

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5759673号
(P5759673)

(45) 発行日 平成27年8月5日 (2015.8.5)

(24) 登録日 平成27年6月12日 (2015.6.12)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A G

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 1 O 1

請求項の数 40 (全 47 頁)

(21) 出願番号 特願2009-554750 (P2009-554750)
 (86) (22) 出願日 平成20年3月20日 (2008.3.20)
 (65) 公表番号 特表2010-521973 (P2010-521973A)
 (43) 公表日 平成22年7月1日 (2010.7.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/057704
 (87) 国際公開番号 W02008/116094
 (87) 国際公開日 平成20年9月25日 (2008.9.25)
 審査請求日 平成23年3月17日 (2011.3.17)
 (31) 優先権主張番号 60/896,212
 (32) 優先日 平成19年3月21日 (2007.3.21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 509262806
 ブルックヘブン サイエンス アソシエイ
 ツ, エルエルシー
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 119
 73, アップトン, ビルディング 460
 , ブルックヘブン アベニュー 40
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (74) 代理人 100181168
 弁理士 丸山 智裕
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組み合わされたヘアピン-アンチセンス組成物および発現を調節するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

R N A に転写されたときにステムおよびループを形成する D N A 配列を含む D N A 構築物であって、ループをコードする部分の D N A 配列がプロモーターおよび対象の遺伝子を含み、前記プロモーターと対象の遺伝子とが作動可能に連結されており、R N A のステムが標的の発現を調節する第 1 のヌクレオチド配列を含む、D N A 構築物。

【請求項 2】

標的の発現を調節する第 1 のヌクレオチド配列が、R N A i 経路を通じて標的の発現を調節する、請求項 1 に記載の D N A 構築物。

【請求項 3】

前記対象の遺伝子が、発現のアンチセンス調節を介して標的の発現を調節する、請求項 1 に記載の D N A 構築物。

【請求項 4】

ループの D N A が、標的の発現を調節する第 2 のヌクレオチド配列をさらに含む、請求項 1 に記載の D N A 構築物。

【請求項 5】

ループ中に 1 つまたは複数のスプライス部位をさらに含む、請求項 1 に記載の D N A 構築物。

【請求項 6】

10

20

ループが、標的の発現を調節する２つ以上のヌクレオチド配列を含有する、請求項４に記載のＤＮＡ構築物。

【請求項７】

標的の発現を調節する各ヌクレオチド配列が、同一標的の発現を調節してもよく、異なる標的の発現を調節してもよい、請求項６に記載のＤＮＡ構築物。

【請求項８】

ステムが、標的の発現を調節する２つ以上のヌクレオチド配列を含有する、請求項１に記載のＤＮＡ構築物。

【請求項９】

標的の発現を調節する各ヌクレオチド配列が、同一標的の発現を調節してもよく、異なる標的の発現を調節してもよい、請求項８に記載のＤＮＡ構築物。

10

【請求項１０】

ステムが、１つまたは複数の標的の発現を調節する１つまたは複数のヌクレオチド配列を含有し、ループが、１つまたは複数の標的の発現を調節する１つまたは複数のヌクレオチド配列を含有する、請求項１に記載のＤＮＡ構築物。

【請求項１１】

ヌクレオチド配列がＰＮＡを含む、請求項１に記載のヌクレオチド構築物。

【請求項１２】

ＰＮＡが、Ｎ－（２－アミノエチル）グリシンＰＮＡ、シクロヘキシルＰＮＡ、レトロインベルソＰＮＡ、ホスホンＰＮＡ、プロピニルＰＮＡ、およびアミノプロリンＰＮＡからなる群から選択される、請求項１１に記載のヌクレオチド構築物。

20

【請求項１３】

ヌクレオチド配列が、Ｆｍｏｃおよび／またはｔＢｏｃプロセスにより合成される、請求項１１に記載のヌクレオチド構築物。

【請求項１４】

ヌクレオチド配列が合成塩基を含む、請求項１に記載のヌクレオチド構築物。

【請求項１５】

合成塩基が、２’－Ｏ－メチル、モルフォリノ、ホスホロチオエート、および閉じ込め塩基からなる群から選択される、請求項１４に記載のヌクレオチド構築物。

30

【請求項１６】

ヌクレオチド配列が改変された糖を含む、請求項１に記載のヌクレオチド構築物。

【請求項１７】

改変された糖が、２’－Ｏ－メチルリボース、２’－Ｏ－アルキルリボース、および２’－Ｏ－アリルリボースからなる群から選択される、請求項１６に記載のヌクレオチド構築物。

【請求項１８】

標的が、遺伝子、オリゴヌクレオチド配列、および／またはタンパク質である、請求項１に記載のヌクレオチド構築物。

【請求項１９】

プロモーターに作動可能に連結された請求項１に記載のヌクレオチド構築物を含むベクター。

40

【請求項２０】

プロモーターが、ウイルスプロモーター、レトロウイルスプロモーター、哺乳動物プロモーター、植物プロモーター、細菌プロモーター、構成的プロモーター、調節性プロモーター、真菌プロモーター、酵母プロモーター、および昆虫プロモーターからなる群から選択される、請求項１９に記載のベクター。

【請求項２１】

植物プロモーターが、アラビドプシス、ヒマワリ、ワタ、ナタネ、トウモロコシ、コムギ、トウゴマ、ヤシ、タバコ、ピーナッツ、モロコシ、サトウキビ、およびダイズにおいて同定されるプロモーターからなる群から選択される、請求項２０に記載のベクター。

50

【請求項 2 2】

ベクターが、プラスミド、コスミド、レトロウイルスベクター、アグロバクテリウム、ウイルスベクター、細菌ベクター、酵母ベクター、真核生物ベクター、植物ベクター、および哺乳動物ベクターからなる群から選択される、請求項 1 9 に記載のベクター。

【請求項 2 3】

プロモーターに作動可能に連結された請求項 1 に記載のヌクレオチド構築物のゲノムへの組込みを促進する配列をさらに含む、請求項 1 9 に記載のベクター。

【請求項 2 4】

標的の発現を調節する方法であって、
請求項 1 に記載のヌクレオチド構築物を細胞に提供すること、および
前記細胞を培養することを含む方法。

10

【請求項 2 5】

細胞が、原核生物、真核生物、細菌、アグロバクテリウム、酵母、植物、哺乳動物、およびヒトの細胞からなる群から選択される、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

植物細胞が、アラビドプシス、ヒマワリ、ワタ、ナタネ、トウモロコシ、コムギ、トウゴマ、ヤシ、タバコ、ピーナッツ、モロコシ、サトウキビ、およびダイズの細胞において同定されるプロモーターからなる群から選択される、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

標的が、遺伝子、オリゴヌクレオチド配列、および/またはタンパク質である、請求項 2 4 に記載の方法。

20

【請求項 2 8】

標的の発現を調節する方法であって、
請求項 1 9 に記載のベクターを含むベクターをインビトロで細胞に提供すること、および
前記細胞中の前記ベクターから請求項 1 に記載の DNA 構築物を発現することを含む方法。

【請求項 2 9】

標的が、遺伝子、オリゴヌクレオチド配列、および/またはタンパク質である、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

細胞が、原核生物、真核生物、細菌、アグロバクテリウム、酵母、植物、哺乳動物、およびヒトの細胞からなる群から選択される、請求項 2 8 に記載の方法。

30

【請求項 3 1】

植物細胞が、アラビドプシス、ヒマワリ、ワタ、ナタネ、トウモロコシ、コムギ、トウゴマ、ヤシ、タバコ、ピーナッツ、モロコシ、サトウキビ、およびダイズの細胞からなる群から選択される、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

請求項 1 に記載のヌクレオチド構築物ならびに薬学的に許容できる担体、希釈剤、および/またはアジュバンドを含む薬物。

【請求項 3 3】

請求項 1 9 に記載のベクターならびに薬学的に許容できる担体、希釈剤、および/またはアジュバンドを含む薬剤組成物。

40

【請求項 3 4】

請求項 1 に記載のヌクレオチド構築物を含む細胞。

【請求項 3 5】

細胞が、原核生物、真核生物、細菌、アグロバクテリウム、酵母、植物、哺乳動物、およびヒトの細胞からなる群から選択される、請求項 3 4 に記載の細胞。

【請求項 3 6】

植物が、アラビドプシス、ヒマワリ、ワタ、ナタネ、トウモロコシ、コムギ、トウゴマ、ヤシ、タバコ、ピーナッツ、モロコシ、サトウキビ、およびダイズからなる群から選択

50

される、請求項 3 5 に記載の細胞。

【請求項 3 7】

標的を調節するための構築物を作製する方法であって、
R N A に転写されたときに塩基対合して構築物中にステム - ループ構造を形成することができる第 1 と第 2 の配列と、第 1 と第 2 の配列の間に配置された第 3 の配列とを組み合わせる単一 D N A 配列にすることを含み、
前記第 1 と第 2 の配列が塩基対合すると、s i R N A を生成することができ、前記第 3 の配列が、第 1 と第 2 の配列を互いに安定的に対合させるのに十分な長さであり、
前記第 3 の配列をコードする部分の配列が、プロモーターおよび対象の遺伝子を含み、前記プロモーターと対象の遺伝子とが作動可能に連結されている、方法。

10

【請求項 3 8】

アンチセンス抑制を通じて標的を調節することができる第 4 の配列を、第 1 と第 2 の配列と組み合わせることをさらに含む、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

第 4 の配列が第 1 と第 2 の配列の間に配置されている、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

R N A に転写されたときにステムおよびループを形成するヌクレオチド配列を含むヌクレオチド構築物であって、ループをコードする部分のヌクレオチド配列がプロモーターおよび対象の遺伝子ならびに 1 つまたは複数のスプライス部位を含み、前記プロモーターおよび対象の遺伝子が、標的の発現を調節する第 1 のヌクレオチド配列に作動可能に連結されており、
ステムが標的の発現を調節する第 2 のヌクレオチド配列を含み、
第 1 のヌクレオチド配列により調節される標的と第 2 のヌクレオチド配列により調節される標的が同一であっても異なってもよいヌクレオチド構築物。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、米国エネルギー省により授与された認可番号 D E - A C 0 2 - 9 8 C H 1 0 8 8 6 の下で政府支援により実施されたものである。合衆国政府は本発明にある種の権利を有している。

30

【0 0 0 2】

(優先権の主張)

本出願は、「組み合わせられたヘアピン - アンチセンス組成物および発現を調節する方法」という、2 0 0 7 年 3 月 2 1 日出願の米国特許仮出願第 6 0 / 8 9 6 2 1 2 号明細書の出願日の利益を主張する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

アンチセンス抑制とは、核酸の「アンチセンス」鎖が遺伝子または m R N A に結合し、それによって遺伝子の発現または m R N A の翻訳を妨げることである。典型的には、アンチセンス抑制では、発現カセットは、標的をコードする m R N A のすべてまたは一部に相補的な R N A 分子を発現するように設計されている。アンチセンス R N A 分子が過剰発現すれば、その天然の遺伝子の発現が減少する可能性がある。

40

【0 0 0 4】

アンチセンス抑制において使用するためのポリヌクレオチドは、標的をコードしている配列の相補体のすべてまたは一部、標的転写物の 5 ' および / もしくは 3 ' 非翻訳領域の相補体のすべてまたは一部、ならびに / あるいはコード配列と標的をコードする転写物の非翻訳領域の両方の相補体のすべてまたは一部に一致してよい。さらに、アンチセンスポリヌクレオチドは、標的配列に対して完全に相補的（すなわち、標的配列の相補体に 1 0 0 % 同一）でも、部分的に相補的（すなわち、標的配列の相補体に 1 0 0 % 未満同一）でもよい。たとえば、米国特許第 5 9 5 2 6 5 7 号に記載のように、アンチセンス抑制

50

を利用して、同一細胞または生物において複数のタンパク質の発現を阻害することができる。さらに、アンチセンスヌクレオチドの一部を使用して、標的遺伝子の発現を妨げることができる。通常、少なくとも50、100、200、300、500または550ヌクレオチドの配列を使用することができる。アンチセンス抑制により植物における内在性遺伝子の発現を阻害するための方法は、たとえば、Liuら(2002年) Plant Physiology, 129: 1732~1753頁ならびに米国特許第5759829号および米国特許第5952657号に記載されている。アンチセンス配列の3'方向およびポリアデニル化シグナルの5'の位置で発現カセット中にポリdT領域を含むことにより、アンチセンス抑制の効率を増加させることができる。米国特許出願公開第20020058815号を参照されたい。

10

【0005】

RNA干渉とは、低分子干渉RNA(sRNA)により媒介される動物における配列特異的転写後遺伝子サイレンシングのプロセスのことである(Fireら、1998年、Nature、391、806頁; Hamiltonら、1999年、Science、286、950~951頁)。植物における相当するプロセスは、一般に、転写後遺伝子サイレンシングまたはRNAサイレンシングと呼ばれ、真菌においてはクウェリング(quelling)とも呼ばれている。転写後遺伝子サイレンシングのプロセスは、外来遺伝子の発現を妨げるために使われる進化的に保存された細胞防御機構だと考えられており、多様な植物相および門により広く共有されている(Fireら、1999年、Trends Genetics、15、358頁)。外来遺伝子発現に対するそのような防御は、ウイルス感

20

【0006】

細胞内に長いdsRNAが存在すると、ダイサーと呼ばれるリボヌクレアーゼIII酵素の活性が刺激される。ダイサーは、dsRNAを低分子干渉RNA(sRNA)として知られるdsRNAの短い断片にプロセッシングすることに関与している(Hamiltonら、上記を参照; Bernsteinら、2001年、Nature、409、363頁)。ダイサー活性に由来する低分子干渉RNAは、典型的には約21~約23ヌクレオチド長であり、約19塩基対二重鎖を含む(Hamiltonら、上記を参照; Elbashirら、2001年、Genes Dev.、15、188頁)。ダイサーは、保存された構造のRNA前駆体からの翻訳制御に関与している21-および22-ヌクレオチド小分子RNA(stRNA)の切取りにも関係づけられてきた(Hutvagnerら、2001年、Science、293、834頁)。RNAi応答は、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)と一般に呼ばれているエンドヌクレアーゼ複合体も特色としており、RISCはsRNA二重鎖のアンチセンス鎖に相補的な配列を有する一本鎖RNAの切断を媒介する。標的RNAの切断は、sRNA二重鎖のアンチセンス鎖に相補的な領域の中央で行われる(Elbashirら、2001年、Genes Dev.、15、188頁)。

30

40

【0007】

RNAiは種々の系において研究されてきた。Fireら、1998年、Nature、391、806頁は、最初に線虫(Celegans)においてRNAiを観察した。BahramianとZarbl、1999年、Molecular and Cellular Biology、19、274~283頁、およびWiannyとGoetz、1999年、Nature Cell Biol.、2、70頁は、哺乳動物系におけるdsRNAにより媒介されたRNAiを記載している。Hammondら、2000

50

年、Nature、404、293頁は、dsRNAでトランスフェクトされたショウジョウバエ (*Drosophila*) 細胞におけるRNAiを記載している。Elbashirら、2001年、Nature、411、494頁は、ヒト胚腎臓およびHeLa細胞を含む培養哺乳動物細胞における合成21-ヌクレオチドRNAの二重鎖の導入により誘導されるRNAiを記載している。dsRNA干渉を利用して内在性植物遺伝子の発現を阻害するための方法は、Waterhouseら、(1998年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13959~13965頁、Liuら、(2002年) Plant Physiol. 129:1732~1753頁、ならびにWO99/59029、WO99/53050、WO99/61631、およびWO00/59035に記載されている。

10

【0008】

ヘアピンRNA (hpRNA) 干渉またはイントロン含有ヘアピンRNA (ihpRNA) 干渉により得られる1つまたは複数の標的の発現の阻害に関する追加のRNAi方法はすでに記載されている。これらの方法は内在性遺伝子の発現を阻害するのに高度に効率的である。WaterhouseとHelliwell (2003年) Nat. Rev. Genet. 5:29~38頁およびそこで引用されている参考文献を参照されたい。

【0009】

hpRNA干渉では、発現カセットは、分子内でハイブリダイズして、一本鎖ループ領域と塩基対合ステムを含むヘアピン構造を形成するRNA分子を発現するように設計されている。塩基対合ステム領域は、その発現が阻害されることになる遺伝子をコードする内在性メッセンジャーRNAのすべてまたは一部に一致するセンス配列、およびそのセンス配列に完全にもしくは部分的に相補的なアンチセンス配列を含む。したがって、分子の塩基対合ステム領域は通常、RNA干渉の特異性を決定する。hpRNA分子は内在性遺伝子の発現を阻害するのに高度に効率的であり、この分子が誘導するRNA干渉はそれに続く世代により受け継がれる。たとえば、ChuangとMeyerowitz (2000年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:5985~5990頁; Stoutjesdijkら、(2002年) Plant Physiol. 129:1723~1731頁; およびWaterhouseとHelliwell (2003年) Nat. Rev. Genet. 5:29~38頁を参照されたい。hpRNA干渉を利用して遺伝子の発現を阻害するまたは発現停止させるための方法は、たとえば、ChuangとMeyerowitz (2000年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:5985~5990頁; Stoutjesdijkら、(2002年) Plant Physiol. 129:1723~1731頁; WaterhouseとHelliwell (2003年) Nat. Rev. Genet. 5:29~38頁; Pandolfiら、BMC Biotechnology 3:7、および米国特許出願公開第20030175965号に記載されている。インビボで遺伝子発現を発現停止させるhpRNA構築物の効率に対する一過性アッセイは、Panstrugaら、(2003年) Mol. Biol. Rep. 30:135~150頁にすでに記載されている。

20

30

【0010】

ihpRNAでは、干渉する分子はhpRNAの場合と同じ全体構造を有するが、そのRNA分子はそのihpRNAが発現されている細胞でスプライスされることができ、イントロンをさらに含んでいる。イントロンを利用すれば、スプライシングに続いてヘアピンRNA分子内でのループの大きさが最小化され、それにより干渉の効率は増加する。たとえば、Smithら、(2000年) Nature 507:319~320頁を参照されたい。実際、Smithらは、ihpRNA媒介干渉による内在性遺伝子発現の100%抑制を明らかにしている。ihpRNA干渉により遺伝子の発現を阻害するための方法は、たとえば、Smithら、(2000年) Nature 507:319~320頁; Wesleyら、(2001年) Plant J. 27:581~590頁; WangとWaterhouse (2001年) Curr. Opin. Plant Biol. 5:156~150頁; WaterhouseとHelliwell (2003年) Na

