

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02826997.7

C12N 15/00

C12N 5/10

A61K 48/00

A61K 31/713

G01N 33/50

G01N 33/15

[43] 公开日 2005 年 5 月 4 日

[11] 公开号 CN 1612930A

[22] 申请日 2002.11.21 [21] 申请号 02826997.7

[30] 优先权

[32] 2001.11.21 [33] JP [31] 355896/2001

[86] 国际申请 PCT/JP2002/012183 2002.11.21

[87] 国际公布 WO2003/044188 日 2003.5.30

[85] 进入国家阶段日期 2004.7.9

[71] 申请人 三菱化学株式会社

地址 日本东京都

共同申请人 西乡薰

[72] 发明人 程久美子 梶隆英 上田龙 西乡薰

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 2 页 说明书 19 页 序列表 4 页
附图 5 页

[54] 发明名称 抑制基因表达的方法

[57] 摘要

本发明涉及一种抑制靶基因表达的方法，包括用包含与至少部分靶基因的核苷酸序列基本上相同的核苷酸序列的 DNA 和 RNA 的双链多核苷酸转染细胞、组织或单个的生物体。

ISSN 1008-4274

1. 一种抑制靶基因表达的方法，其包括用双链多核苷酸转染细胞、组织或单个的生物体，该双链多核苷酸包含具有至少与靶基因的部分核苷酸序列基本上相同的多核苷酸序列的 DNA 和 RNA。
2. 根据权利要求 1 的方法，其中双链多核苷酸包含自我互补的单链。
3. 根据权利要求 1 或 2 的方法，其中双链多核苷酸是 DNA 链和 RNA 链的杂交体。
4. 根据权利要求 3 的方法，其中 DNA 链和 RNA 链的杂交体包含有义链 DNA 和反义链 RNA。
5. 根据权利要求 1 或 2 的方法，其中双链多核苷酸是 DNA 和 RNA 嵌合体。
6. 根据权利要求 1-5 中任一项的方法，其中在双链多核苷酸中，至少多核苷酸的上游部分区域是 RNA。
7. 根据权利要求 6 的方法，其中上游部分区域由 9 到 13 个核苷酸组成。
8. 根据权利要求 1 至 6 中任一项的方法，其中双链多核苷酸由 19 至 25 个核苷酸组成，并且至少多核苷酸上游一半区域是 RNA。
9. 根据权利要求 1 至 8 中任一项的方法，其中靶基因有多个。
10. 一种分析基因功能的方法，包括由于通过权利要求 1 至 9 中任一项所述方法抑制靶基因表达，分析细胞、组织或单个生物体所显现的表型变化。
11. 一种赋予细胞、组织或单个生物体以特定特性的方法，包括利用权利要求 1 至 9 中任一项所述方法抑制靶基因的表达。
12. 根据权利要求 11 的方法所得到的细胞、组织或单个生物体。
13. 一种筛选用于预防和/或治疗与靶基因相关疾病的试剂的方法，包括将待测物质加入到根据权利要求 12 所述的细胞、组织或单个生物体中，并进而分析所赋予细胞、组织或单个生物体的特性改变。
14. 一种用于预防和/或治疗与靶基因相关疾病的试剂，包含根据权利要求 13 的方法所获得的物质作为活性成分。
15. 一种产生预防和/或治疗与靶基因相关疾病的试剂的方法，包括根据权利要求 13 的方法所选择出的物质制成药物制剂。

16. 一种根据权利要求 1 至 9 中任一项的方法,进一步的包括用包含编码指示蛋白的 DNA 的表达载体转染细胞、组织或单个生物体,继而选择和分析具有特定强度或更高强度的指示蛋白所产生的一定信号量的细胞、组织或单个生物体。

- 5 17. 一种根据权利要求 1 至 9 中任一项的方法,进一步的包括用包含编码指示蛋白的 DNA 的表达载体和包含与该 DNA 的至少部分核苷酸序列基本上相同的核苷酸序列的双链 RNA 转染细胞、组织或单个生物体,继而选择和分析指示蛋白所产生的信号量减弱的细胞、组织或单个生物体。

- 10 18. 根据权利要求 16 或 17 的方法,其中指示蛋白是其中该蛋白的量与该蛋白所产生的信号的量之间成比例变化的蛋白。

19. 根据权利要求 16 至 18 中任一项的方法,其中指示蛋白是荧光素酶。

- 15 20. 一种在 RNAi 方法中鉴定 RNA 的功能区域的方法,包括(i)制备具有与靶基因的至少部分核苷酸序列基本上相同的核苷酸序列之双链多核苷酸,包括 DNA 和 RNA 嵌合体; (ii) 用该双链多核苷酸转染细胞、组织或单
个的生物体; (iii) 在转染的细胞、组织或单个的生物体中测定靶基因的表达受到抑制的程度,和(iv) 鉴定对于抑制靶基因表达而必需是 RNA 的序列。

21. 根据权利要求 20 的方法,其中的双链多核苷酸中的任一条链是 RNA 链。

- 20 22. 在权利要求 1 至 11、13 及 15 至 21 任一项的方法中使用的双链多核苷酸。

23. 一种预防和/或治疗与靶基因相关疾病的试剂,至少包括根据权利要求 22 的的双链多核苷酸。

24. 一种用于实施权利要求 1 至 11、13 及 15 至 21 中任一项方法的试剂盒,至少包括根据权利要求 22 的双链多核苷酸。

抑制基因表达的方法

5 技术领域

本发明涉及一种抑制靶基因表达的方法，通过用包含与靶基因的至少部分核苷酸序列基本上相同的核苷酸序列的 DNA 和 RNA 的双链多核苷酸转染入细胞、组织或单个的生物体中进行的。

10 背景技术

抑制细胞、组织或单个生物体中靶基因表达的方法，包括下面一种方法(以下有时称为 RNAi 方法)，其中将双链 RNA 转染入细胞、组织或单个生物体中，而加速了与其序列同源的 mRNA 的降解，结果抑制了作为该 mRNA 的模板的基因的表达(该效果以下有时称为“RNAi 效果”)。至今，有
15 报道表明在植物个体(Waterhouse, P.M 等, Proc. Natl. Acad. Sci, 95, 13959-13964 (1998))、锥虫(Ngo, H 等, Proc. Natl. Acad. Sci, 95, 14687-14692 (1998))、水螅(Lohmann J.U.等, Dev. Biol., 214, 211-214 (1999))、三肠虫(Sanchez Alvarado 等, Proc. Natl. Acad. Sci, 96, 5049-5054 (1999))、线虫(Fire, A 等, Nature, 391, 806-811(1998))、果蝇(Kannerdell, J.R 等, Cell, 95, 1017-1026(1998); Misquitta, L 等, Proc. Natl. Acad. Sci, 96, 1451-1456(1999))利用
20 该技术是有效的。

此外，已有报道利用 19 个核苷酸的具有 2-核苷酸的 3'端突出的双链 RNA 可以在脊椎动物培养细胞中表现出 RNAi 效果，虽然该效果据报道仅限于脊椎动物(Elbashir, S 等, Nature, 411, 494-498 (2001))。下面要描述的在
25 基因功能鉴定中，筛选适合于生产有用物质的细胞系的方法，利用 RNAi 方法的优越性是很明显地，但问题是 RNA 非常容易被核糖核酸酶所降解，尤其以单链形式存在时，因而生产成本非常高。因此，期望能够找到一种高度稳定的多核苷酸以用于 RNAi 方法。

30 发明公开

本发明目的之一是提供一种抑制靶基因表达的方法，其中靶基因与多核苷酸序列的部分核苷酸有基本相同的核苷酸序列，该方法通过将 DNA 整合而被增强了稳定性的双链多核苷酸转染细胞、组织或单个生物体来实现的。

- 5 为达到的上述目的而进行了广泛的研究，本发明发现，仓鼠培养细胞、CHO-KI，用具有荧光素酶基因的部分碱基序列的 DNA 和 RNA 杂交体的双链多核苷酸，和 DNA 和 RNA 嵌合体的双链多核苷酸进行转染后，细胞中的荧光素酶基因的表达被抑制。这样，我们成功的完成了本发明。

