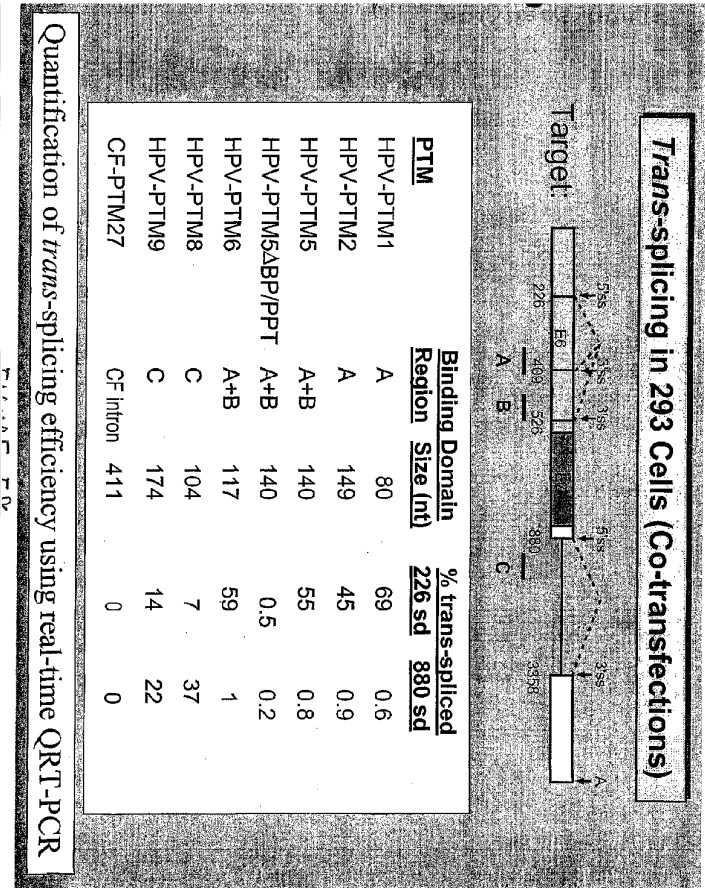


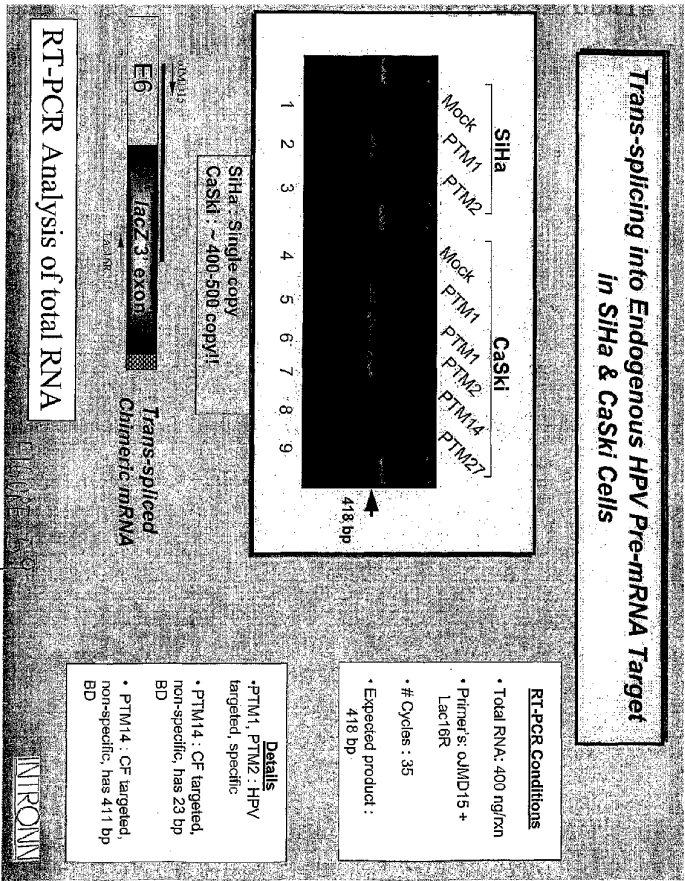
Note: Nucleotides in bold are modified to prevent PTMs cryptic splicing