40

50

t . R e v . G e n e t . 5 : 2 9 ~ 3 8 頁 ; H e l l i w e l l と W a t e r h o u s e (2 0 0 3 年) M e t h o d s 3 0 : 2 8 9 ~ 2 9 5 頁、および米国特許出願公開第 2 0 0 3 0 1 8 0 9 5 5 号に記載されている。

【 0 0 1 1 】

種々の RNAi および遺伝子サイレンシングシステムに関する報告もある。たとえば、P a r r i s h ら、2 0 0 0 年、M o l e c u l a r C e l l、6、1 0 7 7 ~ 1 0 8 7 頁は、線虫の u n c - 2 2 遺伝子を標的にする特定の化学的に改変された siRNA 構築物を記載している。G r o s s n i k l a u s、国際 P C T 出願国際公開第 0 1 / 3 8 5 5 1 号は、ある種の dsRNA を使用して植物中でのポリコム遺伝子発現を調節するためのある種の方法を記載している。C h u r i k o v ら、国際 P C T 出願国際公開第 0 1 / 4 2 4 4 3 号は、ある種の dsRNA を使用して生物の遺伝的特徴を改変するためのある種の方法を記載している。C o g o n i ら、国際 P C T 出願国際公開第 0 1 / 5 3 4 7 5 号は、ニューロスポラサイレンシング遺伝子を単離するためのある種の方法とその使用を記載している。R e e d ら、国際 P C T 出願国際公開第 0 1 / 6 8 8 3 6 号は、植物における遺伝子サイレンシングのためのある種の方法を記載している。H o n e r ら、国際 P C T 出願国際公開第 0 1 / 7 0 9 4 4 号は、ある種の dsRNA を使用して、パーキンソン病モデルとしてトランスジェニック線虫 (n e m a t o d e) を利用する薬物スクリーニングのある種の方法を記載している。D e a k ら、国際 P C T 出願国際公開第 0 1 / 7 2 7 7 4 号は、ショウジョウバエにおいて RNAi に関係している可能性のあるある種のショウジョウバエ由来遺伝子産物を記載している。A r n d t ら、国際 P C T 出願国際公開第 0 1 / 9 2 5 1 3 号は、RNAi を増強する因子を使うことにより遺伝子抑制を媒介するためのある種の方法を記載している。T u s c h l ら、国際 P C T 出願国際公開第 0 2 / 4 4 3 2 1 号は、ある種の合成 siRNA 構築物を記載している。P a c h u k ら、国際 P C T 出願国際公開第 0 0 / 6 3 3 6 4 号、および S a t i s h c h a n d r a n ら、国際 P C T 出願国際公開第 0 1 / 0 4 3 1 3 号は、ある種の dsRNA を使用してある種のポリヌクレオチド配列の機能を阻害するためのある種の方法と組成物を記載している。E c h e v e r r i ら、国際 P C T 出願国際公開第 0 2 / 3 8 8 0 5 号は、RNAi を介して同定されるある種の線虫遺伝子を記載している。K r e u t z e r ら、国際 P C T 出願国際公開第 0 2 / 0 5 5 6 9 2 号、国際公開第 0 2 / 0 5 5 6 9 3 号、および E P 1 1 4 4 6 2 3 B 1 は、RNAi を使用して遺伝子発現を阻害するためのある種の方法を記載している。G r a h a m ら、国際 P C T 出願国際公開第 9 9 / 4 9 0 2 9 号および国際公開第 0 1 / 7 0 9 4 9 号、ならびに A U 4 0 3 7 5 0 1 は、ある種のベクター発現 siRNA 分子を記載している。F i r e ら、米国特許第 6 , 5 0 6 , 5 5 9 号は、RNAi を媒介するある種の長 dsRNA (2 5 ヌクレオチドより大きい) 構築物を使用してインピトロで遺伝子発現を阻害するためのある種の方法を記載している。

【 0 0 1 2 】

RNAi およびアンチセンス技術を使用した遺伝子サイレンシングの分野では多くの研究が行われてきたが、RNAi またはアンチセンス技術を超える遺伝子発現の調節を増加させる改良は当技術分野における改良になると考えられる。

【 発明の概要 】

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 3 】

本発明の一実施形態は、ステムおよびループを形成するヌクレオチド配列を含むヌクレオチド構築物であって、ループが標的の発現を調節する第 1 のヌクレオチド配列を含み、ステムが標的の発現を調節する第 2 のヌクレオチド配列を含み、第 1 のヌクレオチド配列により調節される標的と第 2 のヌクレオチド配列により調節される標的が同一であっても異なってもよい、ヌクレオチド構築物を提供する。

【 0 0 1 4 】

追加の実施形態では、標的の発現を調節する第 1 のヌクレオチド配列は、RNAi 経路を通じて標的の発現を調節する。追加の実施形態では、標的の発現を調節する第 1 のヌ

10

20

30

40

50

レオチド配列は、発現のアンチセンス調節を介して標的の発現を調節する。

【 0 0 1 5 】

本発明の特定の実施形態は、ステムおよびループを形成するヌクレオチド配列ならびにプロモーターに作動可能に連結された対象の遺伝子を含むヌクレオチド構築物であって、ステムが標的の発現を調節する第2のヌクレオチド配列を含み、ループが標的の発現を調節しても調節しなくてもよい第1のヌクレオチド配列を含む、ヌクレオチド構築物を提供する。追加の実施形態では、プロモーターに作動可能に連結された対象の遺伝子はループ内に位置している。

【 0 0 1 6 】

本発明の別の実施形態は、前述のヌクレオチド配列をコードする配列を含むベクターを提供する。代替の実施形態は、ステムおよびループを形成するヌクレオチド配列をコードする配列に作動可能に連結されたプロモーターを含むベクターであって、ループが標的の発現を調節する第1のヌクレオチド配列を含み、ステムが標的の発現を調節する第2のヌクレオチド配列を含む、ベクターを提供する。

【 0 0 1 7 】

本発明の実施形態は、標的の発現を調節する方法であって、ステムおよびループを形成するヌクレオチド配列を含む配列であって、ループが標的の発現を調節する第1のヌクレオチド配列を含み、ステムが標的の発現を調節する第2のヌクレオチド配列を含む、配列を細胞に提供すること、および前記細胞を培養することを含む方法を提供する。

【 0 0 1 8 】

本発明の実施形態は、標的の発現を調節する方法であって、ステムおよびループを形成するヌクレオチド配列をコードする配列に作動可能に連結されたプロモーターを含むベクターであって、ループが標的の発現を調節する第1のヌクレオチド配列を含み、ステムが標的の発現を調節する第2のヌクレオチド配列を含むベクターを細胞に提供すること、および前記細胞において前記ベクターからヌクレオチド配列を発現させることを含む方法を提供する。

【 0 0 1 9 】

本発明の別の実施形態は、対象の状態を治療する方法であって、ステムおよびループを形成するヌクレオチド配列を含む前述の配列を対象に投与することを含む方法を提供する。特定の実施形態は、ステムおよびループを形成するヌクレオチド配列をコードする配列に作動可能に連結されたプロモーターを含むベクターを対象に投与することを含む。

【 0 0 2 0 】

本発明の特定の実施形態は、ステムおよびループを形成するヌクレオチド配列を含む配列であって、ループが標的の発現を調節する第1のヌクレオチド配列を含み、ステムが標的の発現を調節する第2のヌクレオチド配列を含む配列、ならびに薬学的に許容できる担体、希釈剤、および/またはアジュバンドを含む薬物を提供する。本発明の代替の実施形態は、ステムおよびループを形成するヌクレオチド配列をコードする配列に作動可能に連結されたプロモーターを含むベクターを含む配列を含む薬物を提供する。

【 0 0 2 1 】

本発明の実施形態は、ステムおよびループを形成する前述のヌクレオチド配列を含む細胞を提供する。代替の実施形態は、ステムおよびループを形成するヌクレオチド配列をコードする配列に作動可能に連結されたプロモーターを含むベクターを含む細胞を提供することを含む。

【 0 0 2 2 】

本発明の実施形態は、標的を調節するための構築物を作製する方法であって、塩基対合して構築物中にステム - ループ構造を形成することができる第1と第2の配列と、第1の配列と第2の配列の間に配置された第3の配列とを組み合わせることで単一の核酸配列にすることを含み、前記第1と第2配列が塩基対合すると、siRNAを生成することができ、前記第3の配列が、第1と第2の配列を互いに安定的に対合させるのに十分な長さであり、前記第3の配列が、アンチセンス抑制を通じて標的を調節することができる配列を含む方法

10

20

30

40

50

を提供する。

【0023】

本発明の実施形態は、標的を調節するための構築物を作製する方法であって、塩基対合して構築物中にステム-ループ構造を形成することができる第1と第2の配列と、第1の配列と第2の配列の間に配置された第3の配列と、プロモーターに作動可能に連結された対象の遺伝子を含む第4の配列とを組み合わせる単一の核酸配列にすることを含み、前記第1および第2配列が塩基対合すると、siRNAを生成することができ、前記第3の配列が、第1と第2の配列を互いに安定的に対合させるのに十分な長さであり、前記第3の配列がアンチセンス抑制を通じて標的を調節することができる配列を含んでも含まなくてもよい方法を提供する。

10

【0024】

本発明の別の実施形態は、内在性成分脂肪酸のレベルが改変された植物を作製する方法を提供する。この方法は、脂肪酸合成遺伝子または脂質代謝遺伝子などの異種遺伝子のレベルを調節することを含む。

【0025】

本発明は、RNAiを使用した種々の遺伝子サイレンシング方法および当技術分野では公知のアンチセンス技術とさらに組み合わせて利用して、1つまたは複数の特定の遺伝子および/または遺伝経路に合わせた遺伝子発現の増加された調節を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

20

【0026】

【図1】構築物のpPHAS-Fab1-AS、pPHAS-Fab1-HP、およびpPHAS-Fab1-HPASの説明図である。

【図2】構築物のpPHAS-Fad2-AS、pPHAS-Fad2-HP、pPHAS-Fad2-HPAS、およびpPHAS-Fad2-HP-GUSの説明図である。

【図3】構築物のpPHAS-Fad3-AS、pPHAS-Fad3-HP、およびpPHAS-Fad3-HPASの説明図である。

【図4】構築物のpPHAS-Fab1-HPASが細胞内でどのように処理されてFab1の発現を調節することができるかを示す図である。

【図5】アラビドプシスにおける脂肪酸産生の模式図である。

30

【図6】背景系統と比べた、pPHAS-Fab1-HPおよびpPHAS-Fab1-HPASを含有する種子中の種々の脂肪酸のレベルを示すガスクロマトグラフトレースを示す図である。

【図7】背景系統と比べた、pPHAS-Fab1-HPおよびpPHAS-Fab1-HPASを含有する種子中の種々の脂肪酸のレベルを示している要約図である。

【図8】野生型と比べた、pPHAS-Fad2-ASを含有する種子中の種々の脂肪酸レベルを示すガスクロマトグラフトレースを示す図である。

【図9】Fad2-MT突然変異体と比べた、pPHAS-Fad2-HPおよびpPHAS-Fad2-HPASを含有する種子中の種々の脂肪酸のレベルを示すガスクロマトグラフトレースを示す図である。

40

【図10】Fad2-MT突然変異体および背景系統と比べた、pPHAS-Fad2-AS、pPHAS-Fad2-HP、およびpPHAS-Fad2-HPASを含有する種子中の種々の脂肪酸のレベルを示している要約図である。

【図11】背景系統と比べた、pPHAS-Fad2-HP-GUSを含有する種子中の種々の脂肪酸のレベルを示すガスクロマトグラフトレースを示す図である。

【図12】野生型種子（明るいほうの種子）およびpPHAS-Fad2-HP-GUSからGUSを発現している種子（暗いほうの種子）を含む写真である。

【図13】野生型と比べた、pPHAS-Fad3-ASを含有する種子中の種々の脂肪酸のレベルを示すガスクロマトグラフトレースを示す図である。

【図14】Fad3-MT突然変異体と比べた、pPHAS-Fad3-HPおよびpP

50

H A S - F a d 3 - H P A S を含有する種子中の種々の脂肪酸のレベルを示すガスクロマトグラフトレースを示す図である。

【図 1 5】 F a d 3 - M T 突然変異体および背景系統と比べた、 p P H A S - F a d 3 - A S、 p P H A S - F a d 3 - H P、 および p P H A S - F a d 3 - H P A S を含有する種子中の種々の脂肪酸のレベルを示している要約図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 7 】

本発明の一態様は、細胞内で標的の発現を調節するのに有用な化合物、組成物、および方法に関する。具体的には、本発明の態様は、RNA 干渉 (RNA i) および / またはアンチセンス抑制により、遺伝子、オリゴヌクレオチド配列、および / またはタンパク質などの標的の発現を調節することができるヌクレオチド配列に関する。一般的には、本発明の調節ヌクレオチド配列 (m N S) 分子は、ステム - ループ構造であって、ステムがダイサーに基質を与え RNA i 経路を通じて標的を抑制するように働くことができ、構造のループ部分がアンチセンス抑制を通じて遺伝子を抑制するように働くことができる第 1 の配列を含んでいてよい、ステム - ループ構造を含んでいてよい。本発明の m N S 分子は、全体的にまたは部分的に、化学的に改変されるおよび / または合成的に作製されてよい。化学的に改変された m N S を使用すれば、たとえば、インピボにおけるヌクレアーゼ分解に対する増加した耐性および / または改善された細胞取込みを通じて、m N S 分子の種々の特性が改善される可能性がある。本発明の化学的に改変された m N S 分子は、種々の治療、診断、農業、標的確認、ゲノム発見、遺伝子工学、および薬理ゲノミクスへの適用に有用な試薬および方法を提供する。

【 0 0 2 8 】

一特定の実施形態では、本発明の m N S 分子は、ステムがダイサーにより切断されて、RNA i 経路を通じて mRNA を抑制することができる少なくとも 1 つの低分子干渉核酸 (s i N A) を放出することが可能な二本鎖核酸 (d s N A) 配列を含有するステム - ループ (ヘアピン) 構造を含む。さらに、m N S 分子のループは、少なくとも 1 つのアンチセンス核酸 (a s N A) を含有する。一般的には、そのような分子は、本明細書では、ループアンチセンス付きのヘアピン形成核酸または「h p N A a s」と呼ぶことにする。

【 0 0 2 9 】

s i N A および h p N A a s の a s N A は、同一遺伝子および / または mRNA における同一位置を標的にしてよい。追加の実施形態では、s i N A および h p N A a s の a s N A は、同一遺伝子および / または mRNA における異なった位置を標的にしてよい。s i N A および h p N A a s の a s N A は、異なった遺伝子および / または mRNA も標的にしてよい。

【 0 0 3 0 】

h p N A a s のステム部分は、s i N A を生成することができる 2 つ以上の配列を含有してよい。2 つ以上の s i N A が h p N A a s のステムから生成される場合は、これらの s i N A は同一 mRNA 上の同一部位を標的にしてよい。s i N A は同一 mRNA 上の異なった部位を標的にしてよい。s i N A は異なった mRNA も標的にしてよい。

【 0 0 3 1 】

h p N A a s のループ部分は、2 つ以上の a s N A 配列を含有してよい。2 つ以上の a s N A が h p N A a s のループ内に存在する場合、これらの a s N A は同一遺伝子および / または mRNA 上の同一部位を標的にしてよい。a s N A は同一遺伝子および / または mRNA 上の異なった部位を標的にしてよい。a s N A は異なった遺伝子および / または mRNA も標的にしてよい。

【 0 0 3 2 】

本発明の追加の実施形態では、h p N A a s のステム部分は、s i N A を生成することができる 2 つ以上の配列を含有してよく、h p N A a s のループ部分は 2 つ以上の a s N A 配列を含有してよい。これらの s i N A と a s N A は、同一 mRNA 上の同一部位、同一 mRNA 上の異なった部位、異なった mRNA、またはその任意の組合せを標

的にしてよい。

【0033】

一特定の実施形態では、本発明の h p N A a s 由来の単一の s i N A および / または a s N A は、2 つ以上の遺伝子、ヌクレオチド配列、および / またはタンパク質を標的にしてよい。多くの遺伝子が互いにある程度の配列相同性を共有していることがあるために、s i N A および / または a s N A 分子は、一種類 (class) の遺伝子 (および関連するレセプターもしくはリガンド遺伝子)、あるいは、代わりに、異なった遺伝子標的間で共有されている配列、または、代わりに特定の遺伝子標的に特有である配列を選択することにより特定の遺伝子を標的にするよう設計されてよい。一実施形態では、s i N A および / または a s N A 分子は、たとえば、いくつかの遺伝子または遺伝子ファミリー (たとえば、異なった遺伝子アイソフォーム、スプライスバリエント、突然変異遺伝子等) を 1 つの s i N A および / または a s N A 分子を使用して標的にするために、いくつかの遺伝子間で相同性を有する R N A 配列の保存領域を標的にするように設計されてよい。別の実施形態では、s i N A および / または a s N A 分子は、調節活性を媒介するために s i N A および / または a s N A 分子が必要とする高度な特異性により、特定の遺伝子、ヌクレオチド配列、および / またはタンパク質に特有である配列を標的にするように設計されてよい。

10

【0034】

本発明の追加の実施形態では、h p N A a s 分子は、1 つまたは複数のスプライス部位を含有してよい。h p N A a s のステム部分から h p N A a s のループ部分をあたかもそれがイントロンであるかのように切断するように、これらのスプライス部位は操作的に置かれ方向づけられてよい。そのように操作的に方向づけられて置かれたスプライス部位を含有する h p N A a s は、この後、「イントロン含有 h p N A a s 」または「i h p N A a s 」と呼ぶことにする。

20

【0035】

別の実施形態では、m N S はプロモーターに作動可能に連結された対象の遺伝子を含有してよい。m N S がヘアピンまたはループを含有している場合、本発明の特定の実施形態は、ループ内部にプロモーターおよび対象の遺伝子が存在することを可能にする。他の実施形態では、a s N A はプロモーターおよび対象の遺伝子を含有するループ内に存在していても不在でもよい。