也就是说，根据本发明，提供了下面第(1)到(24)项中描述的发明。

- 10 (1) 一种抑制靶基因表达的方法，其中包括用包含与靶基因的至少部分核苷酸序列基本上相同的核苷酸序列的 DNA 和 RNA 的双链多核苷酸转染细胞、组织或单个的生物体。

(2) 根据上述第(1)项的方法，其中双链多核苷酸包含自我互补的单链。

- 15 (3) 根据上述第(1)或(2)项的方法，其中双链多核苷酸是 DNA 链和 RNA 链的杂交体。

(4) 根据上述第(3)项的方法，其中 DNA 链和 RNA 链的杂交体包含有义链 DNA 和反义链 RNA。

- 20 (5) 根据上述第(1)或(2)项的方法，其中双链多核苷酸是 DNA 和 RNA 的嵌合体。

(6) 根据上述第(1)至(5)任一项的方法，其中在双链多核苷酸中，至少多核苷酸的上游部分区域是 RNA。

(7) 根据上述第(6)项的方法，其中上游部分区域由 9 到 13 个核苷酸组成。

- 25 (8) 根据上述第(1)至(6)任一项的方法，其中双链多核苷酸由 19 至 25 个核苷酸组成，并且多核苷酸至少上游一半区域是 RNA。

(9) 根据上述第(1)至(8)任一项的方法，其中靶基因有多个(plural)。

- 30 (10) 一种分析基因功能的方法，包括利用上述第(1)至(9)任一项所述方法而抑制了靶基因表达之后，分析细胞、组织或单个生物所显现的表型变化。

(11) 一种赋予细胞、组织或单个生物体以特定特性的方法，包括利用上述第(1)至(9)任一项所述方法以抑制靶基因的表达。

(12) 根据上述第(11)项的方法所得到的细胞、组织或单个生物体。

5 (13) 一种筛选用于预防和/或处理与靶基因相关疾病的试剂的方法，包括用待测物质加入到根据上述第(12)项的细胞、组织或单个生物体，并进而分析细胞、组织或单个生物体的特性改变。

(14) 一种用于预防和/或治疗与靶基因相关疾病的试剂，包含根据上述第(13)项的方法所获得的物质作为活性成分。

10 (15) 一种产生预防和/或治疗与靶基因相关疾病的试剂的方法，包括根据上述第(13)项的方法所选择出的物质制备药物制剂。

(16) 一种根据上述第(1)至(9)任一项的方法，进一步的包括用包含编码指示蛋白的 DNA 的表达载体转染细胞、组织或单个生物体，继而选择和分析具有指示蛋白所产生的信号量达到特定强度或更高的细胞、组织或单个生物体。

15 (17) 一种根据上述第(1)至(9)任一项的方法，进一步的包括用包含编码指示蛋白的 DNA 的表达载体和包含与 DNA 的至少部分核苷酸序列基本上相同的核苷酸序列的双链 RNA 转染细胞、组织或单个生物体，继而选择和分析指示蛋白所产生的信号量减弱的细胞、组织或单个生物体。

20 (18) 根据上述第(16)或(17)项的方法，其中指示蛋白是如下特性蛋白：其中蛋白的量与该蛋白所产生的信号的量之间成比例变化。

(19) 根据上述第(16)至(18)项任一项的方法，其中指示蛋白是荧光素酶。

25 (20) RNAi 方法中的一种鉴定 RNA 的功能域的方法，包括(i) 制备具有与靶基因的至少部分核苷酸序列基本上相同的核苷酸序列的双链多核苷酸，包括 DNA 和 RNA 嵌合体；(ii) 用该双链多核苷酸转染细胞、组织或单个的生物体；(iii) 在转染的细胞、组织或单个的生物体中测定靶基因的表达受到抑制的程度，和(iv) 鉴定对于抑制靶基因而言是所需的 RNA 的序列。

30 (21) 根据上述第(20)项的方法，其中双链多核苷酸中的任一条链是 RNA 链。

(22) 在上述第(1)至(11)、(13)及(15)至(21)中任一项的方法中使用的双链多核苷酸。

(23) 一种制备预防和/或治疗与靶基因相关疾病的试剂,至少包括根据上述第(22)项的的双链多核苷酸。

- 5 (24) 一种用于实施上述第(1)至(11)、(13)及(15)至(21)任一项的方法的试剂盒,至少包括根据上述第(22)项的双链多核苷酸。

附图简述

10 图 1 表示用于制备双链多核苷酸的由 21 个核苷酸组成的有义单链多核苷酸和由 21 个核苷酸组成的反义单链多核苷酸。对于每一条序列,左端为 5'末端,而右端为 3'末端,粗体部分为 RNA,有下划线的为 DNA。

图 2 表示的是用 DNA-RNA 杂交体双链多核苷酸转染 CHO-KI 细胞而抑制 *luc* 基因的表达。

15 图 3 表示 *luc* 基因的表达受抑制的图,其是在每一条有义链均为 RNA 而每一条反义链均是 DNA-RNA 嵌合体所组成的双链多核苷酸转染 S2 细胞情况下。

图 4 表示 *luc* 基因的表达受抑制的图,其中每一条反义链均为 RNA 而每一条有义链均是 DNA-RNA 嵌合体所组成的双链多核苷酸转染 Hela 细胞和 HEK293 细胞。

20 图 5 表示 *luc* 基因的表达受抑制的图,其中 DNA-RNA 嵌合体的双链多核苷酸转染 CHO-KI 细胞。

本发明的最佳实施方式

下面对本发明进行更详细的描述。

- 25 (1) 用于 RNAi 方法的包含 DNA 和 RNA 的双链多核苷酸

本发明是一种抑制靶基因表达的方法,包括用包含与靶基因的至少部分核苷酸序列基本上相同的核苷酸序列的 DNA 和 RNA 的双链多核苷酸转染细胞、组织或单个的生物体。

30 在本发明中,靶基因可以是任何基因,只要在用于转染的细胞、组织或单个的生物体中该基因可以产生 mRNA,任选地可以翻译成蛋白质(以下有时称为“受体”)。具体地说,它可以是待转化物的内源基因或转基因。此

外，可以位于染色体上的基因或染色体外的基因。染色体外基因的例子包括可来源于病原体如病毒、细菌、真菌或原生动物。功能可以是已知的也可以是未知的或者在其它生物体细胞中功能已知而在受体中是未知的。

包含具有与这些基因的至少部分核苷酸序列基本上相同的核苷酸序列的DNA和RNA的双链多核苷酸(以下有时称为“双链多核苷酸”)包含与可以是靶基因核苷酸序列中的任何部分的20个或更多个核苷酸基本上相同的序列。此外，“基本上相同”意指与靶基因的序列具有50%或更高，优选为70%或更高，更优选为80%或更高的序列同源性。核苷酸链的长度可以为19个核苷酸至靶基因的开放阅读框(ORF)的全长的任何长度，但具有19-500个核苷酸为优选地。然而，来源于哺乳动物的细胞中，已知信号传导系统可为具有长30或更多个核苷酸的RNA所激活。这被称为干扰反应(Mareus, P.I 等, Interferon, 5, 115-180(1983))。当这样的双链RNA导入到细胞中，许多基因的翻译起始受PKR(ds RNA反应型蛋白激酶: Bass, B.I, Nature, 411, 428-429(2001))的非特异性抑制，同时RNaseL被2', 5'寡聚腺苷酸化合成酶(Base, B.L, Nature, 411, 428 - 429(2001))活化导致细胞中的RNA非特异性降解。由于这些非特异性反应，对靶基因的特异性反应则被隐蔽起来。因此，利用来源于所述哺乳动物的哺乳动物个体或细胞或组织作为受体的例子中，双链多核苷酸由19-25个核苷酸组成，优选19-23个，更优选19-21个。本发明的双链多核苷酸并不必需是整个为双链，可以包括5'-或3'-端突出，突出末端可为1至5个核苷酸，优选为1至3个核苷酸，更优选为2个核苷酸。况且，最优选的例子中包括在每一条多核苷酸链的3'末端有2个核苷酸的3'端突出结构。双链多核苷酸意指多核苷酸其中部分互补而产生双链，也可以在通过自退火而发生自互补的单链多核苷酸情形。自互补的单链多核苷酸的例子包括那些反向重复等。