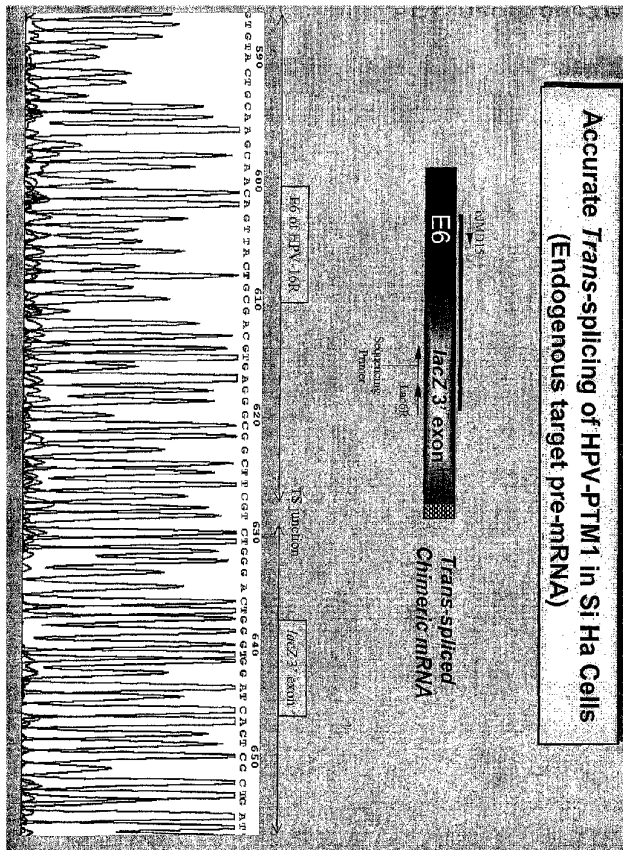








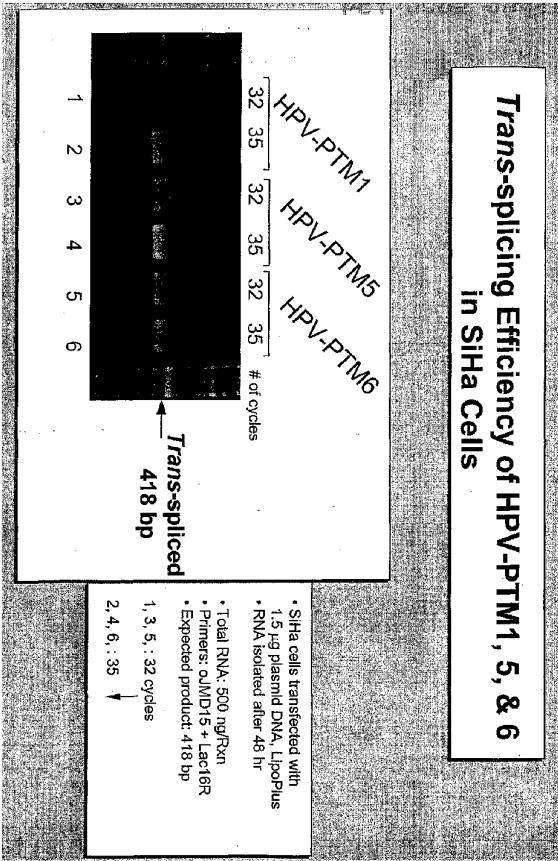




Trans-splicing in SiHa Transfections
(Endogenous target)

<u>PTM</u>	<u>% trans-spliced</u>
pcDNA3.1	0
HPV-PTM1	0.16
HPV-PTM5	0.12
HPV-PTM6	0.11
CF-PTM27	0