30

【0036】

対象の遺伝子は、使用者が発現させることを望むいかなる遺伝子でもよい。この遺伝子は、m N S の標的と同一でも関連していてもよい。非限定的例として、m N S は突然変異型の対象の遺伝子を標的にし、同時に置換体として正常なまたは工学的に処理されたコピーを提供することができるであろう。追加の実施形態では、プロモーターおよび対象の遺伝子を、ゲノムへの組込みを促進することになる 1 つもしくは複数の配列の近傍にまたは内部に置いてよい。本発明において有用なプロモーターの例には、ウイルスプロモーター、レトロウイルスプロモーター、哺乳動物プロモーター、植物プロモーター、細菌プロモーター、構成的プロモーター、調節性プロモーター、真菌プロモーター、酵母プロモーター、藻類プロモーター、および昆虫プロモーターが挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明において有用な植物プロモーターには、たとえば、アラビドプシス、ヒマワリ、ワタ、ナタネ (キャノーラを含む)、トウモロコシ、コムギ、トウゴマ、ヤシ、タバコ、ピーナッツ、モロコシ、サトウキビ、またはダイズにおいて同定されたプロモーターが挙げられる。本発明において有用な適切なプロモーターには、たとえば、2 S - 貯蔵タンパク質、ファゼオリン、C a M V 3 5 S、ナピン、クルシフェリン、ユビキチン、オレオシン、キャッサバ葉脈モザイクウイルス、プルニン、レグミン、およびオクトピンシンターゼを含むが、これらに限定されることはない、種子特異的プロモーター、誘導性プロモーター、構成的プロモーターが挙げられる。

40

【0037】

化学的に改変されたもしくは合成ヌクレオチドおよび / または糖類を m N S 分子に導入

50

すれば、外因的に送達される天然RNA分子に固有のインビボ安定性およびバイオアベイラビリティの潜在的限界を克服するための強力な道具を提供することができる。たとえば、化学的に改変されたmNSまたはmNS含有合成ヌクレオチドを使えば、これらの分子は血清中で比較的長い半減期を有する傾向があるために、所与の治療効果に対して比較的低用量の特定のmNSが可能になる。さらに、ある種の化学的改変物は、特定の細胞もしくは組織を標的にし、および/または核酸分子の細胞取込みを改善することにより、核酸分子のバイオアベイラビリティを改善する可能性がある。したがって、化学的に改変されたまたは合成核酸分子の活性が、天然の核酸分子と比べて（たとえば、全RNA核酸分子と比べてとき）低下するとしても、改変されたまたは合成核酸分子の活性全体は、前記分子の安定性および/または送達改善されたことにより天然の分子よりも大きくなる可能性がある。天然の非改変のsiRNAとは違って、化学的に改変されたsiNAは、ヒトにおいてインターフェロン活性を活性化する可能性を最小化する可能性もある。

10

【0038】

一代表的実施形態では、mNSは1つもしくは複数の改変物および/または合成塩基を含んでいてよい。改変物および/または合成塩基の例には、2'-アミノ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-デオキシ、2'-メトキシエチル、4'-チオ、5-C-メチル、「ユニバーサル塩基」、ロックド核酸(LNA)、モルフォリノ、および「非環式ヌクレオチド」ならびに、2'-Oまたは4'-Cメチレン架橋含有ヌクレオチド、末端グリセリルおよび/または逆位デオキシ脱塩基残基取込み、ホスホチオエートヌクレオチド間連鎖、ならびにノーザンコンホメーションを有するヌクレオチド（たとえば、ノーザン擬回転サイクル、たとえば、Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag 編、1984年を参照）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。mNSは、1つまたは複数のデオキシリボヌクレオチドおよび/またはジデオキシリボヌクレオチドをさらに含んでいてよい。

20

【0039】

本明細書で使用する用語「ユニバーサル塩基」とは、その間でほとんど区別なく天然のDNA/RNA塩基のそれぞれと塩基対を形成するヌクレオチド塩基類似物のことである。ユニバーサル塩基の非限定的例には、C-フェニル、C-ナフチルおよび他の芳香族誘導体、イノシン、アゾールカルボキサミド、ならびに当技術分野で公知の3-ニトロピロール、4-ニトロインドール、5-ニトロインドールおよび6-ニトロインドールなどのニトロアゾール誘導体が挙げられる（たとえば、Loakes、2001年、Nucleic Acids Research、29、2437~2447頁を参照）。本明細書で使用する用語「非環式ヌクレオチド」とは、たとえば、リボース炭素(C1、C2、C3、C4、またはC5)のいずれでも、独立してまたは組み合わせてヌクレオチドに不在の所に、非環式リボース糖を有するあらゆるヌクレオチドのことである。

30

【0040】

mNSの塩基は、たとえば、ピリミジンおよびプリン上の、1つまたは複数の位置での、たとえば、置換基の付加または改変により改変することができる。置換基の付加は、たとえば、ピリミジンおよびプリンの二重結合を飽和させてもさせなくてもよい。置換基の例には、アルキル基、ニトロ基、ハロゲン、および/または水素が挙げられるが、これらの限定されるものではない。アルキル基は、いかなる長さでもよく、好ましくは1~6炭素でよい。アルキル基は飽和でも不飽和でもよく、直鎖でも、分岐でも、環状でもよい。ハロゲンは、臭素、ヨウ素、フッ素、および/または塩素を含むが、これらに限定されるものではないハロゲンのいずれでもよい。

40

【0041】

塩基の追加の改変は、塩基中の原子を交換するおよび/または置換により実現してもよい。非限定的例には、塩基中の窒素原子と炭素原子の位置を交換する、炭素原子を窒素および/もしくはケイ素原子で置換する、硫黄原子を酸素原子で置換する、ならびに/または酸素原子を窒素原子で置換することが挙げられる。塩基の他の改変には、追加の五また

50

は六員環などの追加の環を塩基と融合させることが挙げられるがこれらに限定されるものではない。融合環は、種々の追加の基を有してよい。

【0042】

改変された塩基の具体的例には、2, 6 - ジアミノプリン、2 - アミノプリン、シュードイソシトシン、E - 塩基、チオウラシル、リボチミジン、ジヒドロウリジン、プソイドウリジン、4 - チオウリジン、3 - メチルシチジン、5 - メチルシチジン、N⁶ - メチルアデノシン、N⁶ - イソペンテニルアデノシン、- メチルグアノシン、キューオシン、ウイオシン、エテノ - アデニン、エテノ - シトシン、5 - メチルシトシン、プロモチミン、アザアデニン、アザグアニン、2' - フルオロ - ウリジン、および2' - フルオロ - シチジンが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

10

【0043】

m N S は、m N S 分子に存在するヌクレオチドの総数のうちの一定の割合として改変されたヌクレオチドおよび/または合成ヌクレオチドを含んでいてよい。したがって、本発明のm N S 分子は、通常、ヌクレオチド位置の約5% ~ 約100% (たとえば、ヌクレオチド位置のうちの5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%) 改変されたヌクレオチドおよび/または合成ヌクレオチドを含んでいてよい。所与のm N S 分子に存在する改変されたヌクレオチドの実際の割合は、m N S に存在するヌクレオチドの総数に依拠する。

【0044】

20

特定の実施形態では、本発明のm N S は、種々のヌクレオチドを順々に結合させる分子骨格を含んでいる。m N S の実施形態は、リボース、2' - O - アルキルリボース、2' - O - メチルリボース、2' - O - アリルリボース、デオキシリボース、2 - デオキシリボース、モルフォリノ、および/またはペプチド骨格を含むが、これらに限定されることはない分子骨格を有してよい。前記骨格は、糖および/または非糖ユニットを含んでいてよい。これらのユニットは、当技術分野で公知のいかなる方法によって互いに結合させてもよい。ヌクレオチドは連結基により結合させてよい。連結基の一部の例には、リン酸、チオリン酸、ジチオリン酸、メチルリン酸、アミデート、ホスホロチオエート、メチルホスホン酸、ジチオリン酸、および/またはホスホロジアミデート基が挙げられるが、これらに限定されるものではない。あるいは、ヌクレオチドは互いに直接結合されてもよい。

30

【0045】

糖骨格は、天然に存在する任意の糖を含んでいてもよい。天然に存在する糖の例には、リボース、デオキシリボース、および/または2 - デオキシリボースが挙げられるが、これらに限定されるものではない。骨格の糖ユニットは、改変された糖骨格が切断に対して耐性であるように改変してよい。骨格の糖は、たとえば、ヌクレアーゼ切断に対する耐性を得るように、当技術分野で公知の方法により改変してよい。改変された糖の例には、2' - O - メチルリボースなどの2' - O - アルキルリボースおよび2' - O - アリルリボースが挙げられるが、これらに限定されるものではない。糖ユニットは、リン酸リンカーにより結合してよい。本発明の典型的な糖ユニットは、3' - 5'、3' - 3'、または5' - 5' 連鎖により互いに連結してよい。さらに、2' OHが他の方法で改変されなければ、2' - 5' 連鎖も可能である。

40

【0046】

非糖骨格は、塩基が結合できる任意の非糖分子を含んでいてよい。非糖骨格は当技術分野では公知である。例には、モルフォリノおよびペプチド核酸(PNA)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。モルフォリノ骨格は、モルフォリノ環(テトラヒドロ - 1, 4 - オキサジン)で構成されており、非イオン性ホスホロジアミデート基により結合してよい。当技術分野で公知の改変されたモルフォリノを本発明において使用してもよい。

【0047】

50

塩基を分子連鎖によりアミノ酸骨格に結合させるとPNAが生じる。そのような連鎖の例には、メチレンカルボニル、エチレンカルボニル、およびエチル連鎖が挙げられるが、これらに限定されるものではない。アミノ酸は、天然でも非天然でも、改変でも非改変でも、いかなるアミノ酸でもよく、好ましくはアミノ酸である。アミノ酸は、互いに同一でも異なっていてよい。適切なアミノ酸の1つの非限定的例には、(2-アミノエチル)-アミノ酸などのアミノアルキルアミノ酸が挙げられる。

【0048】

PNAの例には、N-(2-アミノエチル)-グリシン、シクロヘキシルPNA、レトロインベルソ(retro-inverso)、ホスホン(phosphone)、プロピニル、およびアミノプロリン-PNAが挙げられるが、これらに限定されるものではない。PNAは、当技術分野で公知の方法により化学的に合成されてもよい。例には、改変Fmocおよび/またはtBocペプチド合成プロトコルが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0049】

上記の均一アンチセンスオリゴヌクレオチドに加えて、複数種類の骨格を単一のmNS分子中に混合してもよいことは当業者には明らかである。たとえば、単一mNS分子は、1つまたは複数の2'-O-メチルヌクレオチド、1つまたは複数のモルフォリノ、1つまたは複数のRNAヌクレオチド、および1つまたは複数のPNAを含有してよい。

【0050】

本発明のmNSがhpANAsを含む実施形態では、hpANAs中のsiNAおよび/またはasNAの長さは、その長さが標的と特異的にハイブリダイズするのに十分である限り、決定的に重要ではない。たとえば、塩基対合セグメントは、約2~約100塩基、約10~50塩基、約25塩基、または約10と約75塩基間の任意の個々の数を有してよい。

【0051】

siNAおよび/またはasNAセグメントの長さを決定するときには、標的特異性、結合安定性、細胞輸送および/またはインビボ送達などの種々の要因を検討してよい。siNAおよび/またはasNAセグメントは、対象の標的に安定的に結合するのに十分な長さであるべきである。その上、siNAおよび/またはasNAセグメントは、長い配列よりは短い配列ほどゲノム中の他の場所に存在する確率は高くなるので、妥当な結合特異性を可能にするのに十分な長さであるべきである。siNAおよび/もしくはasNAセグメントの長さに関連する追加の検討事項には、インビボもしくはエキソビボ送達の効率、インビボまたはインビトロにおけるsiNAおよび/もしくはasNAセグメントの安定性、ならびに/あるいはsiNAおよび/もしくはasNAセグメントが結合しているまたは結合していない対象の標的の安定性が挙げられる。

【0052】

追加の実施形態では、mNS分子は、種々の適用においてその使用を最適化するように改変してよい。最適化には、送達、細胞取込み、細胞内局在、および/または薬物動態を改善する1つまたは複数の改変を含んでよいが、これらに限定されるものではない。mNS分子を改変してよい1つの方法は、特定のシグナル配列の付加による。例には、核内繫留シグナル、核移行シグナル、ならびに/または、細胞膜、血液脳関門、および/もしくは胎盤関門を通過する輸送を促進する配列が挙げられるが、これらに限定されるものではない。具体的例には、ポリリジン、ポリ(E-K)、SV40T抗原核移行シグナル、HIV-TATタンパク質のN末端、ショウジョウバエアンテナペディアンパク質由来ペプチド、たとえば、Chenら、Nature Biotechnology、24:4455~460頁により記載されたペプチドなどの経皮送達ペプチド、および/またはダウディ(Dowdy) Tatペプチドが挙げられるが、これらに限定されるものではない。アンチセンスオリゴヌクレオチドを特定の細胞型に局在させる配列も企図されている。一実施形態では、本発明は、本発明のmNS分子を含む活性成分を特徴とする。

【0053】

追加の実施形態では、mNSは、1つまたは複数の担体、アジュバンド、および/また

10

20

30

40

50

は希釈剤と組み合わせて、生体のための薬物または化学的治療薬を形成してもよい。そのような担体、アジュバンド、および/または希釈剤の例には、水、生理食塩水、リンゲル液、コレステロールおよび/もしくはコレステロール誘導体、リボソーム、リポフェクシン、リポフェクタミン、脂質固定化ポリエチレングリコール、ブロック共重合体 F 108、ならびに/または、ジオレオオキシホスファチジルエタノールアミン (dioleooxyphosphatidylethanolamine)、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、 α -トコフェロール、および/もしくはシクロスポリンなどのホスファチドが挙げられるが、これらに限定されるものではない。多くの場合、mNS 分子は、1 つまたは複数の担体、アジュバンド、および/または希釈剤と混合させて、疾患、感染、または状態を治療するのに使用することができる分散組成物または分散薬物を形成してよい。たとえば、Remington's Pharmaceutical Sciences; Goodman and Gilman's The Pharmacologic Basis of Therapeutics; Current Protocols in Molecular Biology を参照されたい。そのような分散組成物を使用して、疾患もしくは感染過程に、または動物もしくは植物産物の産生に関与する遺伝子、ヌクレオチド配列および/もしくはタンパク質の適切な発現を中断させてもよいことは当業者には明らかだと考えられる。たとえば、前記組成物を使用して、脂肪酸合成遺伝子または脂質代謝遺伝子の産物のレベルを増加させた植物を作製してもよい。

10

【0054】

mNS 分子は、アジュバンドおよび/または担体を含んでも含まなくても、mNS 分子が標的の発現を調節することができる任意の形で生物または対象に投与してよい。例には、部位特異的注射、全身注射、ならびに/または静脈内に、経口的に、および/もしくは局所的に投与することが挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明が企図する生物および対象には、細菌、細胞、細胞培養系、植物、真菌、動物、線虫、昆虫、および/またはヒトなどの哺乳動物が挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明が企図とする植物には、たとえば、アラビドプシス、ヒマワリ、ワタ、ナタネ (キャノーラを含む)、トウモロコシ、コムギ、トウゴマ、ヤシ、タバコ、ピーナッツ、モロコシ、サトウキビ、およびダイズが挙げられる。

20

【0055】

標的は、たとえば、哺乳動物遺伝子、植物遺伝子、ウイルス遺伝子、真菌遺伝子、細菌遺伝子、植物ウイルス遺伝子、もしくは哺乳動物ウイルス遺伝子などの、内在性遺伝子、外来遺伝子、ウイルス核酸または RNA でもよい核酸でよい。哺乳動物ウイルスの例には、C 型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、B 型肝炎ウイルス、単純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、ヒトパピローマウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、インフルエンザウイルス、および重症急性呼吸器症候群ウイルス (SARS) が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

30

【0056】

当業者には明らかになるように、標的はヌクレオチド配列でもタンパク質でもよい。その上理解されることになるように、本発明の mNS 分子はタンパク質それ自体を改変することはなく、むしろ、そのタンパク質の産生を制御する分子を標的にする。タンパク質の例には、内在性タンパク質、外来タンパク質、哺乳動物タンパク質、植物タンパク質、ウイルスタンパク質、真菌タンパク質、細菌タンパク質、植物ウイルスタンパク質、または哺乳動物ウイルスタンパク質が挙げられるが、これらに限定されるものではない。ヌクレオチド配列の例には、DNA、RNA、および PNA 配列が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

40

【0057】

一実施形態では、本発明の mNS 分子は、センス領域およびアンチセンス領域を含み、前記センス領域には、5' 末端、3' 末端、または 5' 末端と 3' 末端の両方に末端キャップ部分が含まれる。キャップ部分は、逆位デオキシ脱塩基部分でも、逆位デオキシチミジン部分でも、チミジン部分でもよい。

50

【 0 0 5 8 】

本発明の一特定の実施形態は、本発明の少なくとも1つのm N S分子をコードする核酸配列を、その核酸分子の発現を可能にする形で含むベクターを提供する。ベクターの例には、プラスミド、コスミド、レトロウイルスベクター、アグロバクテリウム、ウイルスベクター、細菌ベクター、酵母ベクター、真核生物ベクター、植物ベクター、および哺乳動物ベクターが挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明の他の実施形態は、そのようなベクターを含む哺乳動物細胞、植物細胞、またはアグロバクテリウムを提供する。細胞は、たとえば、ヒトの細胞などの天然の哺乳動物のものでよい。ベクターのm N S分子は、センス領域、アンチセンス領域、アンチセンス配列、および/または遺伝子を含んでよい。

10

【 0 0 5 9 】

一実施形態では、本発明のm N S分子は、細胞または再構成されたインビトロ系内部でRNA干渉(RNAi)を媒介することができる化学的に改変された低分子干渉核酸分子(s i N A)を特徴とし、前記化学的改変には、化学的に改変されたs i N A分子に結合したコンジュゲートが含まれる。前記コンジュゲートは、共有結合を介して化学的に改変されたs i N A分子に結合してよい。特定の実施形態では、コンジュゲートは生分解性リンカーを介して化学的に改変されたs i N A分子に結合している。コンジュゲート分子は、化学的に改変されたs i N A分子のセンス鎖、アンチセンス鎖、または両鎖のいずれかの3'末端で結合することができる。コンジュゲート分子は、化学的に改変されたs i N A分子のセンス鎖、アンチセンス鎖、または両鎖のいずれかの5'末端で結合することができる。コンジュゲート分子は、化学的に改変されたs i N A分子のセンス鎖、アンチセンス鎖、もしくは両鎖のいずれかの、またはそのいかなる組合せでも、その3'末端と5'末端の両方で結合することもできる。本発明のコンジュゲート分子は、細胞などの生物系への化学的に改変されたs i N A分子の送達を促進する分子を含むことができる。特定の実施形態では、化学的に改変されたs i N A分子に結合しているコンジュゲート分子は、ポリエチレングリコール、ヒト血清アルブミン、または細胞取込みを媒介する可能性のある細胞レセプターのリガンドである。本発明が企図している、化学的に改変されたs i N A分子に結合することができる特定のコンジュゲート分子の例は、V a r g e e s eら、米国特許出願第10/201,394号に記載されている。使用されるコンジュゲートの種類および本発明のs i N A分子のコンジュゲーションの程度は、改善された薬物動態学的プロファイル、バイオアベイラビリティ、および/または、同時にRNAi活性を媒介するs i N Aの能力を維持しているs i N A構築物の安定性について評価してよい。したがって、当業者は、種々のコンジュゲートで改変されるs i N A構築物をスクリーニングして、s i N Aコンジュゲート複合体が、たとえば、当技術分野で一般に公知の動物モデルなどにおいて、RNAiを媒介する能力を維持しつつ改善された特性を有しているかどうかを判定してよい。