进一步，DNA和RNA的混合物、DNA链和RNA链的杂交体、DNA和RNA的嵌合体等均可使用。DNA链和RNA链组成的杂交体可以是任何一种，只要能够在转染受体时，靶基因可以受到抑制即可，但优选有义链为DNA而反义链为RNA。同时，DNA和RNA的嵌合体也可以是任何一种，只要在用其转染受体时，靶基因可以受到抑制即可。为提高双链多核苷酸的稳定性，优选地尽可能多地包含DNA。然而，本发明嵌合体类型的双链多核苷酸中，优选地，在发生表达抑制的范围内适当地测定对于抑制靶基

因表达而必需是RNA的序列,按如下描述对靶基因表达抑制程度进行分析。因此,也可以鉴定出在RNAi方法中的RNA的功能域。作为一个用于确定的优选地嵌合类型的例子,例如其中双链多核苷酸的上游部分区域是RNA。此处,上游部分区域意指有义链的5'侧的和反义链的3'侧。上游部分区域
5 优选地指上述双链多核苷酸的上游末端开始的9至13个核苷酸的区域。此外,嵌合类型双链多核苷酸的优选例子包括长19至21个核苷酸的双链核苷酸,其中上游一半区域是RNA,其余部分是DNA。况且,用这种双链多核苷酸,对靶基因表达的抑制效果高于整个反义链都是RNA。

制备双链多核苷酸的方法并不特别局限于但优选地是利用已知的化学
10 合成方法。在化学合成中,分别合成能够互补的单链多核苷酸,再通过适当的方式进行退火而获得双链。退火方法的具体例子包括将合成的单链多核苷酸优选地以至少约3:7的摩尔比进行混合,更优选以约4:6,最优选基本上等摩尔量进行混合(例如摩尔比为约5:5),加热到双链能够相互分开的温度后,再逐渐冷却。如果需要,退火后的双链多核苷酸通过已知的常用
15 方法进行纯化。纯化方法的例子包括通过琼脂糖凝胶电泳进行确认,任选地去除所保留的单链多核苷酸,例如用合适的酶进行降解去除。

此外,在制备的单链多核苷酸具有反向重复的情况下,即单链多核苷酸能够自互补时,可用化学合成等方法制备多核苷酸,然后通过上述相同的方式对自互补进行退火。

20

(2)用双链多核苷酸转染细胞、组织或单个生物体,和抑制靶基因的表达

用由此制备的双链多核苷酸转染的受体,只要其靶基因在细胞中能够
25 转录成RNA或翻译成蛋白质。具体地说,本发明所用的受体是指细胞、组织或单个生物体。

本发明所用的细胞可以是生殖细胞或体细胞、全能型或多能型细胞、
分裂细胞(dividing cell)或非分裂细胞、薄壁组织细胞或上皮细胞等。具体地说,所述细胞可以是未分裂细胞如干细胞、来自于器官或组织的细胞或其分裂的细胞。所述组织包括单细胞胚或组成性细胞(constitutional)、或多细
30 胞胚、胚胎组织等。此外,上述分裂细胞包括脂肪细胞、纤维原细胞、肌细胞、心肌细胞(cardiomyocytes)、内皮细胞、神经元、神经胶质细胞、血细

胞、巨核细胞、淋巴细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性细胞、嗜碱粒细胞、肥大细胞、白细胞、粒细胞、角质化细胞、软骨细胞、骨细胞、破骨细胞、肝细胞、及内分泌或外分泌腺的细胞。作为这些种类细胞的具体例子，如 CHO 细胞(RIKEN Cell bank)、果蝇 S2 细胞(Schneider, I.等, J. Embryol. Exp. Morph, 27, 353-365(1972))、人 Hela 细胞(ATCC:CCL-2)、人 HEK293 细胞(ATCC:CRL-1573)等是优选的。

此外，本发明用作受体的单个生物体具体包括植物、动物、原生动物(protozoan)、细菌、病毒或真菌的单个生物体。植物可以单子叶、双子叶或裸子植物；动物可以是脊椎动物或无脊椎动物。本发明中作为受体的优选细菌是那些在农业或工业中利用的微生物，及那些对于植物或动物的致病性的微生物。真菌包括霉菌和酵母形态的。脊椎动物的例子包括鱼和哺乳动物，如牛、山羊、猪、绵羊、仓鼠、小鼠、大鼠、猴和人；无脊椎动物包括线虫和其它蠕虫、果蝇和其它昆虫。

将双链多核苷酸转染进入到受体的方法，包括如果受体是细胞或组织则可采用磷酸钙法、电穿孔法、脂转染法、病毒感染法、浸泡于双链核苷酸溶液中、转化等方法。此外，转染胚胎的方法，可采用如微注射、电穿孔法、病毒感染等。如果受体是植物，可采用注射或灌注到植物的孔腔(cavity)、间质细胞中等或者采用喷雾的方法。如果受体是动物个体，可采用系统转染如口服、体表(topical)、肠胃外(包含皮下、肌内和静脉内施用)、经阴道的、经直肠的、鼻内、经眼的(transocular)或腹膜内注射、或电穿孔法或病毒感染等方法。作为口服转染方法，双链多核苷酸可直接与用于生物的食品进行混合。此外，对单个生物体的转染中，例如可通过给予包埋的长期释放制剂等或通过转染受体摄取双链多核苷酸。

用于转染的双链多核苷酸的量可依据受体和靶基因来进行合适的选择，但转染的多核苷酸地量优选地足以使每一个细胞至少有一个拷贝。具体地说，当受体是人培养细胞，并采用磷酸钙法时，例如，量优选为 0.1 到 1000nM。

此处，两种或更多种类型的双链多核苷酸可以同时进行转染。在这种情况下，通过用多核苷酸进行转染后，期望对细胞、组织或单个生物体中的两个或更多个靶基因的表达进行抑制(这种受体以下称为“转染的受体”)。

在本发明中，“靶基因表达的抑制”不仅仅指完全抑制，也指 mRNA 或蛋白的表达量的抑制率为 20% 或更高。靶基因表达受抑制的程度，可以通过比较用双链多核苷酸转染和未转染的受体中靶基因的 RNA 量积累或编码产生的蛋白质量来确定。mRNA 量可以通过已知常规的方法来进行测定。

- 5 具体地说，可采用 Northern 杂交分析、定量反转录 PCR、原位杂交等。况且，产生的蛋白质量可通过 Western 印迹分析或对靶基因编码的酶活性来确定。

(3) 通过在转染的受体中抑制基因表达来分析基因功能的方法

- 10 通过分析被转染受体的表型改变以作为本发明的双链多核苷酸转染受体后而抑制基因表达的结果，因而可以通过双链多核苷酸的转染来鉴定靶基因的功能。

- 此处，靶基因可以是功能已知的或在受体中功能未知的。相应于靶基因的双链多核苷酸的制备可按上述(1)中所描述的方法进行，并按类似于上述(2)中描述的方式以转染进入到受体中。在转染的受体中分析改变的表型并没有特别地限制，举例来说，包括生物体的性质如转染的受体的形态、转染的受体中物质的含量、转染受体分泌物质的量、转染受体物质的动态变化、转染受体之间的附着性、转染受体的迁移性或转染受体的寿命。如果靶基因在其它生物体中功能是已知的，优选分析与其功能相关的表型。
- 15 作为一种分析表型变化的手段之一，在分析转染的受体的形态改变情况下，可以能够利用显微检测或目视检测。此外，当以 mRNA 作为转染受体中物质时，可采用分析其含量的方法包括 Northern 杂交、定量反转录 PCR、原位杂交等。在蛋白质情况时，可采用分析其含量的方法包括用靶基因编码的蛋白质作为抗原与相应抗体进行 Western 印迹、测定靶基因编码蛋白的酶
- 20 活性。如果通过分析由于靶基因的表达受到抑制而仅在转染受体中出现表型改变，这可以鉴定出靶基因的功能。
- 25