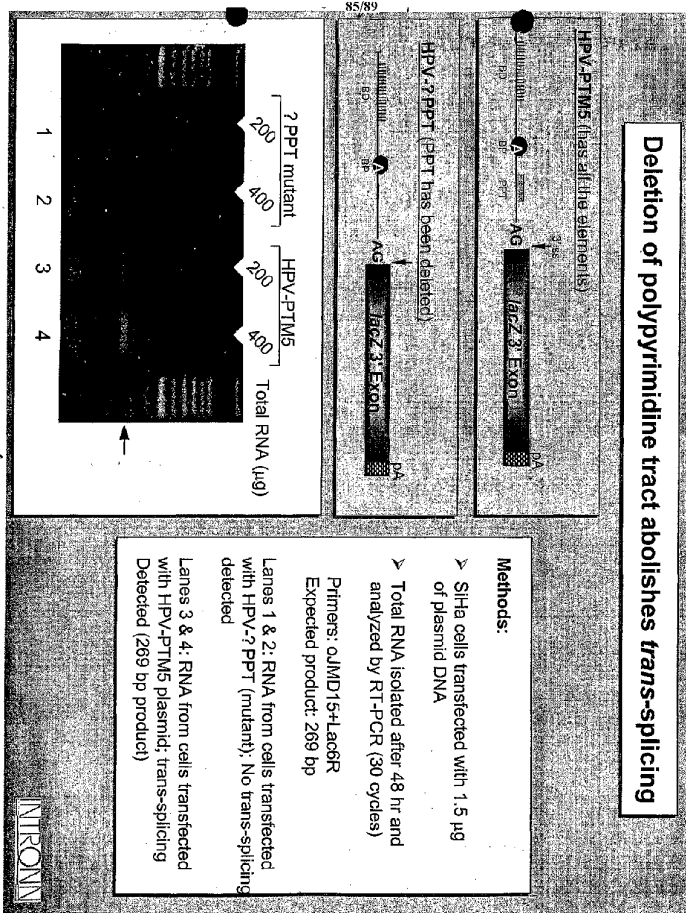
Quantification of *trans*-splicing efficiency using real-time QRT-PCR