20

30

【 0 0 6 0 】

別の実施形態では、本発明は、細胞内で遺伝子の発現を調節するための方法の特徴とする。この方法は、m N S分子が遺伝子のRNAに相補的な配列を含んでいる本発明のm N S分子を合成することを含み、この分子は化学的に改変してもよい。m N S分子は、標的RNAの配列に実質的に類似の配列を含むことができる。次に、m N S分子は、細胞内で遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、細胞に導入することができる。

40

【 0 0 6 1 】

別の実施形態では、本発明は、細胞内で2つ以上の遺伝子の発現を調節するための方法の特徴とする。この方法は、m N S分子が遺伝子のRNAに相補的な配列を含んでいる本発明のm N S分子を合成することを含み、この分子は化学的に改変してもよい。次に、m N S分子は、細胞内で遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、細胞に導入することができる。

【 0 0 6 2 】

別の実施形態では、本発明は、細胞内で2つ以上の遺伝子の発現を調節するための方法

50

を特徴とする。この方法は、m N S 分子が遺伝子の R N A に相補的な配列を含んでおり、m N S 分子が標的 R N A の配列に実質的に類似の配列を含んでいる本発明の m N S 分子を合成することを含み、この分子は化学的に改変してもよい。次に、m N S 分子は、細胞内で遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、細胞に導入することができる。

【 0 0 6 3 】

特定の実施形態では、本発明の m N S 分子は、エキソビが適用において試薬として使用される。たとえば、m N S 分子は、治療効果のために生物または対象に移植されている組織または細胞に導入することができる。この細胞および / または組織は、後に外植をうける生物または対象に由来してよい。あるいは、この細胞および / または組織は、移植に先立って別の生物または対象に由来してよい。m N S 分子を使用して、細胞または組織が所望の表現型を獲得しインビボで移植されたときに機能を果たすことができるように、細胞または組織内で 1 つまたは複数の遺伝子の発現を調節してよい。一実施形態では、生物または対象由来のある種の標的細胞が抽出される。これらの抽出された細胞は、これらの細胞による m N S 分子の取込みに適した条件下で、細胞内で特定のヌクレオチド配列を標的にする m N S 分子に接触させる（たとえば、m N S 分子の細胞内への送達を促進するために、陽イオン性脂質、リポソームおよび同類のものなどの送達試薬を使用して、またはエレクトロポレーションなどの技法を使用して）。次に、前記細胞は、同一の生物または他の生物に再導入されて戻される。エキソビが適用の非限定的例には、器官 / 組織移植における、組織移植、もしくは肺疾患（たとえば、再狭窄）の治療における使用、または、静脈移植血管における新生内膜肥厚化およびアテローム硬化症を予防すること、が挙げられる。そのようなエキソビが適用を利用して、冠動脈および末梢バイパス移植不全に付随する状態を治療してもよく、たとえば、そのような方法は、末梢血管バイパス移植手術および冠動脈バイパス移植手術と併用してよい。追加の適用には、アルツハイマー病、パーキンソン病、てんかん、認知症、ハンチントン病、または筋萎縮性側索硬化症（A L S）などの神経変性状態の治療における使用を含む、中枢神経系障害または損傷を治療するための移植における使用が挙げられる。

【 0 0 6 4 】

さらに別の実施形態では、本発明は、生物における遺伝子の発現を調節する方法を特徴とする。この方法には、m N S 分子が遺伝子の R N A に相補的な配列を含む、本発明の m N S 分子を合成することを含む。次に、m N S 分子は、生物中で遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、生物に導入することができる。

【 0 0 6 5 】

別の実施形態では、本発明は、生物における 2 つ以上の遺伝子の発現を調節する方法を特徴とする。この方法は、m N S 分子が遺伝子の R N A に相補的な配列を含む、本発明の m N S 分子を合成することを含む。次に、m N S 分子は、生物中で遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、生物に導入することができる。代替の実施形態では、本発明は、m N S 分子が遺伝子の R N A に対する相補性を有する配列を含む、本発明の m N S 分子を合成することにより細胞内で遺伝子の発現を調節するための方法の特徴とする。次に、m N S 分子は、細胞中で遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、細胞に導入することができる。

【 0 0 6 6 】

他の実施形態では、本発明は、細胞内で 2 つ以上の遺伝子の発現を調節するための方法であって、本発明の m N S 分子を合成することを含み、m N S 分子が遺伝子の R N A に対する相補性を有する配列を含む方法の特徴とする。次に、m N S 分子は、細胞内での遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、インビトロでまたはインビボで細胞に接触させることができる。別の実施形態では、本発明は生物内で遺伝子の発現を調節する方法を含む。遺伝子の R N A に対する相補性を有する m N S 分子は合成することができ、m N S 分子は、生物内で遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で生物に導入することができる。別の実施形態は、遺伝子の R N A に対する相補性を有する配列を含む m N S 分子を合成し、m N S 分子を、生物内で遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で生物に導入する

ことにより、生物内で2つ以上の遺伝子の発現を調節する方法を特徴とする。別の実施形態は、生物内で遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で生物を本発明のm N S分子に接触させることにより、生物内で遺伝子の発現を調節する方法を含む。さらに別の代替の実施形態は、生物内で遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で生物を本発明の1つまたは複数のm N S分子に接触させることにより、生物内で2つ以上の遺伝子の発現を調節する方法を特徴とする。

【0067】

本発明のm N S分子は、種々のRNA分子のRNA i ターゲティングを通じて標的遺伝子発現を阻害するように設計してよい。一実施形態では、本発明のm N S分子を使用して、標的遺伝子に対応する種々のRNAを標的にすることができる。そのようなRNAの非
10 限定的例には、メッセンジャーRNA (m RNA)、標的遺伝子(複数可)の選択的RNA
A スプライスバリエーション、標的遺伝子(複数可)の転写後修飾RNA、標的遺伝子(複数
可)のRNA 前駆体、および/またはRNA 鋳型が挙げられる。選択的スプライシングが
、適切なエクソンの使用により区別される転写物ファミリーを作製する場合には、本発明
を使用して、遺伝子ファミリーメンバーの機能を特異的に阻害するまたはその機能を区別
するために、適切なエクソンを通じて遺伝子発現を阻害してよい。たとえば、選択的にス
プライスされた膜貫通ドメインを含有するタンパク質を膜結合型と分泌型の両方で発現さ
せてよい。膜貫通ドメインを含有するエクソンを標的にする本発明の使用により、分泌型
のタンパク質と対照的に、膜結合型の薬剤ターゲティングの機能的結果を判定してよい。
20 これらのRNA 分子を標的にすることに関連する本発明の適用の非限定的例には、治療的
薬剤適用、分子および薬剤発見適用、動物および植物産物/分子の改変、分子診断と遺伝
子機能適用、ならびに遺伝子地図作製、たとえば、本発明のs i RNA 分子での単一ヌクレ
オチド多型地図作製を使用したものが挙げられる。そのような適用は、既知の遺伝子配列
を使用して、または発現配列タグ(E S T)から入手可能な部分的配列から実行してよい
。本発明の一実施形態では、改変は、植物中の脂肪酸合成遺伝子または脂質代謝遺伝子を
含む。

【0068】

別の実施形態では、本発明のm N S分子を使用して、遺伝子ファミリー(または複数可)
に対応する保存配列を標的にすることができる。したがって、複数の遺伝子標的を標的
にするm N S分子は、(植物または種子中の脂肪酸合成の生産などにおける)増加した生
30 物学的効果または改変された効果を提供する可能性がある。さらに、m N S分子を使用し
て、種々の適用における遺伝子機能の経路を特徴づけてよい。たとえば、本発明を使用し
て、経路中の標的遺伝子(複数可)の活性を阻害し、遺伝子機能分析、m RNA 機能分析
、または翻訳分析において特徴づけられていない遺伝子(複数可)の機能を決定すること
ができる。本発明を使用して、産物、分子、または医薬品開発に向けて、種々の疾患およ
び状態に關与する潜在的標的遺伝子経路を決定することができる。本発明を使用して、た
とえば、出生前発育および出生後発育などの発育、ならびに/または、癌、感染症、自己
免疫、炎症、内分泌障害、腎疾患、肺疾患、心血管疾患、先天性欠損、加齢、遺伝子発現
に關連する他のあらゆる疾患または状態の進行および/もしくは維持に關与している遺伝
40 子発現の経路を理解することができる。本発明を使用して、植物もしくは動物において遺
伝子発現を改変してもよく、または本発明を使用して、たとえば、植物および植物種子に
おける脂肪酸合成の改変などの動物もしくは植物産物の合成を改変してもよい。

【0069】

別の実施形態では、本発明は、標的遺伝子を確認する方法を特徴とする。この方法は、
化学的に改変されさらに標的遺伝子のRNA に相補的な配列を含んでもよい、本発明のm
N S 分子を合成することを含む。次に、m N S 分子は、生物系において標的遺伝子の発現
を調節するのに適した条件下で生物系に導入することができる。その後、前記遺伝子の機
能は、生物系におけるあらゆる表現型の変化について評価することにより決定することが
できる。

【0070】

10

20

30

40

50

「生物系」とは、ヒト、動物、植物、昆虫、細菌、ウイルスまたは他の供給源を含むが、これらに限定されることはない生物学的供給源由来の、精製されたまたは精製されていない形の物質のことであり、前記系はRNAi活性に必要な成分を含む。用語「生物系」は、たとえば、細胞、組織、もしくは生物、またはその抽出物を含む。用語「生物系」は、インビトロ背景 (setting) において使用してよい再構成されたRNAiシステムも含む。

【0071】

「表現型の変化」とは、本発明の核酸分子 (たとえば、mNS) との接触、または、これによる治療に応じて生じる細胞にとってのあらゆる検出可能な変化のことである。そのような検出可能な変化には、形状、大きさ、増殖、運動性、タンパク質発現もしくはRNA発現、または、当技術分野で公知の方法により評価される他の物理的もしくは化学的変化が挙げられるが、これらに限定されるものではない。検出可能な変化は、発現されたタンパク質または評価される可能性のある他のあらゆる細胞成分を同定するために使用される緑色蛍光タンパク質 (GFP) もしくは種々のタグなどのレポーター遺伝子 / 分子の発現も含んでよい。

10

【0072】

特定の実施形態では、本発明は、細胞、組織、または生物において標的の発現を調節するのに使用することができる本発明のmNS分子を含有するキットを特徴とする。別の実施形態では、化学的に改変してよく、細胞、組織、または生物において2つ以上の標的遺伝子の発現を調節するのに使用してよい本発明の2つ以上のmNS分子を含有するキットを、本発明は特徴とする。さらに別の実施形態では、本発明は、生物系において遺伝子の発現を調節するのに使用してよい本発明のmNS分子をコードするベクターを含有するキットを特徴とする。別の実施形態では、本発明は、生物系において2つ以上の標的遺伝子の発現を調節するのに使用してよい本発明の2つ以上のmNS分子をコードするベクターを含有するキットを特徴とする。

20

【0073】

本発明の別の実施形態は、本発明の1つまたは複数のmNS分子を含有している細胞を特徴とする。一特定の実施形態では、本発明の1つまたは複数のmNS分子をコードするベクターを含有する細胞が提供される。本発明のmNS分子を含有する細胞は、哺乳動物細胞でも植物細胞でもよい。たとえば、mNS分子を含有する細胞は、アラビドプシス、ヒマワリ、ワタ、ナタネ (キャノーラを含む)、トウモロコシ、コムギ、トウゴマ、ヤシ、タバコ、ピーナッツ、モロコシ、サトウキビ、またはダイズ由来でよい。

30

【0074】

本発明は、細胞または再構成された系でRNAiを媒介するmNS分子も含み、mNS分子は、化学的に改変されたmNS分子に対して配列相同性を有する追加の内在性siRNA分子を生成することができる細胞ポリメラーゼのポリメラーゼ活性を調節する本明細書に記載の1つまたは複数の化学的改変物を含む。

【0075】

本発明は、細胞または再構成された系でRNAiを媒介するmNS分子も含み、mNS分子は、mNS分子の細胞取込みを調節する本明細書に記載の1つまたは複数の化学的改変物を含む。一特定の実施形態では、本発明は、標的の発現を媒介するmNS分子を特徴とし、mNS分子は、たとえば、ポリエチレングリコールなどのポリマーコンジュゲートもしくはmNS分子の薬物動態を改善する等価のコンジュゲートを結合させることにより、またはインビボで特定の組織型もしくは細胞型を標的にするコンジュゲートを結合させることにより、mNS分子のバイオアベイラビリティを増加させる本明細書に記載の1つまたは複数の化学的改変物を含む。そのようなコンジュゲートの非限定的例は、Vargeesら、米国特許出願第10/201,394号に記載されている。

40

【0076】

一実施形態では、本発明は、(a) mNS分子の構造にコンジュゲートを導入すること、および(b) 改善されたバイオアベイラビリティを有するmNS分子を単離するのに適

50

した条件下で段階 (a) の m N S 分子を評価することを含む、バイオアベイラビリティが改善された本発明の m N S 分子を作製するための方法の特徴とする。そのようなコンジュゲートには、天然に存在するタンパク質リガンド由来のペプチドなどの細胞レセプターのリガンド；細胞 Z I P コード配列を含むタンパク質局在配列；抗体；核酸アプタマー；葉酸および N - アセチルガラクトサミンなどのビタミンおよび他の補因子；ポリエチレングリコール (P E G) などのポリマー；リン脂質；コレステロール；スperlミンまたはスperlミジンなどのポリアミンなどが挙げられ得る。別の実施形態では、ポリエチレングリコール (P E G) は、本発明の m N S 分子に共有結合してよい。結合した P E G は、任意の分子量でよく、好ましくは約 2 0 0 0 ~ 約 5 0 0 0 0 ダルトン (D a) である。

【 0 0 7 7 】

本発明は、単独で使用してもよく、または R N A のインビトロもしくはインビボ導入を実施して試料もしくは対象を試験するのに必要な試薬の少なくとも 1 つを有するキットの成分として使用してもよい。たとえば、前記キットの適切な成分は、本発明の m N S 分子および本明細書に記載の対象の細胞への m N S 分子の導入を促進する媒体を含むことができる (たとえば、脂質および当技術分野で公知の他のトランスフェクションの方法を使用して、たとえば、B e i g e l m a n ら、米国特許第 6 , 3 9 5 , 7 1 3 号を参照)。前記キットは、たとえば、遺伝子機能および / もしくは活性を決定する際の標的確認、または薬物最適化および創薬などにおける標的確認のために使用してよい (たとえば、U s m a n ら、米国特許出願第 6 0 / 4 0 2 , 9 9 6 号を参照)。そのようなキットは、キットの使用者に本発明を実行させる説明書も含まれていてよい。

【 0 0 7 8 】

本明細書で使用される用語「低分子干渉核酸」、「s i N A」、「低分子干渉 R N A」、「s i R N A」、「低分子干渉核酸分子」、「低分子干渉オリゴヌクレオチド分子」、または「化学的に改変された低分子干渉核酸分子」とは、たとえば、R N A 干渉「R N A i」または遺伝子サイレンシングを配列特異的な形で媒介することにより、遺伝子発現もしくはウイルス複製を阻害するまたは下方調節することができるあらゆる核酸分子のことであり、たとえば、B a s s、2 0 0 1 年、N a t u r e、4 1 1、4 2 8 ~ 4 2 9 頁；E l b a s h i r ら、2 0 0 1 年、N a t u r e、4 1 1、4 9 4 ~ 4 9 8 頁；ならびに K r e u t z e r ら、国際 P C T 出願国際公開第 0 0 / 4 4 8 9 5 号；Z e r n i c k a - G o e t z ら、国際 P C T 出願国際公開第 0 1 / 3 6 6 4 6 号；F i r e、国際 P C T 出願国際公開第 9 9 / 3 2 6 1 9 号；P l a e t i n c k ら、国際 P C T 出願国際公開第 0 0 / 0 1 8 4 6 号；M e l l o と F i r e、国際 P C T 出願国際公開第 0 1 / 2 9 0 5 8 号；D e s c h a m p s - D e p a i l l e t t e、国際 P C T 出願国際公開第 9 9 / 0 7 4 0 9 号；および L i ら、国際 P C T 出願国際公開第 0 0 / 4 4 9 1 4 号；A l l s h i r e、2 0 0 2 年、S c i e n c e、2 9 7、1 8 1 8 ~ 1 8 1 9 頁；V o l p e ら、2 0 0 2 年、S c i e n c e、2 9 7、1 8 3 3 ~ 1 8 3 7 頁；J e n u w e i n、2 0 0 2 年、S c i e n c e、2 9 7、2 2 1 5 ~ 2 2 1 8 頁；および H a l l ら、2 0 0 2 年、S c i e n c e、2 9 7、2 2 3 2 ~ 2 2 3 7 頁；H u t v a g n e r と Z a m o r e、2 0 0 2 年、S c i e n c e、2 9 7、2 0 5 6 ~ 6 0 頁；M c M a n u s ら、2 0 0 2 年、R N A、8、8 4 2 ~ 8 5 0 頁；R e i n h a r t ら、2 0 . 0 2 年、G e n e & D e v .、1 6、1 6 1 6 ~ 1 6 2 6 頁；および R e i n h a r t と B a r t e l、2 0 0 2 年、S c i e n c e、2 9 7、1 8 3 1 頁を参照)。たとえば、前記 s i N A は、アンチセンス領域は標的核酸分子中のヌクレオチド配列またはその一部に相補的であるヌクレオチド配列を含み、センス領域は標的核酸配列に一致するヌクレオチド配列またはその一部を有する、相補的なセンス領域とアンチセンス領域を含む二本鎖ポリヌクレオチド分子でよい。

【 0 0 7 9 】

s i N A は、一方の鎖がセンス鎖であり、他方がアンチセンス鎖であり、アンチセンス鎖とセンス鎖は相補的である (すなわち、アンチセンス鎖とセンス鎖で二重または二本鎖構造を形成する場合などの、各鎖がもう一方の鎖のヌクレオチド配列に相補的であるヌク