(4) 用双链多核苷酸转染而抑制靶基因的表达，赋予细胞、组织或单个生物体以特定性能

- 30 利用本发明双链多核苷酸转染而抑制靶基因的表达，可以赋予细胞、组织或单个生物体以特定性能。所谓特定性能指转染受体中由于靶基因表

达受到抑制后出现的特性。此处，靶基因可以是这样的基因，它通过抑制其表达赋予转染受体的特性已被弄清楚、或者它的功能或在转染受体中的功能是未知的。在靶基因的功能是未知的情况下，通过对用双链多核苷酸转染后的受体所呈现的表型中选择预期表型，获得赋予了预期特性的转染受体。

赋予给转染受体的预期特性的具体例子包括胞内生产性功能、抑制胞外分泌的功能、细胞或 DNA 损伤的修复功能、对特定疾病的抗性功能等。具体地说，如果转染受体是植物个体等，靶基因包括与果实成熟有关的酶、植物结构蛋白、致病性等相关基因。

10 当靶基因表达被抑制后具有对特定疾病的抗性功能时，是指特定蛋白的表达量增加将导致特定疾病的发生，其靶基因包括编码该上述蛋白的基因、或编码了能够控制该上述蛋白表达的蛋白基因等。作为一个具体地例子，靶基因是导致癌症/肿瘤表型停滞(retention)所必需的基因，其受体是肿瘤细胞、肿瘤组织等。

15 既然针对靶基因的双链多核苷酸能够抑制靶基因编码的蛋白质的表达，该多核苷酸可以用作治疗或预防与靶基因相关联的疾病。所述双链多核苷酸用作上述药物制剂的活性成分，所述多核苷酸可以单独使用但也可与药物学可接受的载体一起制备药物组合物剂型。所述活性成分相对于此时载体的重量比为 1 至 90%。此外，这种药物制剂可通过不同的方式进行给药，所述给药方式包括口服片剂、胶囊剂、颗粒剂、粉剂、糖浆等、或者非肠道给药如注射、滴注、脂质体、栓剂等。此外，可根据症状、年龄、体重等来选择合适地给药方式。

25 用针对这种基因的双链多核苷酸转染的受体的选择依赖于与抑制该基因的表达相关的预期表型。而且，用于转染的双链多核苷酸中，连接有编码特定遗传标记如荧光蛋白的序列时，可以基于与双链多核苷酸一起转染的荧光蛋白表达量的抑制程度来进行筛选。其中，当作为靶基因的是具有癌抑制功能的基因时，用于筛选的细胞特征包括恶性肿瘤特征，如生长能力的增加、细胞粘着性的降低或细胞的游动性(迁移)增加等。此外，当用作靶基因的是控制生物节律的基因时，可用于筛选的细胞特性包括昼夜节律的消失等。进一步，当涉及由环境诱变导致作为 DNA 损伤的修复的基因用作靶基因时，用于筛选的细胞特性包括表现出对突变的敏感性等。

可根据适合每种受体的本领域已知的克隆技术，以建立和获得筛选的转染受体为系。具体而言，当受体是细胞时，转染受体的细胞系可采用常规培养细胞的建立细胞系方法如有限稀释法、或利用药物抗性标记的方法来建立和获得。本发明中可得到的转染受体，其中被赋予了特定功能可以是增加了产生或分泌一种有用物质的效率的细胞系、对细胞或 DNA 等环境因子提供损伤有更高的敏感性的细胞系、或者呈现与疾病相关特性的作为治疗疾病的模型。

其中，获得作为治疗疾病模型的细胞系的方法作为本发明一个具体应用的例子。可选择基因表达量降低或缺乏该基因将导致疾病的那些基因作为靶基因。具体地说，例如 Alzheimer 病的 PS1 基因、着色性干皮综合症 (Xeroderma Pigmentosum Syndrome) 中的 XPA/XPD/XPF/XPG 基因和 DNA 聚合酶 η 基因、结肠癌中的 APC 基因、乳癌中的 BRCA1/BRCA2 基因、糖尿病中的 INS/INSR 基因等。

例如用包含与至少部分人基因的核苷酸序列基本上相同的核苷酸序列的 DNA 和 RNA 的双链多核苷酸转染来源于人的培养细胞，即可以获得人疾病模型细胞。

进而，将待测物质与赋予了特定特性的细胞、组织或单个生物体接触，分析与基因相关的疾病的症状是否出现或特性改变是否表现，也可能筛选出用于治疗 and/或预防上述疾病的物质。

通过上述筛选选择出的物质作为上述药物制剂的活性成分时，该物质可单独使用但也可与药理学可接受的载体一起制备药物组合物剂型。所述活性成分相对于此时载体的重量比为 1 至 90%。此外，这种药物制剂可通过不同的方式进行给药，所述给药方式包括口服片剂、胶囊剂、颗粒剂、粉剂、糖浆等、或者非肠道给药如注射、滴注、脂质体、栓剂等。此外，可根据症状、年龄、体重等来选择合适地给药方式。

(5) 用指示基因表达量受抑制的程度作为指标进行初步筛选的使用方法

在上述(1)至(4)中描述的本发明方法是用包括与靶基因的至少部分核苷酸序列基本上相同的核苷酸序列的 DNA 和 RNA 的双链多核苷酸转染受体的方法。然而，在本发明方法中，进一步的转染是用(a)包含编码了指示蛋

白的 DNA 的表达载体, (b)包括与编码指示蛋白的至少部分核苷酸序列基本上相同的核苷酸序列的 DNA 和 RNA 的双链多核苷酸, 并利用指示蛋白所产生的信号量作为度量对转染受体进行初步筛选, 只有其中基因表达受到抑制的转染受体被分析, 因此可以进行有效率的分析。

- 5 作为本发明进一步的具体例子, 下面描述以来源于脊椎动物的培养细胞用作受体, 荧光蛋白作为指示蛋白。来源于脊椎动物的培养细胞用包含编码荧光蛋白的 DNA 的表达载体进行转染, 并对细胞进行培养, 继而以特定强度或更高的指示蛋白所产生的信号量来对细胞进行筛选。在这里选择出的细胞进一步用包括与编码指示蛋白的至少部分 DNA 的核苷酸序列基本上相同的核苷酸序列的 DNA 和 RNA 的双链多核苷酸进行转染, 培养细胞,
- 10 继而以指示蛋白产生的荧光减弱的程度来分析指示基因表达受抑制的程度。

- 由于这种各初步筛选确证了双链多核苷酸对受体的转染以及在转染受体中靶基因表达出现的抑制, 指示蛋白应当是显示蛋白量与所产生的信号
- 15 适量之间相关联的那些蛋白。这种蛋白具体地例子包括荧光素酶蛋白。

 进而, 在测定靶基因表达受抑制的程度时, 或基于指示蛋白的表达量而计算出靶基因编码的蛋白量。

(6)本发明的试剂盒的应用

- 20 用于进行上述(1)至(5)中描述的方法的试剂盒包含: 双链多核苷酸、含有编码指示蛋白的 DNA 的载体, 包含与指示基因的至少部分核苷酸序列基本上相同的核苷酸序列的 DNA 和 RNA 的双链多核苷酸, 如酶和缓冲液的试剂、用于转染多核苷酸的试剂等。在本发明中, 试剂盒并不必需包含所有这些试剂, 而只要能够用于上面描述的方法, 则试剂盒可以是包含上述
- 25 试剂的任何组分之间的组合。

实施例

- 下面通过实施例来对本发明进行更详细地描述, 但下述实施例应当解释成有助于获得对本发明更具体的理解, 因此本发明的范围不受下面实施
- 30 例的任何限制。

实施例 1 将双链 DNA - RNA 杂交体转染到 CHO-KI 细胞而抑制靶基因的表达

(1) DNA - RNA 杂交体双链多核苷酸的制备

靶基因是 *Photinus pralis* 的荧光素酶基因(*P. pyralis luc* 基因: 登录号 U47296), pGL3 - 对照载体(Promega 生产)用作包含该靶基因的表达载体。在所述载体中, *P. pyralis luc* 基因片断位于 SV40 和多聚腺苷信号序列之间。*Renilla reniformis* 的荧光素酶基因作为指示基因, pRL-TK(Promega 生产)用于含有该基因的表达载体。