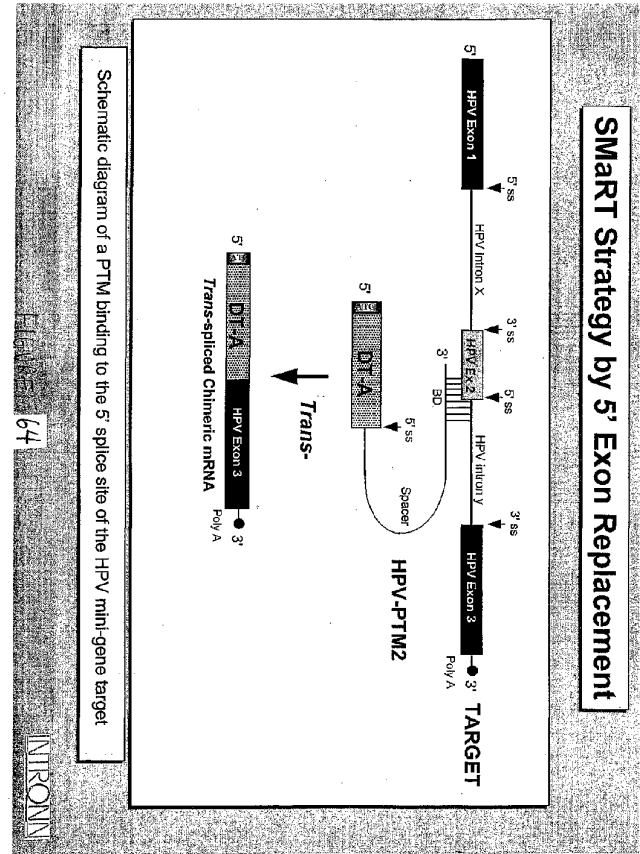


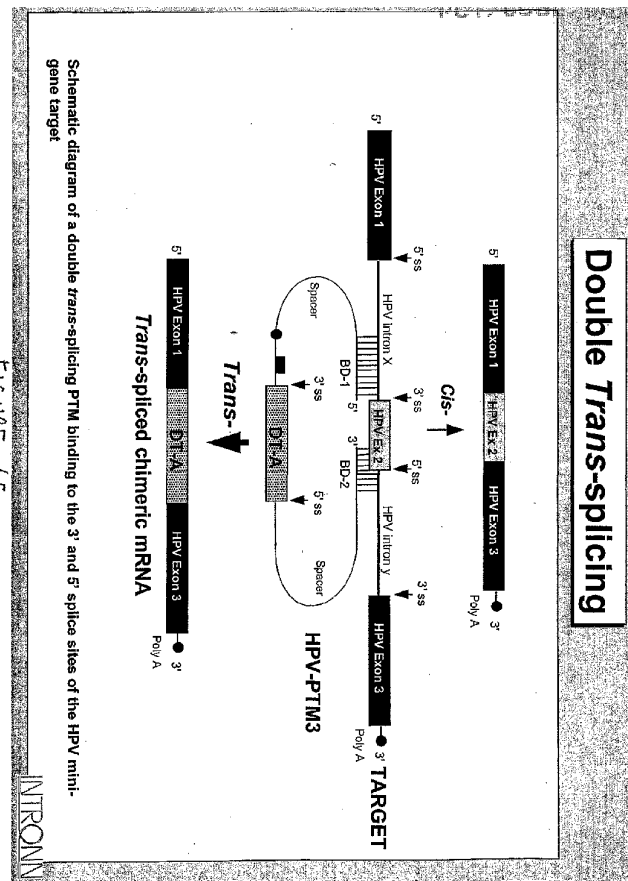
WO 02/053581

PCT/US02/00416

Deletion of polypyrimidine tract abolishes *trans*-splicing





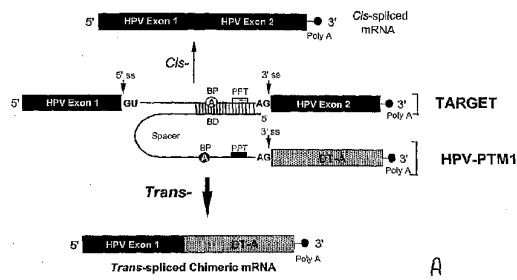


WO 02/053581

88/89

PCT/US02/00416

SMaRT Strategy by 3' Exon Replacement: Schematic diagram of a PTM binding to the 3' splice site of the HPV mini-gene target



SMaRT Strategy by 5' Exon Replacement: Schematic diagram of a PTM binding to the 5' splice site of the HPV mini-gene target

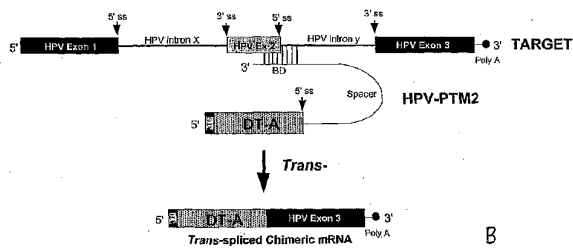


FIGURE 66

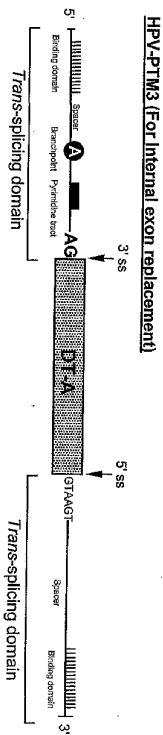


FIGURE 67

【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
11 July 2002 (11.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/053581 A3(51) International Patent Classification: C07H 21/02, (74) Agents: SEIDE, Rochelle, K, et al.; Baker Botts, L.L.P. 30
C12N 5/10, 15/09, C12P 19/34 Rockefeller Plaza, New York, NY 10112-0228 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/00416

(22) International Filing Date: 8 January 2002 (08.01.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09/756,095 8 January 2001 (08.01.2001) US
09/756,096 8 January 2001 (08.01.2001) US
09/756,097 8 January 2001 (08.01.2001) US
09/838,858 20 April 2001 (20.04.2001) US
09/941,492 29 August 2001 (29.08.2001) 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, GE, GR, GM, HN, 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, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(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, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

(71) Applicant: INTRONN, INC. [US/US]; 840 Main Campus Drive, Suite 3500, Raleigh, NC 27606 (US).