10

20

30

40

50

レオチド配列を含み、たとえば、二本鎖領域は約19塩基対である)、2つの別々のオリゴヌクレオチドから構築してよい。前記アンチセンス鎖は標的核酸分子中のヌクレオチド配列またはその一部に相補的であるヌクレオチド配列を含み、前記センス鎖は標的核酸配列に一致するヌクレオチド配列またはその一部を含む。あるいは、*siNA*は、*siNA*の相補的なセンス領域とアンチセンス領域が、非核酸を基にするリンカー(複数可)に基づく核酸によって連結されている、単一オリゴヌクレオチドから構築することができる。*siNA*は、アンチセンス領域が別々の標的核酸分子中のヌクレオチド配列またはその一部に相補的であるヌクレオチド配列を含み、センス領域が標的核酸配列に一致するヌクレオチド配列またはその一部を有する、相補的なセンス領域とアンチセンス領域を有する二重、非対称二重、ヘアピンまたは非対称ヘアピン二次構造のポリヌクレオチドでよい。*siNA*は、アンチセンス領域が標的核酸分子中のヌクレオチド配列またはその一部に相補的であるヌクレオチド配列を含み、センス領域が標的核酸配列に一致するヌクレオチド配列またはその一部を有する、相補的なセンス領域とアンチセンス領域を含む2つ以上のループ構造およびステムを有する環状一本鎖ポリヌクレオチドでよい。環状ポリヌクレオチドは、*RNAi*を媒介することができる活性*siNA*分子を生成するようにインビトロでもインビトロでもプロセッシングしてよい。*siNA*は、標的核酸分子中のヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を有する一本鎖ポリヌクレオチドを含んでいてもよい(たとえば、そのような*siNA*分子が、*siNA*分子内における標的核酸配列に一致するヌクレオチド配列またはその一部の存在を必要としない場合)。一本鎖ポリヌクレオチドは、5'-リン酸(たとえば、Martinezら、2002年、Cell、110、563~574頁およびSchwarzら、2002年、Molecular Cell、10、537~568頁を参照)または5'、3'-二リン酸などの末端リン酸基をさらに含んでいてよい。

【0080】

ある種の実施形態では、本発明の*siNA*分子は、センス領域とアンチセンス領域が当技術分野で公知のヌクレオチドまたは非ヌクレオチドリinker分子により共有結合している、別々のセンスおよびアンチセンス配列または領域を含むことができる。あるいは、センス領域とアンチセンス領域は、イオン相互作用、水素結合、ファンデルワールス相互作用、疎水性相互作用、および/またはスタッキング相互作用により非共有結合することができる。ある種の実施形態では、本発明の*siNA*分子は、標的遺伝子のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含む。本発明の*siNA*分子は、標的遺伝子の発現を阻害する形で標的遺伝子のヌクレオチド配列と相互作用をすることができる。本発明の*siNA*分子は、*RNA*のみを含有する分子に限定される必要はなく、化学的に改変されたヌクレオチドおよび非ヌクレオチドをさらに包含してよい。ある種の実施形態では、本発明の低分子干渉核酸分子は、2'-ヒドロキシ(2'-OH)含有ヌクレオチドを欠く。特定の実施形態は、*RNAi*を媒介するための2'-ヒドロキシ基を有するヌクレオチドの存在を必要としない低分子干渉核酸を含み、したがって、本発明の低分子干渉核酸分子は、場合により、リボヌクレオチド(すなわち、2'-OH基を有するヌクレオチド)を含まなくてもよい。しかし、*siNA*分子内に*RNAi*を支持するリボヌクレオチドの存在を必要としないそのような*siNA*分子は、2'-OH基のある1つまたは複数のヌクレオチドを含有する1つまたは複数の結合したリンカーあるいは他の結合したまたは会合した基、部分、もしくは鎖を有していてよい。場合によって、*siNA*分子は、ヌクレオチド位置のうちの約5、10、20、30、40または50%で、リボヌクレオチドを含んでいてよい。

【0081】

本発明の改変された低分子干渉核酸分子は、低分子干渉改変オリゴヌクレオチド「*siMON*」と呼んでもよい。本明細書で使用するように、用語*siNA*は、たとえば、低分子干渉*RNA*(*siRNA*)、二本鎖*RNA*(*dsRNA*)、マイクロ*RNA*(*miRNA*)、低分子ヘアピン*RNA*(*shRNA*)、低分子干渉オリゴヌクレオチド、低分子干渉核酸、低分子干渉改変オリゴヌクレオチド、化学的改変*siRNA*、転写後遺伝子サイレ

ンシングRNA (p t g s RNA) などの、配列特異的RNA i を媒介することができる核酸分子を記載するのに使われる他の用語と等価である。さらに、本明細書で使われるように、用語RNA i は、転写後遺伝子サイレンシング、翻訳阻害、またはエピジェネティクスなどの、配列特異的RNA 干渉を記載するのに使われる他の用語と等価である。たとえば、本発明のs i N A 分子を使用して、転写後レベルと転写前レベルの両方で遺伝子を後成的に発現停止させてよい。非限定的例として、本発明のs i N A 分子による遺伝子発現の後成的調節は、遺伝子発現を改変するクロマチン構造のs i N A 媒介改変から生じることがある(たとえば、Allshire、2002年、Science、297、1818~1819頁; Volpeら、2002年、Science、297、1833~1837頁; Jenuwein、2002年、Science、297、2215~2218頁; およびHallら、2002年、Science、297、2232~2237頁を参照)。

【0082】

用語「非対称的ヘアピン」は、アンチセンス領域、ヌクレオチド又は非ヌクレオチドを含んでいてもよいループ部分、および含んでいるヌクレオチドがアンチセンス領域よりも少ないセンス領域(センス領域がアンチセンス領域と塩基対合してループのある二重鎖を形成するのに十分な相補的ヌクレオチドを有する程度に)を含む直鎖状s i N A 分子を意味する。たとえば、本発明の非対称ヘアピンs i N A 分子は、細胞またはインビトロ系においてRNA i を媒介するのに十分な長さ(たとえば、約19~約22ヌクレオチド)および約4~約8ヌクレオチドを含むループ領域のあるアンチセンス領域、ならびにアンチセンス領域と相補的である約3~約18ヌクレオチドを有するセンス領域を含んでいてよい。非対称ヘアピンs i N A 分子は、化学的に改変してもよい5'-末端リン酸基も含んでいてよい。非対称ヘアピンs i N A 分子のループ部分は、本明細書に記載するヌクレオチド、非ヌクレオチド、リンカー分子、またはコンジュゲート分子を含んでいてよい。

【0083】

用語「調節する」は、遺伝子の発現、あるいは、RNA 分子または1つもしくは複数のタンパク質またはタンパク質サブユニットをコードする等価なRNA 分子のレベル、あるいは1つもしくは複数のタンパク質またはタンパク質サブユニットの活性またはレベルが、発現、レベル、もしくは活性がモジュレーターの不在下で観察される発現、レベル、もしくは活性よりも大きくまたは低くなるように、上方調節または下方調節されることを意味する。たとえば、用語「調節する」は、「阻害する」を意味してもよいが、この定義に限定されるものではない。

【0084】

用語「阻害する」、「下方調節する」または「減少させる」は、遺伝子の発現、あるいは、RNA 分子または1つもしくは複数のタンパク質またはタンパク質サブユニットをコードする等価なRNA 分子のレベル、あるいは1つもしくは複数のタンパク質またはタンパク質サブユニットの活性が、本発明のm N S 分子の不在下で観察される発現、レベル、もしくは活性よりも低く減少されることを意味する。特定の実施形態では、m N S 分子を使用した阻害、下方調節、または減少により、不活性または減弱された分子の存在下で観察されるレベルより低いレベルになる。同様に、m N S 分子を使用した阻害、下方調節、または減少により、たとえば、スクランブルされた配列のあるまたはミスマッチのあるm N S 分子の存在下で観察されるレベルよりも低いレベルになる。別の実施例では、本発明の核酸分子を使用した遺伝子発現の阻害、下方調節、または減少は、前記核酸分子の存在下のほうがその不在下よりも大きくなる。

【0085】

「遺伝子」または「標的遺伝子」とは、RNA をコードする核酸、たとえば、ポリペプチドをコードする構造遺伝子を含むが、これに限定されるものではない核酸配列のことである。標的遺伝子は、細胞に由来する遺伝子、内在性遺伝子、導入遺伝子、または、感染後に細胞に存在する病原体(たとえば、ウイルス)の遺伝子などの外来性遺伝子でもよい。標的遺伝子を含有する細胞は、植物、動物、原生動物、ウイルス、細菌、または真菌な

10

20

30

40

50

どのいかなる生物に由来するものでもよいし、そこに含有されるものでよい。植物の非限定的例には、単子葉植物、双子葉植物、または裸子植物、さらに具体的には、アラビドプシス、ヒマワリ、ワタ、ナタネ、トウモロコシ、ヤシ、タバコ、ピーナッツ、またはダイズが挙げられる。動物の非限定的例には、脊椎動物または無脊椎動物が挙げられる。真菌の非限定的例には、カビまたは酵母が挙げられる。

【0086】

「高度に保存された配列領域」とは、標的遺伝子中の、一世代からもう1つの世代へまたは一生物系からもう1つの生物系へ著しく変化することのない1つまたは複数の領域のヌクレオチド配列を意味する。

【0087】

「センス領域」とは、s i N A分子のアンチセンス領域に対して相補性を有するs i N A分子のヌクレオチド配列を意味する。s i N A分子のセンス領域は、標的核酸配列と相同性（すなわち、配列同一性または部分的同一性）を有する核酸配列を含んでいてよい。

【0088】

「アンチセンス領域」とは、標的核酸配列に対して相補性を有するs i N A分子のヌクレオチド配列を意味する。さらに、s i N A分子のアンチセンス領域は、s i N A分子のセンス領域に対する相補性を有する核酸配列を場合により含んでもよい。

【0089】

「標的核酸」とは、その発現または活性が調節されることになるあらゆる核酸配列を意味する。標的核酸は、内在性DNAもしくはRNA、ウイルスDNAもしくはウイルスRNA、またはウイルス、細菌、真菌、動物もしくは植物の遺伝子にコードされている他のRNAなどの、DNAでもRNAでもよい。

【0090】

本出願で言及されるように、「治療すること」または「治療」は、表現型の完全な改変を必要としない。前記用語は、根底にある状態の症状が少なくとも減少されること、ならびに／あるいは、前記症状を引き起こしている1つまたは複数の根底にある細胞性、生理学的、または生化学的原因もしくは機序が減少されるおよび／または除去されることを意味する。この文脈で使用される「減少される」は、状態の生理学的状態だけではなく、状態の分子的状态を含む、状態（condition）の状態（state）に対するものであることを意味すると理解されている。

【0091】

「状態」（condition）とは、対象または生物において、改変したいと願う可能性のあるあらゆる状態のことである。そのような状態は、遺伝子、ヌクレオチド配列、および／もしくはタンパク質の発現または発現の欠如に帰せられるはずである。状態の例には、疾病、遺伝的異常、感染、癌、突然変異、ならびに、脱毛症、肥満、および皮膚のしわを含むが、これらに限定されることはない美容上の状態が挙げられるが、これらに限定されることはない。状態の追加の非限定的例には、対象の正常状態である。たとえば、植物（たとえば、アラビドプシス、ヒマワリ、ワタ、ナタネ、トウモロコシ、ヤシ、タバコ、ピーナッツ、またはダイズ）における正常な脂肪酸産生は、本発明の組成物および方法を使用して改変することができる状態である。したがって、用語「状態」は、科学上、農業上、医療上、および／または個人上の理由で改変することができる任意の状態を含む。

【0092】

「相補性」とは、従来のワトソン - クリック、フーグステイン（Hoogsteen）塩基対合、および／もしくは逆フーグステイン塩基対合または他の従来と異なる種類のものいずれかにより、核酸が別の核酸配列と水素結合（複数可）を形成する可能性があることを意味する。本発明の核酸分子に関しては、核酸分子とその相補的配列の結合自由エネルギーは、核酸の関連機能（たとえば、RNA i 活性）を進行させるのに十分である。核酸分子の結合自由エネルギーの決定は当技術分野では公知である（たとえば、Turnerら、1987年、C S H S y m p . Q u a n t . B i o l . L I I 123 ~ 133頁；F r i e r ら、1986年、P r o c . N a t . A c a d . S c i . U S A 83 : 9373

10

20

30

40

50

～ 9377 頁；Turner ら、1987 年、J. Am. Chem. Soc. 109: 3783～3785 頁を参照）。

【0093】

パーセント相補性は、第 2 の核酸配列と水素結合（たとえば、ワトソン - クリック塩基対合）を形成する可能性のある核酸分子中の近接残基の割合を示す（たとえば、10 のうちの 5、6、7、8、9、10 は 50%、60%、70%、80%、90%、および 100% 相補性である）。「完璧な相補性」とは、核酸配列の近接残基すべてが、第 2 の核酸配列中の同数の近接残基と水素結合することを意味する。

【0094】

本発明の siNA 分子は、癌または癌性疾患、感染症、心血管疾患、神経性疾患、プリオン病、炎症性疾患、自己免疫疾患、肺疾患、腎疾患、肝疾患、ミトコンドリア病、内分泌疾患、生殖関連疾患および状態を含む広範囲の疾患および状態、動物または植物産物合成、ならびに、細胞または生物において発現された遺伝子産物のレベルに応答する可能性のある他のあらゆる徴候への新規の治療的アプローチを表す。

10

【0095】

本明細書で使用するように、「細胞」はその通常の生物学的な意味で使われており、多細胞生物全体を指してはいない。細胞は生物（たとえば、植物および哺乳動物を含む動物）に存在してよい。細胞は原核細胞（たとえば、細菌細胞）でも真核細胞（たとえば、哺乳動物または植物細胞）でもよい。細胞は、体細胞起源でも生殖細胞起源でも、全能性でも多能性でも、分裂性でも非分裂性でもよい。細胞は、たとえば、動物、細菌、植物、または種子由来などの、配偶子もしくは胚、幹細胞、または、完全に分化した細胞由来でも、含んでいてもよい。

20

【0096】

本発明の mNS 分子は、標的細胞もしくは組織に、直接添加することができる、あるいは陽イオン性脂質と複合体を形成しても、リボソーム内にパッケージングしても、または他の方法で送達してもよい。核酸または核酸複合体は、たとえば、生体高分子へ組み込んでもしくは組み込みなしで、注射、遺伝子銃送達、輸液ポンプまたはステントを通して、エキソピボまたはインピボに関連する組織へ局所的に投与してよい。

【0097】

別の態様では、本発明は、本発明の 1 つまたは複数の mNS 分子を含有する細胞を提供する。1 つまたは複数の mNS 分子を、同一部位または異なる部位へ独立して標的にしてよい。

30

【0098】

「RNA」とは、少なくとも 1 つのリボヌクレオチド残基を含む分子を意味する。「リボヌクレオチド」とは、-D-リボ-フラノース部分の 2' 位置にヒドロキシル基のあるヌクレオチドのことである。前記用語には、部分的に精製された RNA、基本的に純粋な RNA、合成 RNA、組換え的に作製された RNA などの二本鎖 RNA、一本鎖 RNA、単離された RNA、ならびに、1 つまたは複数のヌクレオチドの付加、欠失、置換および/または改変により、天然に存在する RNA とは異なっている改変 RNA が含まれる。そのような改変には、例えば、siNA の末端（複数可）へのまたは内部的な（たとえば、RNA の 1 つまたは複数のヌクレオチドで）非ヌクレオチド物質の付加が挙げられる。本発明の RNA 分子のヌクレオチドは、天然に存在しないヌクレオチドまたは化学的に合成されるヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチドなどの、非標準ヌクレオチドも含んでいてよい。これらの改変された RNA は類似物と、または天然に存在する RNA の類似物と呼んでもよい。

40

【0099】

「対象」とは、外植された細胞のドナーもしくはレシピエントである生物、または細胞自体のことである。「対象」は、本発明の核酸分子を投与してよい生物も指している。対象は、植物、植物細胞、哺乳動物、またはヒトの細胞を含む哺乳動物細胞でもよい。

【0100】

50

本発明の別の実施形態は、内在性成分脂肪酸のレベルが改変された植物を作製する方法を提供する。この方法は、脂肪酸合成または脂質代謝遺伝子などの、異種遺伝子のレベルを調節することを含む。植物および種子中での脂肪酸産生は改変することができる。本発明を通じて改変することができる代表的植物には、たとえば、アラビドプシス、ヒマワリ、ワタ、ナタネ（キャノーラを含む）、トウモロコシ、コムギ、トウゴマ、ヤシ、タバコ、ピーナッツ、モロコシ、サトウキビ、およびダイズが挙げられる。

【0101】

本発明のmNSは、単独で、他の化合物と組み合わせて、または他の化合物（たとえば、薬物）と連動させて使用して、本明細書で取り上げた疾病または状態（たとえば、癌および他の増殖状態、ウイルス感染、炎症性疾患、自己免疫、肺疾患、腎疾患、眼疾患、等）を治療してよい。たとえば、特定の疾患または状態を治療するために、mNS分子を対象に投与してもよいし、単独で、または治療に適した条件下で1つまたは複数の薬物と組み合わせて、当業者にとって明白な他の適切な細胞に投与してもよい。

10

【0102】

追加の実施形態では、mNS分子は、上記の状態または疾患を治療するために、他の既知の治療法と組み合わせて使用してよい。たとえば、記載された分子は、疾患または状態を治療するために、1つまたは複数の既知の治療薬と組み合わせて使うことができるであろう。本発明のmNS分子と容易に組み合わせられる他の治療薬の非限定的例には、酵素的核酸分子、アロステリック核酸分子、アンチセンス、デコイ、またはアプタマー核酸分子、（モノクローナル抗体などの）抗体、小分子、ならびに金属、塩、およびイオンを含む他の有機および/または無機化合物である。

20

【0103】

本発明の誘導体を予測する/評価するのに使用するためのコンピュータモデリング技術には、ジェネティクスコーポレイショングループ（Genetics Corporation Group）、マディソン、ウィスコンシン州から入手可能なMFold version 3.1が挙げられるが、これに限定されるものではない（Zuckerら、Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guideを参照）。In RNA Biochemistry and Biotechnology、11~43頁、J. BarciszewskiおよびB. F. C. Clark編、NATO ASI Series、Kluwer Academic Publishers、Dordrecht、NL、（1999年）；Zuckerら、Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure、J. Mol. Biol.、288、911~940頁（1999年）；Zuckerら、RNA Secondary Structure Prediction. In Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry S. Beaucage、D. E. Bergstrom、G. D. Glick、およびR. A. Jones編、John Wiley & Sons、New York、11.2.1~11.2.10、（2000年）を参照、COVE（RNA structure analysis using covariance models（stochastic context free grammar methods））v. 2.4.2（EddyおよびDurbin、Nucl. Acids Res. 1994年、22：2079~2088頁）、これはソースコードとして無料で配布されており、<http://www.genetics.wustl.edu/eddy/software/>にアクセスすることによりダウンロードすることができ、FOLDALIGNも無料で配布されており、<http://www.bioinf.auckland.ac.nz/FOLDALIGN/>でのダウンロードで入手可能である（Finding the most significant common sequence and structure motifs in a set of RNA sequences、J