在该实施例中,用于制备双链多核苷酸的有义链的 21 个核苷酸,如 SEQ ID NO:1(DNA)或 SEQ ID NO:2(RNA)所示。而反义链由 SEQ ID NO:3(DNA)或 SEQ ID NO:4(RNA)表示。利用这些序列,按图 1 所示方法制备 DNA 或 RNA 的嵌合型单链多核苷酸。通过 Hitachi Instruments Service Co. Ltd 委托 Genset K.K. 合成的这些多核苷酸。有义链多核苷酸的序列相应于 *P.pyralis luc* 基因(总长度为 1653 个碱基对)的第 38 至 58 位核苷酸,其是 pGL3-对照载体中的靶基因。

用于抑制 *P.pyralis luc* 基因的双链 RNA、双链 DNA 和双链 DNA - RNA 杂交体通过有义链 FLs1(RNA)或 DELs1(DNA)与反义链 Fla2(RNA)或 DELa2(DNA)退火制备而成。退火是将存在于 10 mM Tris-HCl(pH 7.5)和 20 mM NaCl 反应液中的有义单链多核苷酸和反义单链多核苷酸于 90℃加热 2 分钟,进而于 37℃温育 1 小时,后将其静置冷却到室温。这样,有义链和反义链经退火形成双链多核苷酸。通过 2% 琼脂糖凝胶于 TBE 缓冲液中进行电泳来分析双链多核苷酸是否形成。在上述条件下,几乎每一个单链多核苷酸都被退火形成双链多核苷酸。

25 (2) 将靶基因、指示基因和双链多核苷酸转染至培养细胞

CHO - KI(RIKEN Cell Bank)用作培养细胞,其培养基是 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(Gibco BRL 生产)中附加失活的 10% 牛胎血清(Mitsubishi Kasei Corporation 生产)、作为抗生素的 10 单位/ml 青霉素(Meiji 生产)和 50μg/ml 链霉素(Meiji 生产)。细胞在含 5% CO₂ 的条件下于 37℃进行培养。

30 CHO - KI 细胞以 0.3×10^6 细胞/ml 的浓度涂布于 24 孔平板。1 天后,用磷酸钙沉淀法(Saibo Kogaku Handbook, edited by Toshio Kuroki 等, Youdosha

(1992))将 1.0 μg pGL3 对照载体 DNA、0.5 μg pRL-TK DNA 及 0.01、0.1、1、10 或 100 nM 的每一种双链多核苷酸对细胞进行转染。

(3) 测定培养细胞中的基因表达

- 5 20 小时后，收集按上述实施例 1(2)制备的细胞，并用 Dual-Luciferase Reporter Assay System(Promega 生产)对两种类型的荧光素酶(*Photinus pyralis* luc 和 *Renilla reniformis* luc)蛋白的表达量(荧光素酶活性)进行测定。荧光的测定采用 Lumat LB9507 光度计(EG&G Berthold)。

10 转染进 CHO - KI 细胞中的基因表达被 DNA - RNA 杂交体类型的双链多核苷酸所抑制(图 2)。所有的值表明，相对于指示基因的表达量(荧光素酶的酶活性)，所有的值显示靶基因产物没有活性。这里显示的是三次实验的平均值，图中的垂直条代表着标准差。与没有用双链多核苷酸转染的对照组相比，在添加 100 nM 双链多核苷酸时，双链 RNA 进行转染的组中可观察到对靶基因的表达抑制率达 96%，而在具有有义链 DNA 及反义链 RNA

15 的双链多核苷酸转染的组中可观察到 80%抑制率。也就是说，即使双链多核苷酸中的有义链为 DNA，而当反义链为 RNA 时，在 CHO - KI 细胞中也可观察到对基因表达的抑制，虽然其抑制效果相对于双链 RNA 而言要弱一些。

20 实施例 2 将 DNA - RNA 嵌合型双链多核苷酸转染果蝇 S2 细胞，以抑制靶基因的表达

(1) DNA - RNA 嵌合型双链多核苷酸的制备

25 *Photinus pyralis* 的荧光素酶基因(*P. pyralis* luc 基因：登录号：U47296)用作靶基因。而 *Renilla reniformis* 的荧光素酶基因用作指示基因。此外，表达载体采用描述于实施例 1 中的表达载体。

30 在该实施例中，用于制备双链多核苷酸的是有义链的 21 个核苷酸，如 SEQ ID NO:1(DNA)或 SEQ ID NO:2(RNA)所示。而反义链由 SEQ ID NO:3(DNA)或 SEQ ID NO:4(RNA)表示。利用这些序列，按图 1 所示方法制备含 DNA 或 RNA 的嵌合型单链多核苷酸。通过 Hitachi Instruments Service Co. Ltd 委托 Genset K.K. 合成这些多核苷酸。

用于抑制 *P.pyralis luc* 基因的 DNA - RNA 嵌合型双链多核苷酸通过有义链 FLs1(单链 RNA)分别与反义链 Fla2-1、Fla2-2、Fla2-3、Fla2-4、Fla2-5、Fla2-6、Fla2-7、Fla2-8、Fla2-9、Fla2-10(DNA - RNA 嵌合型单链多核苷酸)经退火制备而成。有义单链 RNA 和反义 DNA - RNA - 嵌合型单链多核苷酸的退火反应按实施例 1 中描述的类似方式进行。通过 2% 琼脂糖凝胶于 TBE 缓冲液中进行电泳来分析双链多核苷酸的形成。

(2) 将靶基因、指示基因和 DNA - RNA 嵌合型双链多核苷酸转染培养细胞

10 果蝇 S2 细胞(Schneider I.等, J. Embryol. Exp. Morph., 27, 353-365(1972))作为培养细胞, 其培养基是 Schneider 改良 Eagle 培养基(Gibco BRL 生产)中附加失活的 10% 牛胎血清(Mitsubishi Kasei Corporation 生产)、作为抗生素的 10 单位/ml 青霉素(Meiji 生产)和 50 μ g/ml 链霉素(Meiji 生产)。细胞在含 5% CO₂ 的条件下于 25 $^{\circ}$ C 进行培养。

15 S2 细胞以 1.0×10^6 细胞/ml 的浓度涂布于 24 孔平板。1 天后, 用磷酸钙沉淀法(Saibo Kogaku Handbook, edited by Toshio Kuroki 等, Youdosha (1992))将 1.0 μ g pGL3 对照载体 DNA、0.05 μ g pRL-TK DNA 及 100 nM 的每一种双链多核苷酸对细胞进行转染。

20 (3) 测定培养细胞中的基因表达

20 小时后, 收集按上述实施例 2(2)制备的细胞, 并用 Dual-Luciferase Reporter Assay System(Promega 生产)对两种类型的荧光素酶(*Photinus pyralis luc* 和 *Renilla reniformis luc*)蛋白的表达量进行测定。荧光的测定采用 Lumat LB9507 光度计(EG&G Berthold)。

25 转染进 S2 细胞中的基因表达被长 21 个核苷酸的 DNA - RNA 嵌合型双链多核苷酸所抑制(图 2)并制备使得有义链固定为 RNA, 而反义链是 DNA 和 RNA 的嵌合型多核苷酸(图 3)。所有确定的值作为相对于指示基因表达量(荧光素酶活性)与靶基因产物的相对活性, 且其值显示的是三次实验的平均值和标准差。与没有用双链多核苷酸转染的对照组相比, 反义链为 Fla2、
30 Fla2-2、Fla2-3、Fla2-8 或 Fla2-9 的双链多核苷酸强烈抑制了基因的表达, 分别达约 96%、92%、94%、91%或 96%。具有 Fla2-5 反义链的多核苷酸

显示了相对较强的抑制率即 73 %。Fla2-1、Fla2-4、Fla2-6、Fla2-7 或 Fla2-10 反义链的多核苷酸没有抑制效果或即使能够观察到也是极弱的抑制效果。显示了强抑制效果的双链多核苷酸的一个共同特性是从反义链序列的 5'端开始第 13 和 14 位的两个核苷酸是 RNA(UA)。另一方面, 显示很弱抑制效果的双链多核苷酸中, 其反义链序列上的这两个相应的核苷酸是 DNA(TA)。因此, 在该利用了 S2 细胞的实施例中, 表明这两个核苷酸是结构域所必需的并足以显示强的 RNAi 效果。