Published:

with international search report

(72) Inventors: MITCHELL, Lloyd, G.; 4500 Highgate Drive, Durham, NC 27713 (US); GARCIA-BLANCO, Mariano, A.; 12 Sanderling Court, Durham, NC 27713 (US); BAKER, Carl, C.; 10606 Crossing Creek Road, Potomac, MD 20854 (US); PUTTARAJU, Madanah; 416 Tall Oaks Drive, Durham, NC 27713 (US); MANSFIELD, Gary, S.; 1005 Prologue Road, Durham, NC 27712 (US); CHAO, Hengjun; 1000 Smith Level Road, D8, Carboro, NC 27510 (US).

(88) Date of publication of the international search report:
26 September 2002

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 02/053581 A3

(54) Title: SPLICEOSOME MEDIATED RNA TRANS-SPLICING

(57) Abstract: The molecules and methods of the present invention provide a means for *in vivo* production of a trans-spliced molecule in a selected subset of cells. The pre-trans-splicing molecules of the invention are substrates for a *trans*-splicing reaction between the pre-trans-splicing molecules and a pre-mRNA which is uniquely expressed in the specific target cells. The *in vivo trans*-splicing reaction provides a novel mRNA which is functional as mRNA or encodes a protein to be expressed in the target cells. The expression product of the mRNA is a protein of therapeutic value to the cell or host organism a toxin which causes killing of the specific cells or a novel protein not normally present in such cells. The invention further provides PTMs that have been genetically engineered for the identification of exon/intron boundaries of pre-mRNA molecules using an exon tagging method. The PTMs of the invention can also be designed to result in the production of chimeric RNA encoding for peptide affinity purification tags which can be used to purify and identify proteins expressed in a specific cell type.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/00416
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C07H 21/02; C12N 5/10; C12N 15/09; C12P 19/34 US CL : 435/91.3, 91.31, 320.1, 325, 455; 536/23.1 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) U.S. : 435/91.3, 91.31, 320.1, 325, 455; 536/23.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6,013,487 A (MITCHELL) 11 January 2000, see Figure 1A.	1-138
A	JONES et al. Tagging ribozyme reaction sites to follow trans-splicing in mammalian cells. Nature Medicine: June 1996, Vol. 2, No. 6, page 643, see abstract.	1-138
A	PHYLACTOU et al. Ribozyme-mediated trans-splicing of a trinucleotide repeat. Nature Genetics. April 1998, Vol. 18, No. 4, page 378, see abstract.	1-138
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* documents 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 03 June 2002 (03.06.2002)		Date of mailing of the international search report 01 JUL 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Janet L. Epps, Ph.D. Telephone No. 703-308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/00416

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

MEDLINE, USPAT, EPO, JPO, DERWENT

search terms: chimeric ran, trans-splicing, splice acceptor, splice donor, vector, ribozymes

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 09/838,858

(32)優先日 平成13年4月20日(2001.4.20)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 09/941,492

(32)優先日 平成13年8月29日(2001.8.29)

(33)優先権主張国 米国(US)

(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,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ミッチェル, ロイド, ジー.

アメリカ合衆国 2 7 7 1 3 ノースカロライナ州, ダーハム, ハイゲート ドライブ 4 5 0 0

(72)発明者 ガルシアーブランコ, マリアーノ, エー.

アメリカ合衆国 2 7 7 1 3 ノースカロライナ州, ダーハム, サンダーリング コート 1 2

(72)発明者 ベイカー, カール, シー.

アメリカ合衆国 2 0 8 5 4 メリーランド州, ポトマック, クロッシング クリーク ロード
1 0 6 0 6

(72)発明者 パッタラジュ, マダイアー

アメリカ合衆国 2 7 7 1 3 ノースカロライナ州, ダーハム, トール オークス ドライブ 4
1 6

(72)発明者 マンスフィールド, ゲイリー, エス.

アメリカ合衆国 2 7 7 1 2 ノースカロライナ州, ダーハム, プロローグ ロード 1 0 0 5

(72)発明者 チャオ, ヘンジュン

アメリカ合衆国 2 7 5 1 0 ノースカロライナ州, カルボーロ, スミス レベル ロード 1 0
0 0, ディー 8

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA20 BA38 BA80 CA04 CA12 DA01 DA02 EA02 EA04

FA04 GA11 HA08 HA09 HA12

4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46

4C084 AA06 AA13 BA35 CA53 NA20 ZB072 ZB262 ZB312