30

40

50

. Gorodkin, L. J. Heyer および G. D. Stormo, *Nucleic Acids Research*, 25 巻、18 号、3724 ~ 3732 頁、1997 年 ; Finding Common Sequence and Structure Motifs in a set of RNA Sequences, J. Gorodkin, L. J. Heyer, および G. D. Stormo, *ISMB* 5 ; 120 ~ 123 頁、1997 年を参照)。

【0104】

本発明は以下の実施例によりさらに説明されるが、これは例証のために提供するものであって、いかなる形でも本発明を限定することを目的とするものではない。

【実施例 1】

【0105】

プラスミド構築

pPHAS - Fab1 - HP : ヘアピン RNAi を用いて KASII のレベルを減少させた (本明細書では「Fab1」としても知られ、多くの場合そう呼ばれる)。センス、アンチセンス、およびイントロンフラグメントを、PacI - XhoI フラグメントとしてバイナリーベクター pDsRed - PHAS にクローン化する前にプラスミドベクター pGEM - T - Easy (Promega 社製) に集合させた。At1g74960 のエクソン 1 の 5' UTR 由来の 178 bp フラグメント (FAB1) (KASII または KASIII 酵素をコードする他のいかなるアラビドプシス配列とは相同ではない) を、オリゴヌクレオチド TTAATTAAACGCATCGAAGCTCTCTGCACGC (配列番号 1) および GCTAGCGGCTTTTGAGAGAAACCCAG (配列番号 2) を使用してアラビドプシスゲノム DNA から増幅し、続いて、前記挿入物の NheI 部位が pGEM - T - Easy の PstI 部位に隣接して pGEM - T - Easy - HTM1 を作製するように、pGEM - T - Easy (Promega 社製) にクローン化した。

【0106】

次に、FAD2 の第 1 イントロンを、このフラグメントが 17 bp のエクソン 1 と 4 bp のエクソン 2 を含有していて確実に 5' と 3' スプライス部位が含まれるように、オリゴヌクレオチド GCTAGCGTTCAGCTCCATCTCCAGGTCC (配列番号 3) および GCTAGCGTTTCTGCAGAAACCCAAAGC (配列番号 4) を使用して増幅した。次に、このフラグメントを pGEM - T - Easy - HTM1 の PstI / NheI 部位にクローン化して、pGEM - T - Easy - HTM2 を作製した。Fab1 ヘアピンのための逆方向反復を完成させるために、最初の 178 bp 5' UTR フラグメントを、プライマー CTGCAGAAACCCGGGCATCGAAGCTCTCTGCACGC (配列番号 5) および GAGCTCCTCGAGGGCTTTTGAGAGAAACCCAG (配列番号 6) を使用して増幅し、pGEM - T - Easy - HTM2 の SacI / PstI 部位にクローン化して、pGEM - T - Easy - HTM3 を得た。こうして得られた Fab1 ヘアピン配列を pGEM - T - Easy - HTM3 から切り取り、PacI / XhoI フラグメントとして pDs - red - PHAS に挿入し、pPHAS - FAB1 - HP を作製した (図 1)。

【0107】

pPHAS - Fab1 - HPAS : Fab1 遺伝子の 107 bp 第 1 エクソンを、プライマー KasII - 5' エクソン - BglII (GGGAGATCTGGCGCGCCGGCTATCTCCTCCACCGTGA (配列番号 7) および KasII - 3' エクソン - SpeI (GGGACTAGTTCTTCTTCTTTTATGCCATGG (配列番号 8)) を使用して DNA ゲノムから増幅した。図 1 に示すように、前記フラグメントは、pGEM - T - Easy - HTM3 中の SpeI - BglII の Fad2 - イントロンの一部で取り換え、次に FAB1 ヘアピン、イントロンおよび Fab1 アンチセンスを含有するカセットを pPHAS - Fab1 - HP の全ヘアピン - イントロンで取り換えた。

【0108】

pPHAS - Fab1 - AS : 上の FAB1 遺伝子の 178 5' UTR を、プライマ

10

20

30

40

50

－K a s I I - 5 U T R - N h e I / X h o I (G G C T C G A G C T A G C C G C A T C G A A G C T C T C T G C A C G C (配列番号 9)) および K a s I I - 3 U T R - P a c I (G G T T A A T T A A G G C T T T G A G A A G A A C C C A G (配列番号 10)) を使用して増幅した。図 1 に示すように、フラグメントは、P a c I - X h o I で p P H A S - F a b 1 - H P 中の全 F a b 1 ヘアピン - イントロンで取り換えた。

【 0 1 0 9 】

p P H A S - F a d 2 - H P : 図 2 に示すように、F a d 2 非コード配列の 1 1 8 b p の 5 ' U T R センスとアンチセンスを、ゲノム DNA から増幅し、p P H A S - F a b 1 - H P 中の K a s I I の 5 ' U T R センスとアンチセンスで取り換えた。

【 0 1 1 0 】

p P H A S - F a d 2 - H P A S : 1 1 5 2 b p の F a d 2 遺伝子を、プライマー F A D 2 - 5 ' S p h I (C G C A T G C A T G G G T G C A G G T G G A A G A A T (配列番号 11)) および F A D 2 - 3 ' S p e I (C C A C T A G T T C A T A A C T T A T T G T T G T A C C A (配列番号 12)) で増幅し、図 2 に示すように、前記フラグメントは S p e I - S p h I で F a d 2 イントロンの一部でアンチセンス方向に取り換えた。

【 0 1 1 1 】

p P H A S - F a d 2 - A S : F a d 2 遺伝子を、プライマー F A D 2 - 5 ' X h o I (C C C T C G A G A T G G G T G C A G G T G G A A G A A T (配列番号 13)) および F A D 2 - 3 ' P a c I (C C T T A A T T A A T C A T A A C T T A T T G T T G T A C C A (配列番号 14)) で増幅させ、次に、図 3 に示すように、アンチセンス方向として P a c I - X h o I で p P H A S - F a d 2 - H P 中の F a d 2 - H P カセットで取り換えた。

【 0 1 1 2 】

p P H A S - F a d 3 - H P : F a d 3 遺伝子の 1 3 8 b p の 3 ' U T R センスとアンチセンスをゲノム DNA から増幅した。図 3 に示すように、前記フラグメントは p P H A S - F a b 1 - H P 中の F a b 1 の 5 ' U T R センスとアンチセンスで取り換えた。

【 0 1 1 3 】

p P H A S - F a d 3 - H P A S : F a d 3 遺伝子の 3 0 1 b p 第 1 エクソンを、プライマー F a d 3 - アンチ - 5 ' B g l I I (G G A G A T C T G G C G C G C C C G T G G C C G A G A A C A A A G A T G (配列番号 15)) および F a d 3 - アンチ - 3 ' S p e I (G G G A C T A G T G T T G T T G C T A T G G A C C A A C G C (配列番号 16)) で増幅し、次に、図 3 に示すように、アンチセンス方向に B g l I I - S p e I で F a d 2 - イントロンの一部で取り換えた。

【 0 1 1 4 】

p P H A S - F a d 3 - A S : F a d 3 遺伝子の 3 0 1 b p 第 1 エクソンを、DNA ゲノムから、プライマー F a d 3 - アンチ - 5 ' P a c I (G G G T T A A T T A A C G T G G C C G A G A A C A A A G A T G (配列番号 17)) および F a d 3 - アンチ - 3 ' X h o I (C C C T C G A G A G T T G T T G C T A T G G A C C A A C G C (配列番号 18)) を使用して増幅した。図 3 に示すように、前記フラグメントは P a c I - X h o I で F a d 3 - H P カセットで取り換えた。

【 実施例 2 】

【 0 1 1 5 】

アラビドプシス栽培および形質転換

アラビドプシスは、20℃、明期 16 / 8 時間 (明 / 暗) で約 250 μ E の光下で栽培した。ベクターは、エレクトロポレーションによりアグロバクテリウムツメファシエンス系統 G V 3 101 p M P 90 に導入し、これを使用してフローラルディップ法 (floral dip method) によりシロイヌナズナ植物体を形質転換した (B e c h t o l d , N . , E l l i s , J . , および P e l l e t i e r , G . (1993 年) C . R . A c a d . S c i . P a r i s 316、1194 ~ 1198 頁) 。形質転換は、最初の開花の約 5 日後に実施した。

10

20

30

40

50

【実施例 3】

【0116】

アラビドプシスの種子中の脂肪酸含有量の決定

脂肪酸分析：種子はメチル化し（1 ml の 1 N HCl、メタノール（Supelco 社製）、80 で 1 時間）、ヘキサンで抽出し、トリメチルシリル化した（100 μ l の BSTFA-TMCS（ビス（トリメチルシリル）トリフルオロアセトアミドトリメチルシラン）（Supelco 社製）、90 で 45 分間）。BSTFA-TMCS は蒸発により取り除き、試料はヘキサンに再懸濁した。試料は、5973 質量選択検出器（GC/MS）および SP-2340 シアノキャピラリーカラム（Supelco 社製）（60 m \times 250 μ m \times 0.25 μ m）が装備された Hewlett-Packard 6890 ガスクロマトグラフで分析した。注入器は 225 に保たれ、オープン温度は変化させた（15 / 分の割合で 100 ~ 240 に続き 240 で 5 分間）、ヘリウム流量は 1.1 ml / 分であった。ピーク同一性の割り当ては、溶出時間対真正基準に基づいて実施し、その質量スペクトルに基づいて確認した。定量化は Hewlett-Packard ケムステーションソフトウェアを使用して実施した。

10

【実施例 4】

【0117】

アラビドプシスにおける脂肪酸合成の調節

イントロンにおける遺伝子の遺伝子抑制の 3 種類の方法（アンチセンス、ヘアピン RNA i、およびアンチセンス付きヘアピン RNA i）を比較した。理論に縛られることは望まないが、ヘアピン RNA i とアンチセンス配列を含有する mRNA のほうが、図 4 に描くモデルなどのモデルによる遺伝子サイレンシングでは強力である可能性がある。図 4 のモデルでは、イントロンをスプライスして siRNA を作製すると、遺伝子のアンチセンス部分を含む DNA フラグメントが作り出され、したがって、生成されるダイサー基質である RNA i に加えて、遺伝子発現を減少させる追加の潜在的な方法を提供する。

20

【0118】

- ケトアシル - ACP シンターゼ（KAS）II だけではなく、遺伝子抑制の 3 種類の方法の比較のために 3 種類の遺伝子が選択された（容易に点数化できるという理由で、12 - デサチュラーゼ FAD2 および 15 - デサチュラーゼ FAD3、ならびに遺伝子発現の減少の評価のために以前使用されていたという理由で、FAD2）。アラビドプシスにおけるこれらの酵素と脂肪酸合成の関係は図 5 に描かれている。

30

【0119】

油料種子作物の脂肪酸含有量の改変のための標的組織であることに加えて、種子は、実施例 1 において作製された構築物を使用して実施された形質転換の結果を再現性よく分析するための信頼できる材料の供給源を提供する。したがって、形質転換された植物由来の種子の脂肪酸含有量を、ガスクロマトグラフィーおよび質量分光測定分析により分析し、特定の脂肪酸としてのピークの割り当てを定性的に確認した。スチューデント t - 検定を使用して、平均値間の差を意味づけた（平均値あたり 10 以上の試料に基づいて）。実施例 1 で作製した構築物についての結果は、下の実施例 5 ~ 8 に示している。

40

【実施例 5】

【0120】

FAB1 発現の調節

FAB1 はプラスチド内で 16 C 原子（C16）を 18 C 原子（C18）脂肪酸に伸長している。FAB1 では、16 : 0 プラス 16 : 1 脂肪酸（FAB1 の基質）のレベルを、その産物 18 : 0 と 18 : 1 プラス代謝物 18 : 2 と 18 : 3 のレベルと比較した。野生型アラビドプシスは、fab1 fae1 突然変異体系統と、および FAB1ヘアピン（Fab1-HP）または組み合わせたヘアピンとアンチセンスを含む FAB1（fab1-HPAS）のいずれかで形質転換した fab1 fae1 突然変異体系統と比較した。その結果は図 6 に示しており、図 7 にグラフを使用してまとめている。fab1 fae1 系統は、20 C レベルまでの追加の伸長を妨げる fae1 突然変異により、C18 脂

50

脂肪酸の著しい増加を示した。fab1-HPのfab1 fae1突然変異体背景への導入により、C18脂肪酸は74.2%から53.4%に減少し、fab1-HPAS構築物の導入により41.6% C18脂肪酸まで減少した。

【実施例6】

【0121】

FAD2発現の調節

FAD2では、18:1脂肪酸(FAD2の基質)のレベルは、その産物18:2と代謝物18:3のレベルと比較した。分析のために、18:2を18:3と合わせて、FAD2により不飽和化されていた全脂肪酸の割合を評価した。野生型アラビドプシスは、FAD2-アンチセンス(Fad2-AS)、FAD2ヘアピンRNAi(Fad2-HP)と比較し、FAD2は、組み合わせたヘアピンとアンチセンス(Fad2-HPAS)と比較した。これらのそれぞれは、もっとも過酷なFAD2突然変異体、すなわちFAD2-2(Fad2-MT)と比較した。その結果は、図8および図9に示しており、図10には図を使用してまとめている。

【0122】

18:2 + 18:3のWTレベルは43%であり、これはFad2-ASでは18.9%に低下し、Fad2-HP系統では9.4%に低下した。両変化は、 $P < 0.01$ レベルでは有意であった。Fad2-HP系統での9.4%からFad2-HPAS系統での7.2%への低下は、 $P < 0.05$ レベルでは有意であった。Fad2-HPAS系統での7.2%は、fad2-MTでのレベルの7.5%とは著しく違ってはいなかった。

【実施例7】

【0123】

GUS発現の導入を使用したFAD2発現の調節

FAD2では、18:1脂肪酸(FAD2の基質)レベルは、その産物18:2と代謝物18:3のレベルと比較した。分析のために、18:2を18:3と合わせて、FAD2により不飽和化されていた全脂肪酸の割合を得た。野生型アラビドプシスは、イントロン中にGUS遺伝子を含むFAD2ヘアピンRNAi(Fad2-HP-GUS)と比較した。その結果は図11および図12に示している。

【0124】

18:2 + 18:3のWTレベルは49%であり、これはFad2-HP-GUSでは12.3%に低下した。その変化は、 $P < 0.01$ レベルでは有意であった。さらに、GUSの青色染色は形質転換された種子では明らかであり、その種子におけるGUSの発現を示していた。

【実施例8】

【0125】

FAD3発現の調節

FAD3では、18:1プラス18:2脂肪酸(18:2はFAD3の基質である)のレベルは、その産物18:3のレベルと比較した。野生型アラビドプシスは、FAD3-アンチセンス(Fad3-AS)と、FAD3ヘアピン(RNAi Fad3-HP)と、および組み合わせたヘアピンとアンチセンスを有するFAD3(Fad3-HPAS)と比較した。その結果は、図13および図14に示しており、図15ではグラフを使用してまとめている。

【0126】

18:3のWTレベルは17.0%であり、Fad3-ASでは10.7%に、Fad3-HP系統では4.5%に、Fad3-HPAS系統では3.0%に低下した。 $P < 0.01$ レベルでは、処置のすべてが他の処置すべてと有意な差があった。3.0%のFad3-HPAS系統では、2.8%でのもっとも強力な突然変異体Fad3対立遺伝子、すなわちFad3-3と有意な差はなかった。

【0127】

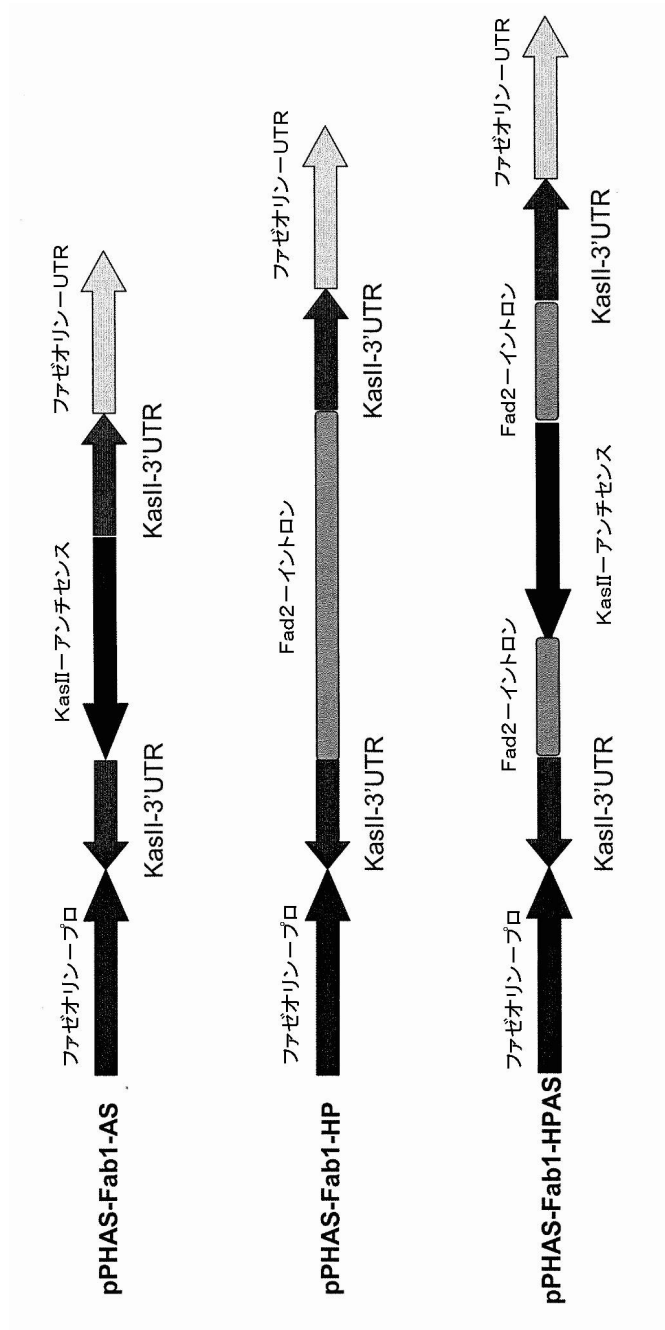
本発明はある種の実施形態で説明してきたが、本発明は本開示の精神と範囲内でさらに

改変することができる。したがって、本出願は、その一般原理を使用して本発明のいかなる変形、使用または適応をも網羅することを意図している。さらに、本出願は、本発明が関連し、添付された特許請求の範囲内にある技術分野における既知のまたは習慣的な慣行内に含まれるような本開示からの逸脱を網羅することを意図している。