在本实施例中, 甚至在其中反义序列上包含这个区域的部分保留为 RNA 而其它部分用 DNA 取代的双链多核苷酸进行转染也可以观察到 RNAi 效果。21 个核苷酸的双链多核苷酸可根据本实施例和其它技术所用方法来鉴定或预测对于 RNAi 效果必需和足够的区域来进行制备, 将保持含该区域部分为 RNA 而其它部分用 DNA 取代被认为能够通过 RNAi 效果而抑制靶基因的表达。

15 实施例 3 将 DNA - RNA 嵌合型双链多核苷酸转染人 Hela 细胞和人 HEK293 细胞, 以抑制基因的表达

(1) DNA - RNA 嵌合型双链多核苷酸的制备

P. pyralis luc 基因用作靶基因, pGL3-对照载体(Promega 生产)用于构建包含该基因的表达载体。此外, Renilla reniformis 的 luc 基因用作指示基因, 而 pRL-TK(Promega 生产)用于构建包含该基因的表达载体。

在该实施例中, 用于制备双链多核苷酸的是有义链的 21 个核苷酸, 如 SEQ ID NO:1(DNA)或 SEQ ID NO:2(RNA)所示。而反义链由 SEQ ID NO:3(DNA)或 SEQ ID NO:4(RNA)表示。利用这些序列, 按图 1 所示方法制备 DNA 或 RNA 的嵌合型单链多核苷酸。通过 Hitachi Instruments Service Co. Ltd 委托 Genset K.K. 合成这些多核苷酸。有义链多核苷酸相应于 P.pyralis luc 基因(总长度为 1653 个碱基对)的第 38 至 58 位核苷酸, 其是 pGL3-对照载体中的靶基因。

用于抑制 P.pyralis luc 基因的 DNA - RNA 嵌合型双链多核苷酸通过有义链 FLs1 - 1 或 FLs1 - 2 (DNA - RNA 嵌合型单链多核苷酸)与反义链 Fla2 (单链 RNA)经退火制备而成。有义 DNA - RNA - 嵌合型单链多核苷酸和反

义单链 RNA 的退火反应按实施例 1 中描述的类似方式进行。通过 2 % 琼脂糖凝胶于 TBE 缓冲液中进行电泳来分析双链多核苷酸产物。

5 (2) 将靶基因、指示基因和 DNA - RNA 嵌合型双链多核苷酸转染培养细胞

将描述于上述(1)中的 pGL3 - 对照载体用作表达靶基因的重组表达载体, 描述于上述(1)中的 pRL - TK 用作表达指示基因的表达载体。人 HeLa 细胞(ATCC:CCL-2)、人 HEK293 细胞(ATCC:CRL-1573)用作培养细胞。其培养基应用 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(Gibco BRL 生产)中附加失活的 10 % 牛胎血清(Mitsubishi Kasei Corporation 生产)、作为抗生素的 10 单位/ml 青霉素(Meiji 生产)和 50 μ g/ml 链霉素(Meiji 生产)。细胞在含 5 % CO₂ 的条件下于 37 $^{\circ}$ C 进行培养。

HeLa 细胞、HEK293 细胞分别以 0.5×10^6 细胞/ml 和 0.25×10^6 的浓度涂布于 24 孔平板。1 天后, 用磷酸钙沉淀法(Saibo Kogaku Handbook, edited by Toshio Kuroki 等, Youdosha (1992))将 1.0 μ g pGL3 对照 DNA、1.0 μ g pRL-TK DNA 及 100 nM 的每一种双链多核苷酸对细胞进行转染。

(3) 测定培养细胞中的基因表达

正如实施例 1, 在 20 小时后, 收集按上述实施例 3(2)制备的细胞, 并用 Dual-Luciferase Reporter Assay System(Promega 生产)对两种类型的荧光素酶(*Photinus pyralis luc* 和 *Renilla reniformis luc*)蛋白的表达量进行测定。荧光的测定采用 Lumat LB9507 光度计(EG&G Berthold)。

转染进 HeLa 细胞、HEK293 细胞中的基因表达被长 21 个核苷酸的 DNA - RNA 嵌合型双链多核苷酸所抑制(图 4), 并制备以使得双链的反义链固定为 RNA, 而有义链是 DNA 和 RNA 的嵌合型多核苷酸。所有确定的值作为相对于指示基因(荧光素酶活性)与靶基因产物的相对活性, 且其值显示的是三次实验的平均值和标准差。与没有用双链多核苷酸转染的对照组相比, 有义链为 FLS1-2 的双链多核苷酸进行转染的组中显示了基因表达的强烈抑制, 达 90 % (HeLa 细胞)或 95 % (HEK293 细胞), 这与用双链 RNA 进行转染的抑制效果相当。在 FLS1-2 中, 其序列的 5' 区域的 12 个核苷酸是 RNA, 而其它区域的核苷酸是 DNA。因此, 在使用 HeLa 细胞和 HEK293 细胞的本

实施例1中,表明当反义链固定为 RNA 时,在有义链中的整个 12 个核苷酸或其部分是结构域所必需的并足以显示强的 RNAi 效果。

5 实施例 4 将 DNA - RNA 嵌合型双链多核苷酸转染人 CHO - K1 细胞,
以抑制基因的表达

(1) DNA - RNA 嵌合型双链多核苷酸的制备

P. pyralis luc 基因用作靶基因, pGL3-对照载体(Promega 生产)用于包含该基因的表达载体。此外, Renilla reniformis 的 luc 基因用作指示基因, 而 pRL-TK(Promega 生产)用于包含该基因的表达载体。

10 在该实施例中, 用于制备双链多核苷酸的是有义链的 21 个核苷酸, 它分别相应于 P.pyralis luc 基因(总长度为 1653 个碱基对)的第 8 至 28 位(8-28)核苷酸、第 38 至 58 位(38-58)和第 1087 至 1107 位(1087-1107), 其是 pGL3-对照载体中的靶基因。

15 在这些序列中, 8 - 28 位的有义链如 SEQ ID NO:5(DNA)或 SEQ ID NO:6(RNA)所示, 相应的反义链如 SEQ ID NO:7(DNA)或 SEQ ID NO:8(RNA)所示。38 - 58 位的有义链如 SEQ ID NO:1(DNA)或 SEQ ID NO:2(RNA)所示, 相应的反义链如 SEQ ID NO:3(DNA)或 SEQ ID NO:4(RNA)所示。此外, 1087 - 1107 位的有义链如 SEQ ID NO:9(DNA)或 SEQ ID NO:10(RNA)所示, 相应的反义链如 SEQ ID NO:11(DNA)或 SEQ ID NO:12(RNA)所示。

20 关于这些序列, 制备了有义和反义链的上游一半区域(10 至 13 个核苷酸)均是 RNA 的序列(C)、有义和反义链的上游一半区域(10 至 13 个核苷酸)均是 DNA 的序列(D)、反义链是 RNA 而有义链的上游一半区域(10 至 13 个核苷酸)是 RNA 的序列(E)、有义链为 RNA 而反义链的上游一半区域(10 至 13 个核苷酸)是 DNA 的序列(F)。通过 Hitachi Instruments Service Co. Ltd 委托 Genset K.K. 合成这些多核苷酸, 形成嵌合型多核苷酸后, 通过退火而将其制备成双链多核苷酸。有义和反义嵌合型单链多核苷酸的退火反应按实
25 施例 1 中描述的类似方式进行。通过 2% 琼脂糖凝胶于 TBE 缓冲液中进行电泳来分析双链多核苷酸产物。