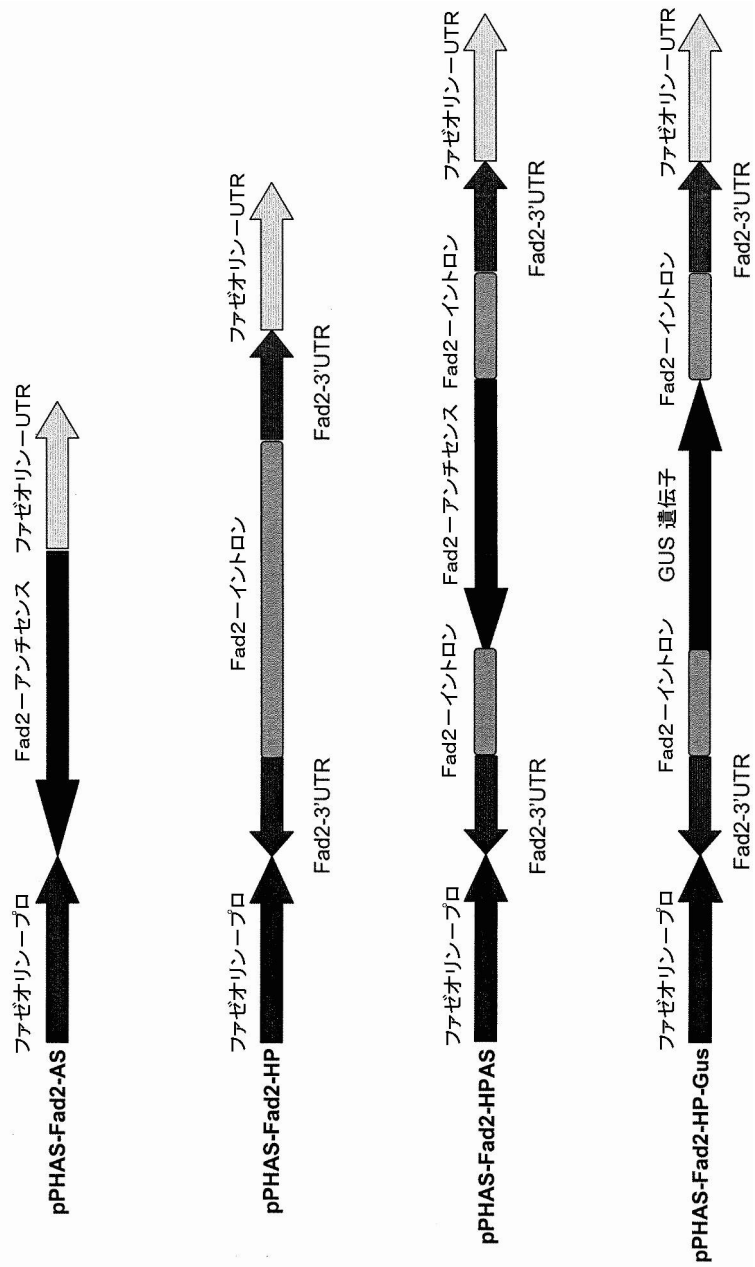
【 0 1 2 8 】

刊行物、特許、特許出願を含む、本明細書に引用したすべての参考文献は、各参考文献が、参照により組み込まれていることを個別に具体的に示されており、その全体が本明細書に記載されている場合と同じ程度にこれによって参照により組み込まれている。本明細書で取り上げた参考文献は、本出願の出願日に先立ってその開示のためだけに提供されている。本明細書においては、本発明者が先行発明によるそのような開示に先行する資格がないことを認めたものとして解釈すべきものは1つもない。

【図 1】

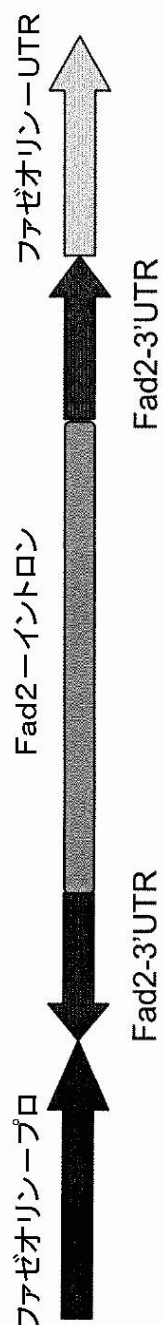


【図 2】

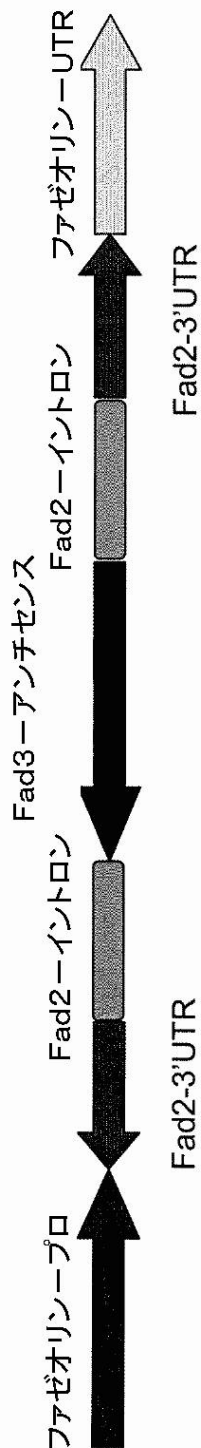




pPHAS-Fad3-AS



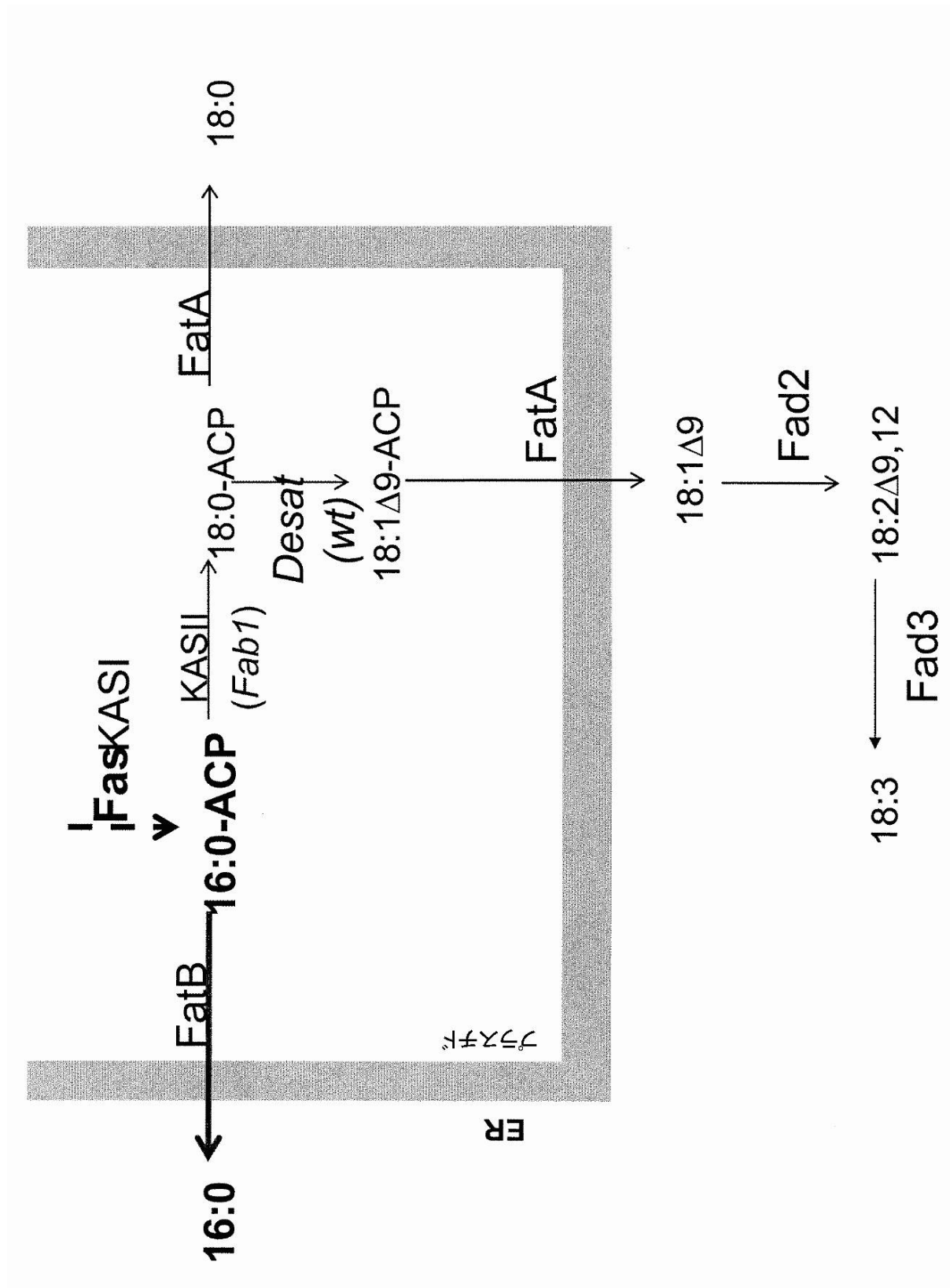
pPHAS-Fad3-HP



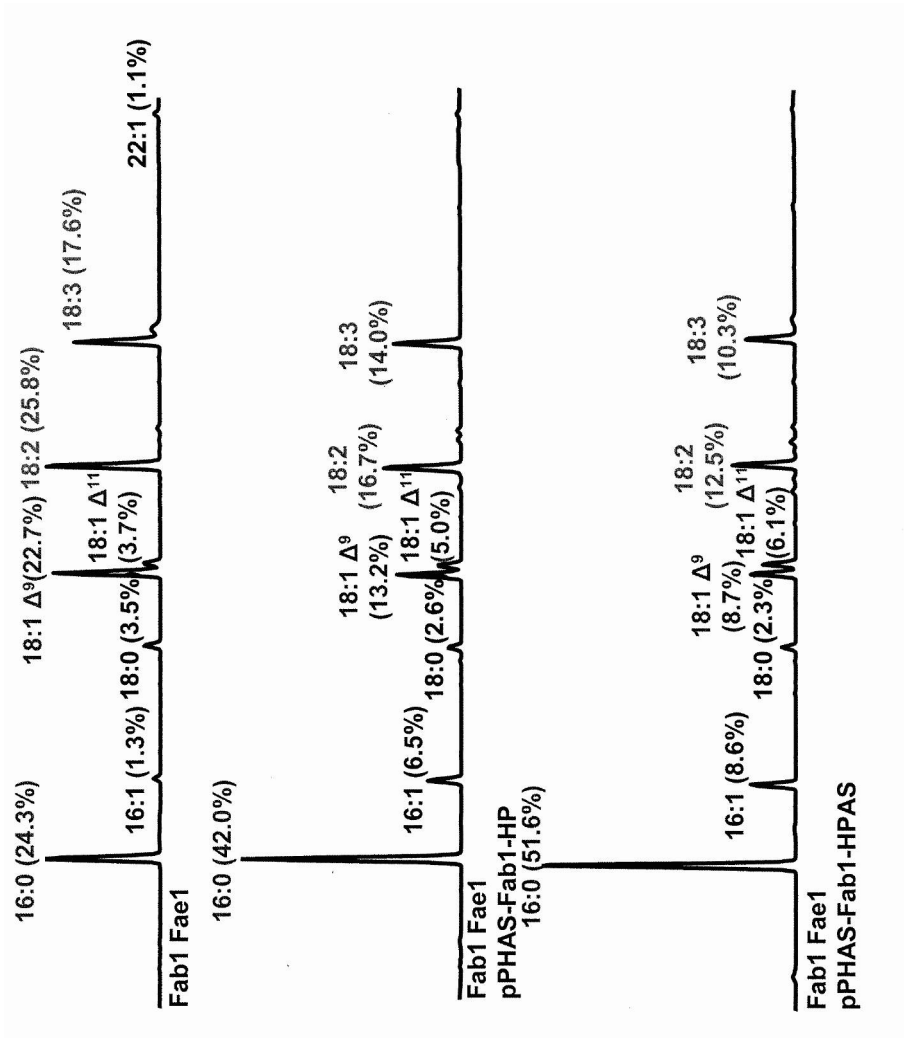
pPHAS-Fad3-HPAS

The diagram illustrates the mechanism of Fab1 mRNA regulation by Fab1 antisense RNA. The process begins with the transcription of Fab1 mRNA, which includes a 3' UTR. Simultaneously, Fab1 antisense RNA is transcribed from a separate promoter. The antisense RNA then hybridizes with the 3' UTR of the Fab1 mRNA, forming a double-stranded complex. This complex is then targeted to the RISC complex, which leads to the degradation of the Fab1 mRNA, resulting in the inhibition of Fab1 expression.