30 (2) 将靶基因、指示基因和 DNA - RNA 嵌合型双链多核苷酸转染培养细胞

将描述于上述(1)中的 pGL3 - 对照载体用作表达靶基因的重组表达载体, 描述于上述(1)中的 pRL - TK 用作表达指示基因的表达式载体。人 CHO - K1 细胞(ATCC:CCL-61)、用作培养细胞。Dulbecco 改良 Eagle 培养基(Gibco BRL 生产)中附加失活的 10 % 牛胎血清(Mitsubishi Kasei Corporation 生产)、
5 作为抗生素的 10 单位/ml 青霉素(Meiji 生产)和 50 μ g/ml 链霉素(Meiji 生产)作为培养基。细胞在含 5 % CO₂ 的条件下于 37 $^{\circ}$ C 进行培养。

CHO - K1 细胞以 0.3×10^6 细胞/ml 的浓度涂布于 24 孔平板。1 天后, 用磷酸钙沉淀法(Saibo Kogaku Handbook, edited by Toshio Kuroki 等, Youdosha (1992))将 1.0 μ g pRL-TK DNA、及 10 nM 或 100 nM 的每一种 DNA-RNA 嵌
10 合型双链多核苷酸对细胞进行转染。

(3) 测定培养细胞中的基因表达

正如实施例 1, 在 20 小时后, 收集按上述实施例 4(2)制备的细胞, 并用 Dual-Luciferase Reporter Assay System 对两种类型的荧光素酶蛋白的表达
15 量进行测定。荧光的测定采用 Lumat LB9507 光度计。

双链多核苷酸的结构和用它们转染的细胞相对于对照(未用双链多核苷酸转染的细胞)的荧光素酶活性的比例显示于图 5。在图中, 空白的正方形代表 RNA 链, 而填充的正方形代表 DNA 链。从图中可明显得知, 任何碱基序列的多核苷酸中, 转染到 CHO - K1 细胞中的基因的表达被每一个具有
20 21 个核苷酸的双链多核苷酸所抑制, 其中至少多核苷酸的上游一半区域是 RNA(图 5(A), (C)和(E))。

21 个核苷酸的双链多核苷酸可根据本实施例和其它技术的方法来鉴定或预测对于显示 RNAi 效果必需和足够的区域来进行制备, 保持含该区域的部分为 RNA 而其它部分用 DNA 取代被认为能够通过 RNAi 效果而抑制靶
25 基因的表达。

对本发明已详细地并通过具体实施例进行了描述, 对本领域技术人员而言明显可进行许多改变和更改而仍然属于本发明的精神和范围之内。

本发明以于 2001 年 11 月 21 日提出的日本专利申请 No: 2001 - 355896 为基础, 在此将其全部内容引入作为参考。

30

工业实用性

根据本发明，提供了一种利用培养细胞、组织或单个生物体而直接分析人或其它生物的基因功能的方法。而且，根据利用指示基因的方法，通过初步筛选，甚至可以在呈现弱 RNAi 效果的细胞中选出呈现特别高强度的 RNAi 效果的细胞，而能有效地进行分析。

- 5 作为用于相同目的的常规发明技术，通常会考虑利用双链 RNA 进行转染的 RNAi 方法，但问题是 RNA 极容易被核糖核酸酶所降解，尤其是以单链形式存在时，因而导致生产成本过高。在本发明中待转化多核苷酸不限于全部的 RNA。因此，在本发明中，利用包含 DNA 和 RNA 的多核苷酸，尤其是 DNA 链和 RNA 链的杂交体多核苷酸或 DNA-RNA 嵌合型多核苷酸，而使多核苷酸作为用于转染物质的稳定性得到增强，也降低了生产成本。因此，根据本发明，可将多核苷酸本身制成用于治疗疾病的药物制剂。
- 10 此外，相对于 RNA，可以对 DNA 作许多方面的修饰如荧光标记、生物素标记、氨基化、磷酸化和硫醇化等。因此，当用作药物因子或试剂时，通过这种修饰可赋予合适于目的的功能。

<110> 三菱化学株式会社 (MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION)

<120> 抑制基因表达的方法

<130> P-43361

<140> JP 2001-355896

<141> 2001-11-21

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的

<400> 1

cattctatcc gctggaagat g

21

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的

<400> 2

cauucuaucc gcuggaagau g

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的

<400> 3

tcttccagcg gatagaatgg c

21

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的

<400> 4

ucuuccagcg gauagaaugg c

21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的

<400> 5

acgccaaaaa cataaagaaa g

21

<210> 6

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的

<400> 6

acgccaaaaa cauaaagaaa g

21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的

<400> 7

ttcttttatgt ttttggcgtc t

21

<210> 8

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的

<400> 8

、 uucuuuaugu uuuuggcguc u

21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的

<400> 9

ggtaaagttg ttttatTTTT t

21

<210> 10

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的

<400> 10

gguaaaguug uuuuuuuuuu u

21

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的

<400> 11

aaaatggaac aactttaccg a

21

<210> 12

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的

<400> 12

aaaauggaac aacuuuaccg a

21

有义链:

FLs1: CAUUCUAUCCGCUGGAAGAUG

DFLs1: CATTCTATCCGCTGGAAGATG

FLs1-1: CATTCTATCCGCUGGAAGAUG

FLs1-2: CAUUCUAUCCGCTGGAAGATG

反义链:

FLa2: UCUUCCAGCGGAUAGAAUGGC

DFLa2: TCTTCCAGCGGATAGAATGGC

FLa2-1: UCUUCCAGCGGATAGAAUGGC

FLa2-2: TCTTCCAGCGGAUAGAAATGGC

FLa2-3: TCTUCCAGCGGAUAGAAUGGC

FLa2-4: UCUTCCAGCGGATAGAATGGC

FLa2-5: TCTTCCAGCGGAUAGAAUGGC

FLa2-6: UCUUCCAGCGGATAGAATGGC

FLa2-7: TCTTCCAGCGGATAGAAATGGC

FLa2-8: UCUUCCAGCGGAUAGAAUGGC

FLa2-9: TCTTCCAGCGGAUAGAAUGGC

FLa2-10: UCUUCCAGCGGATAGAATGGC

图 1

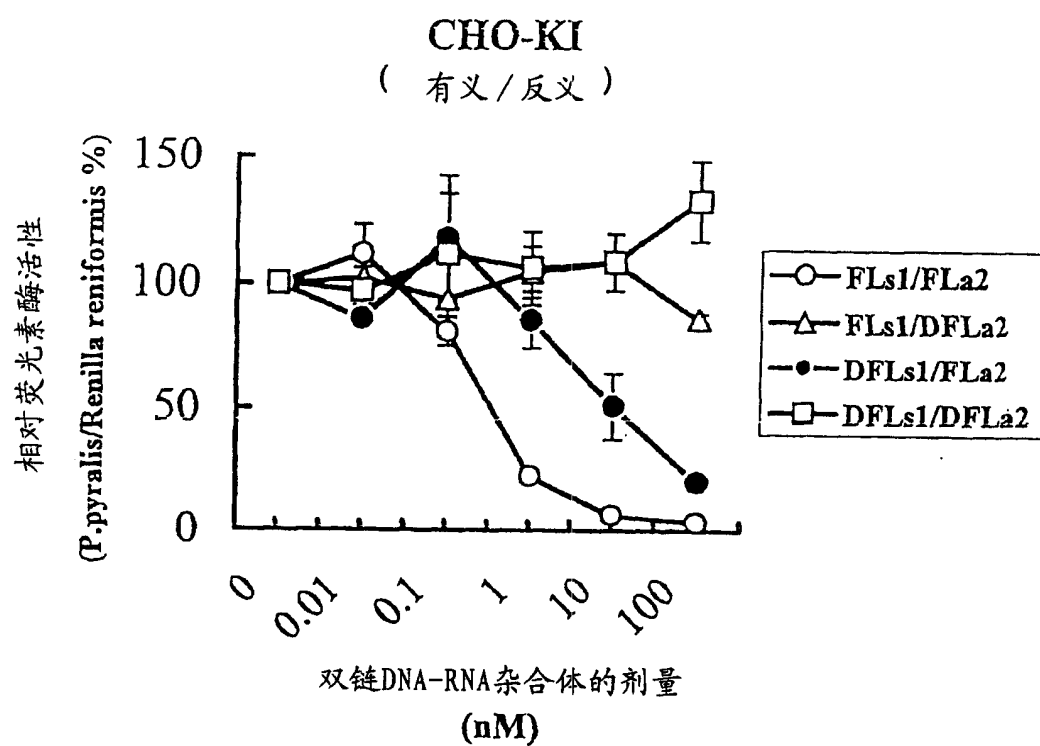


图2

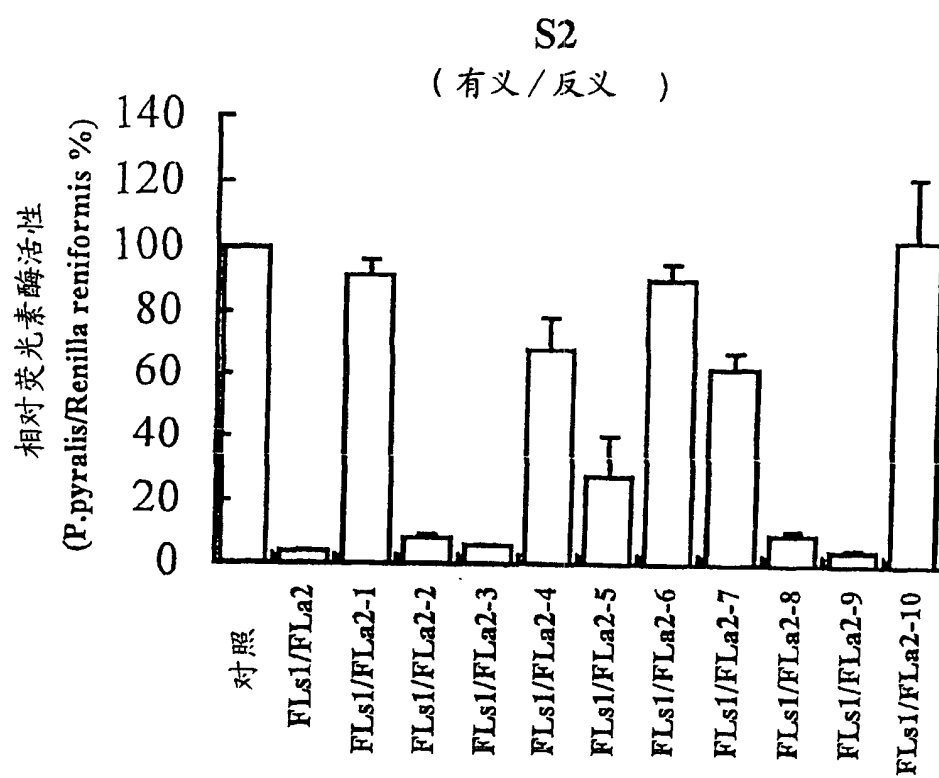


图 3

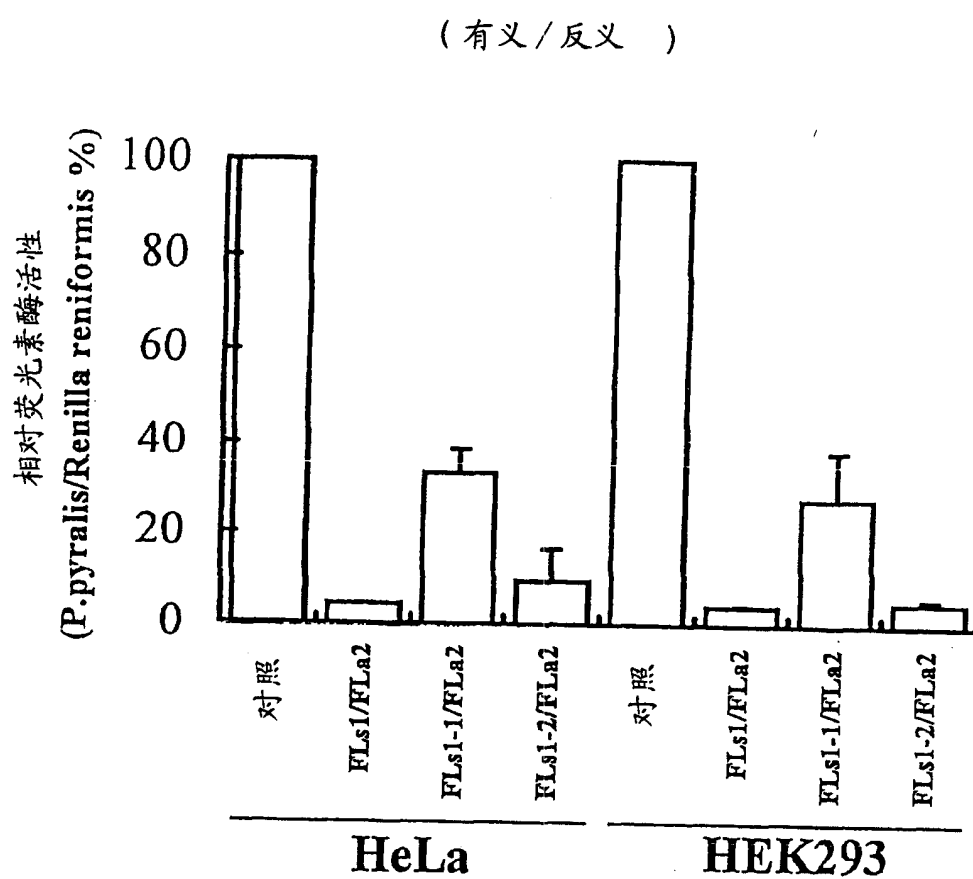


图4

CHO-K1

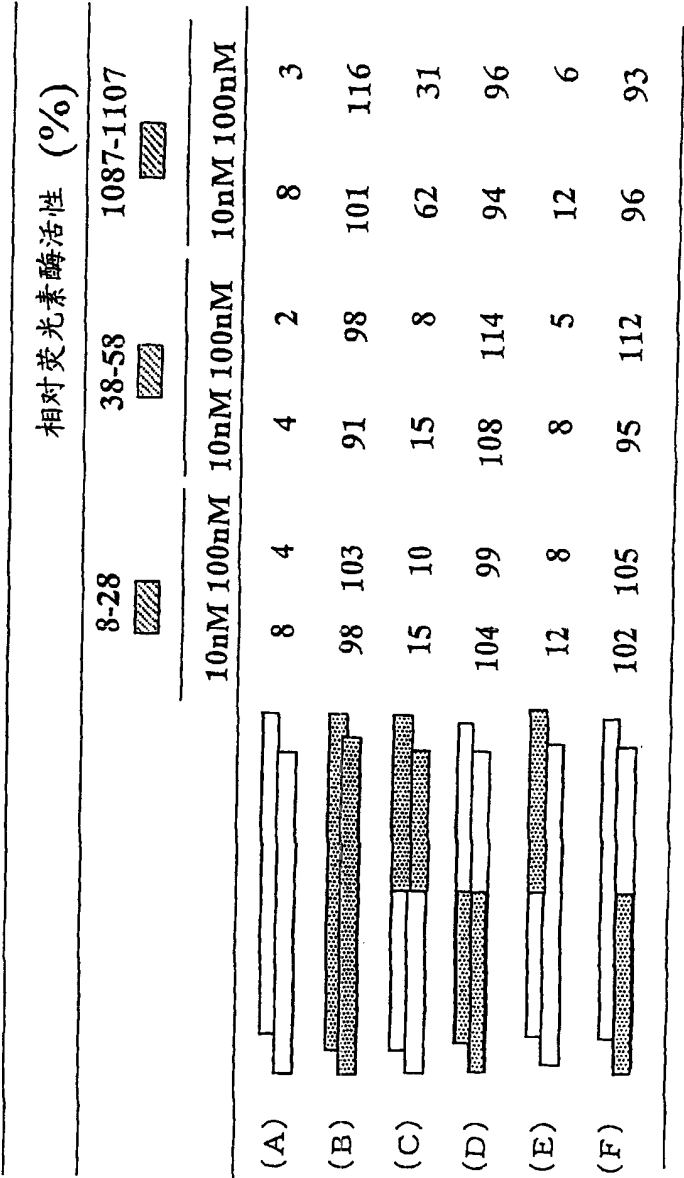


图 5