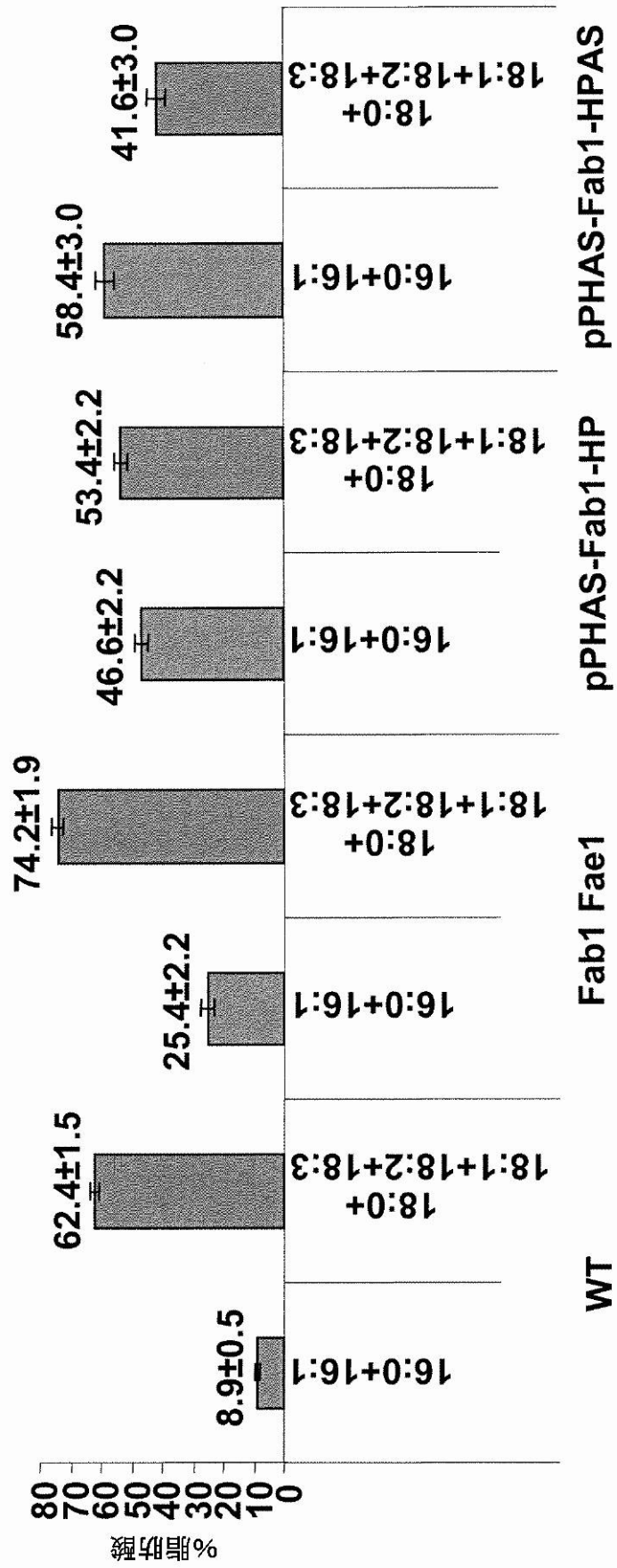
【図5】



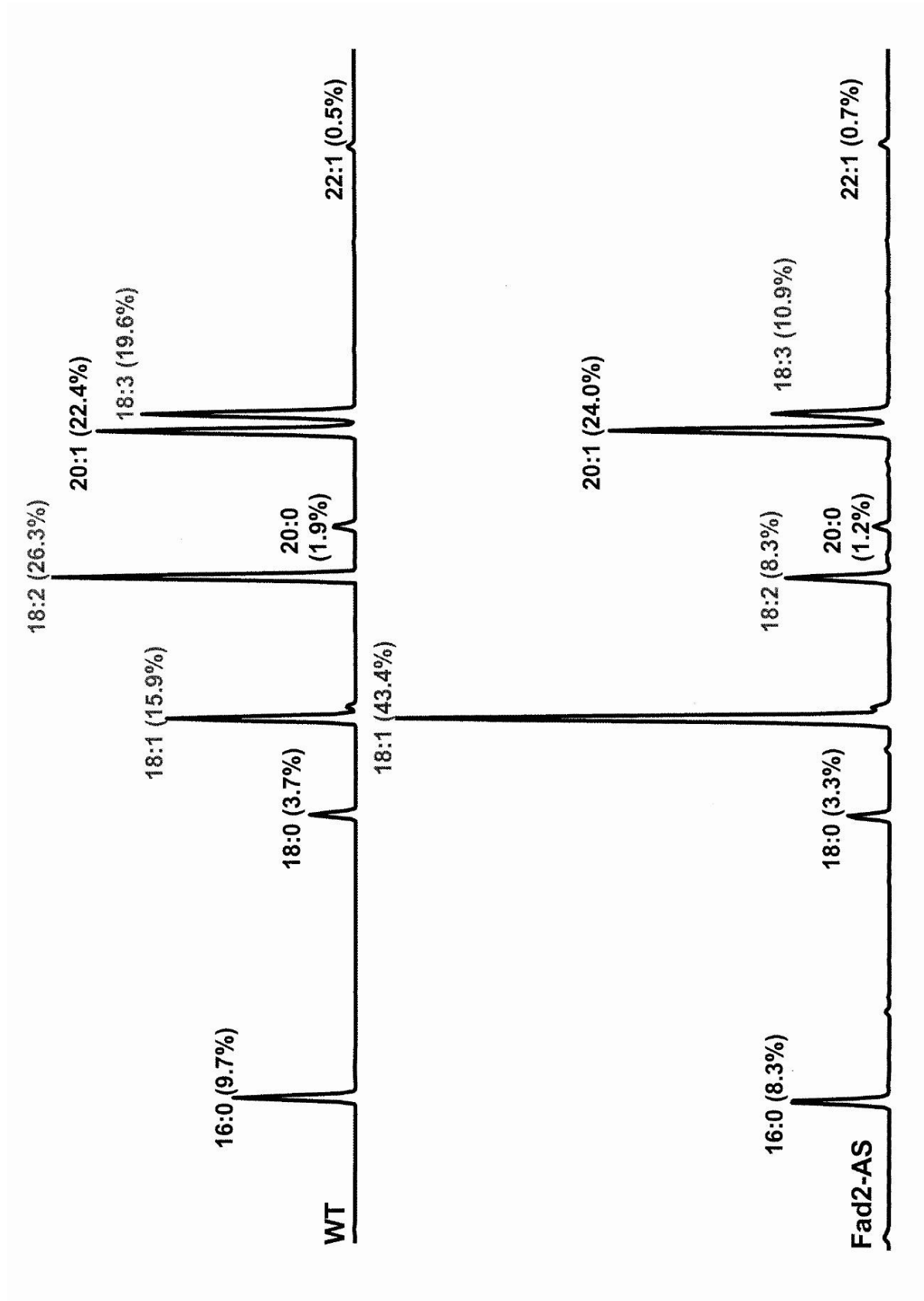
【図 6】



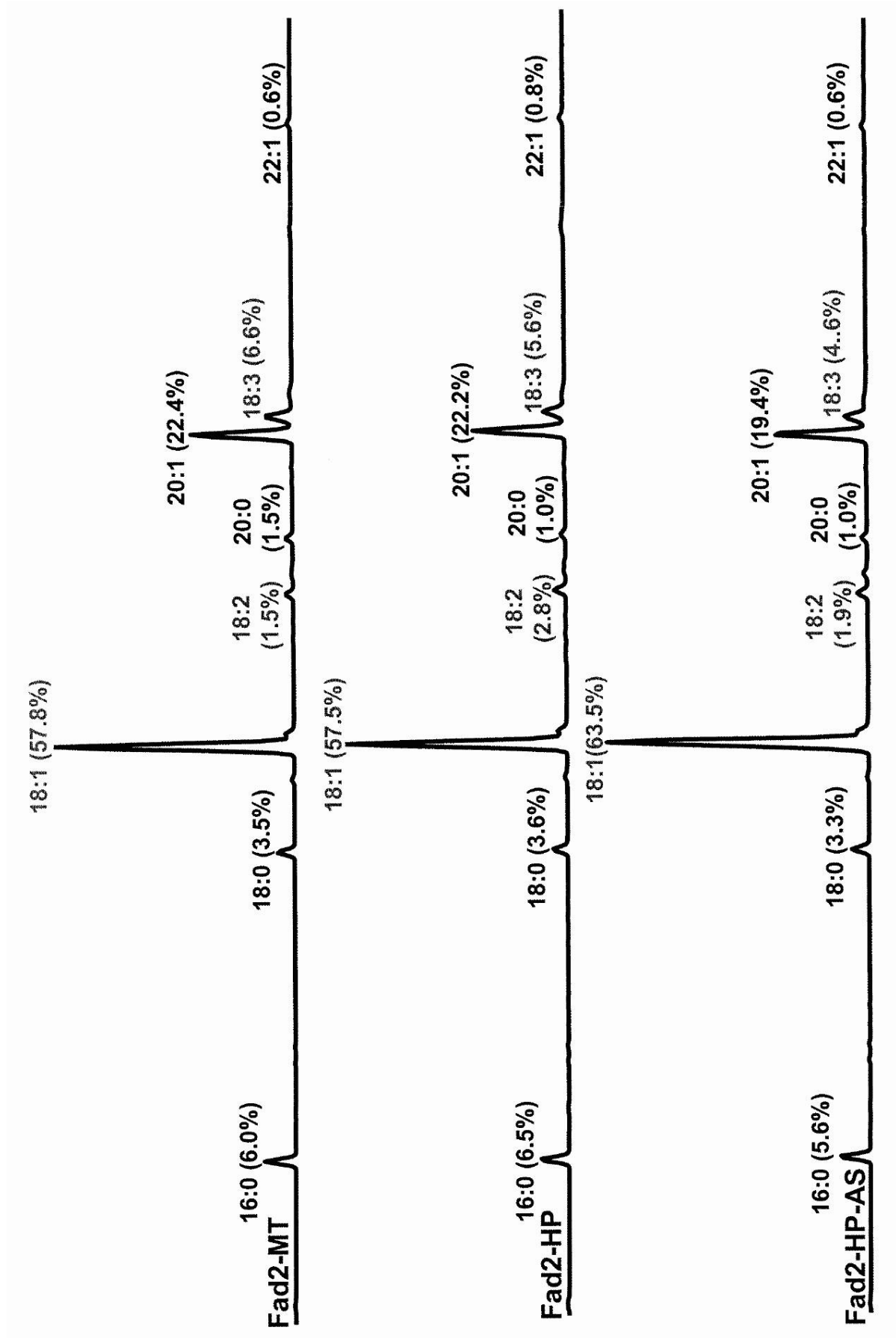
【図 7】



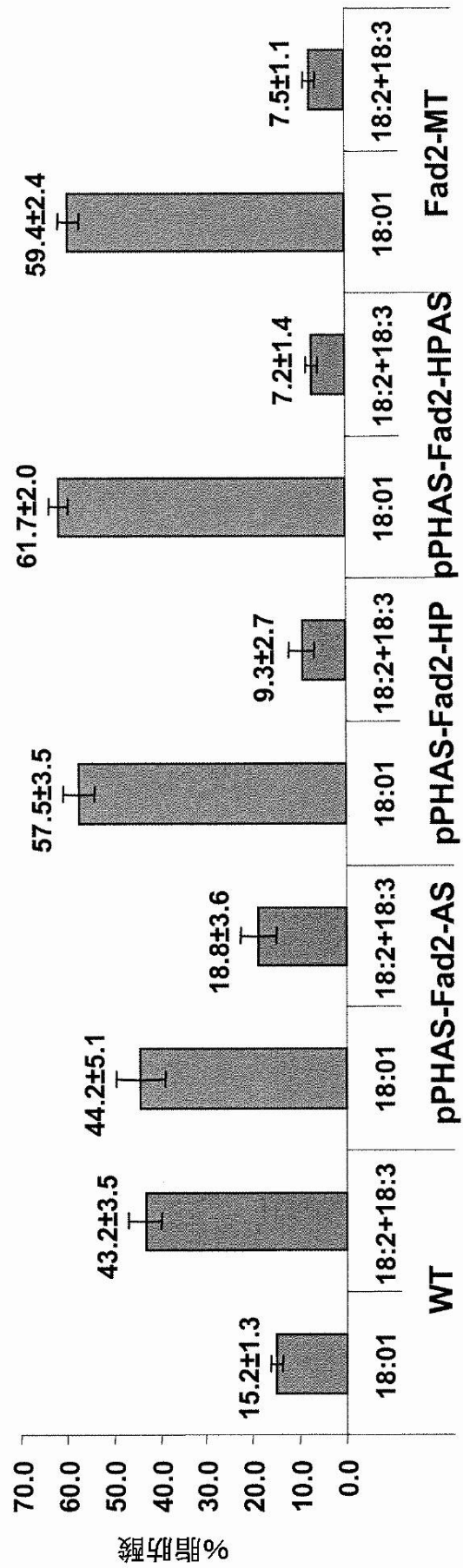
【 図 8 】



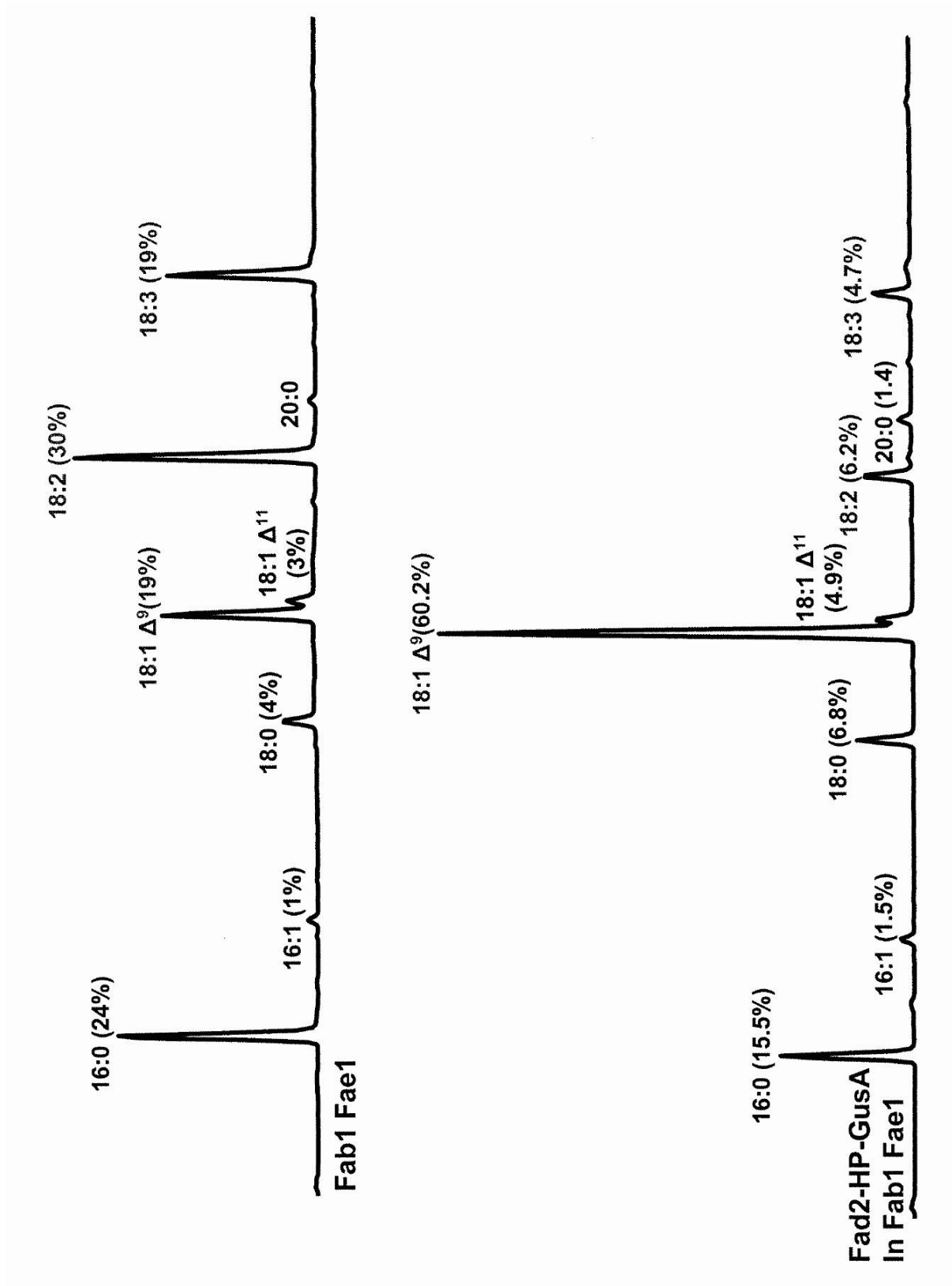
【 図 9 】



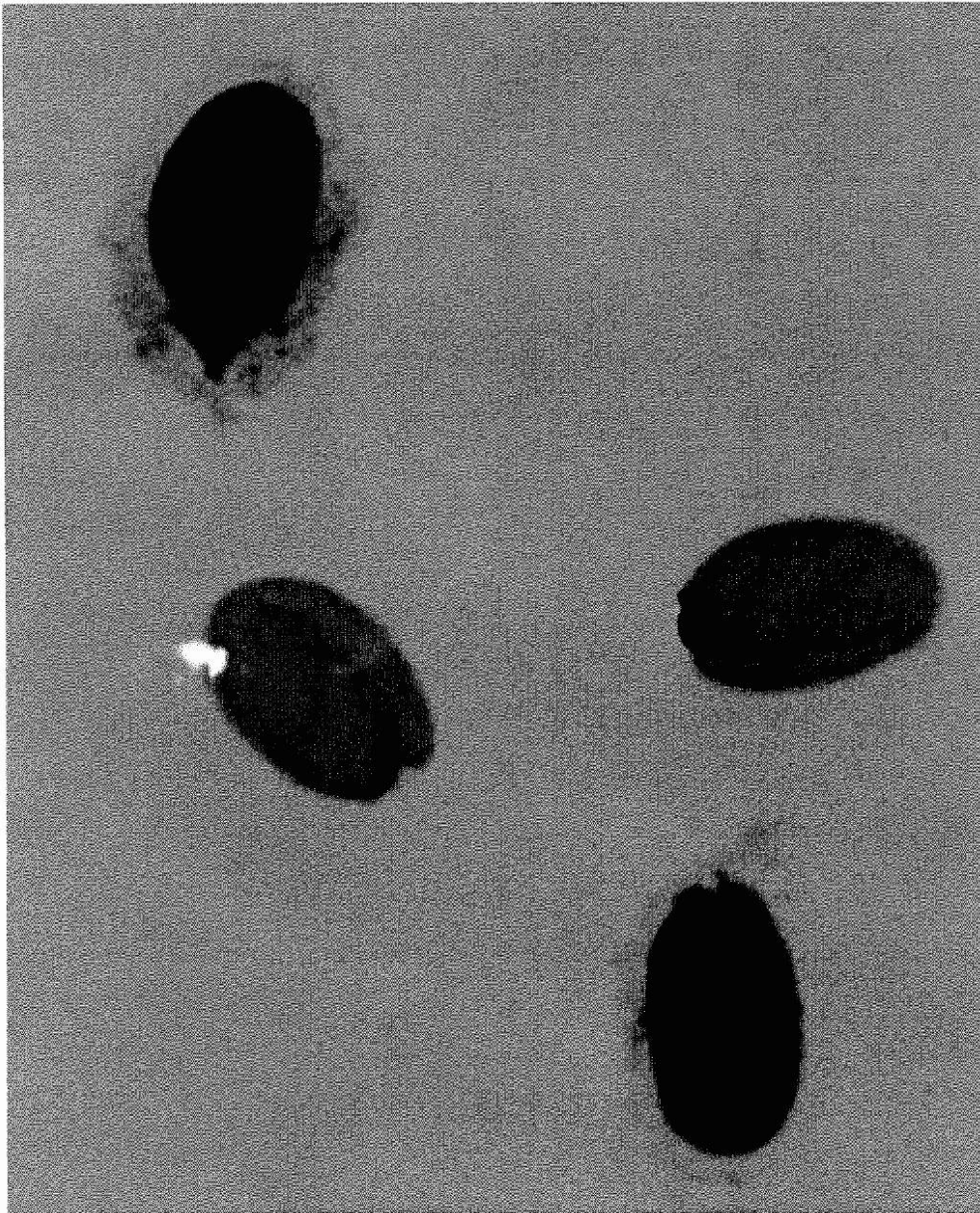
【 図 1 0 】



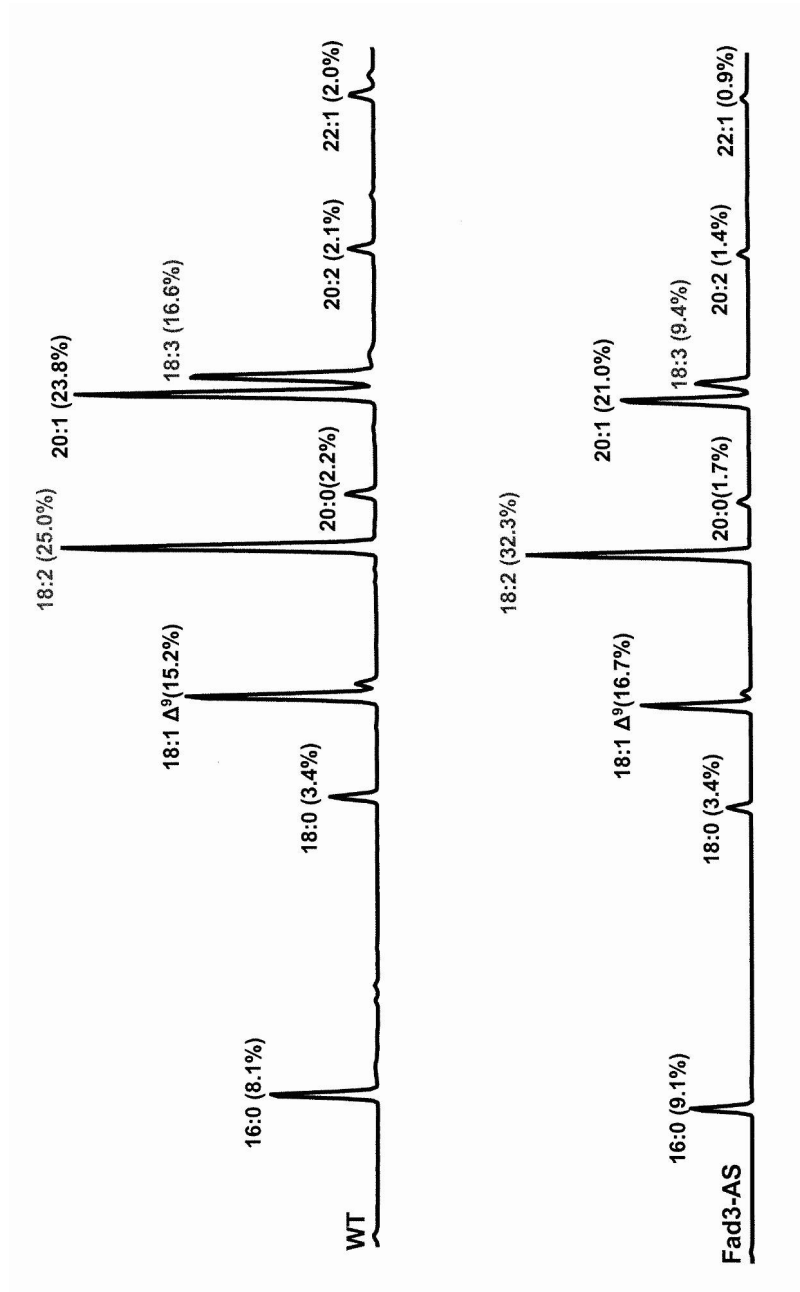
【 図 1 1 】



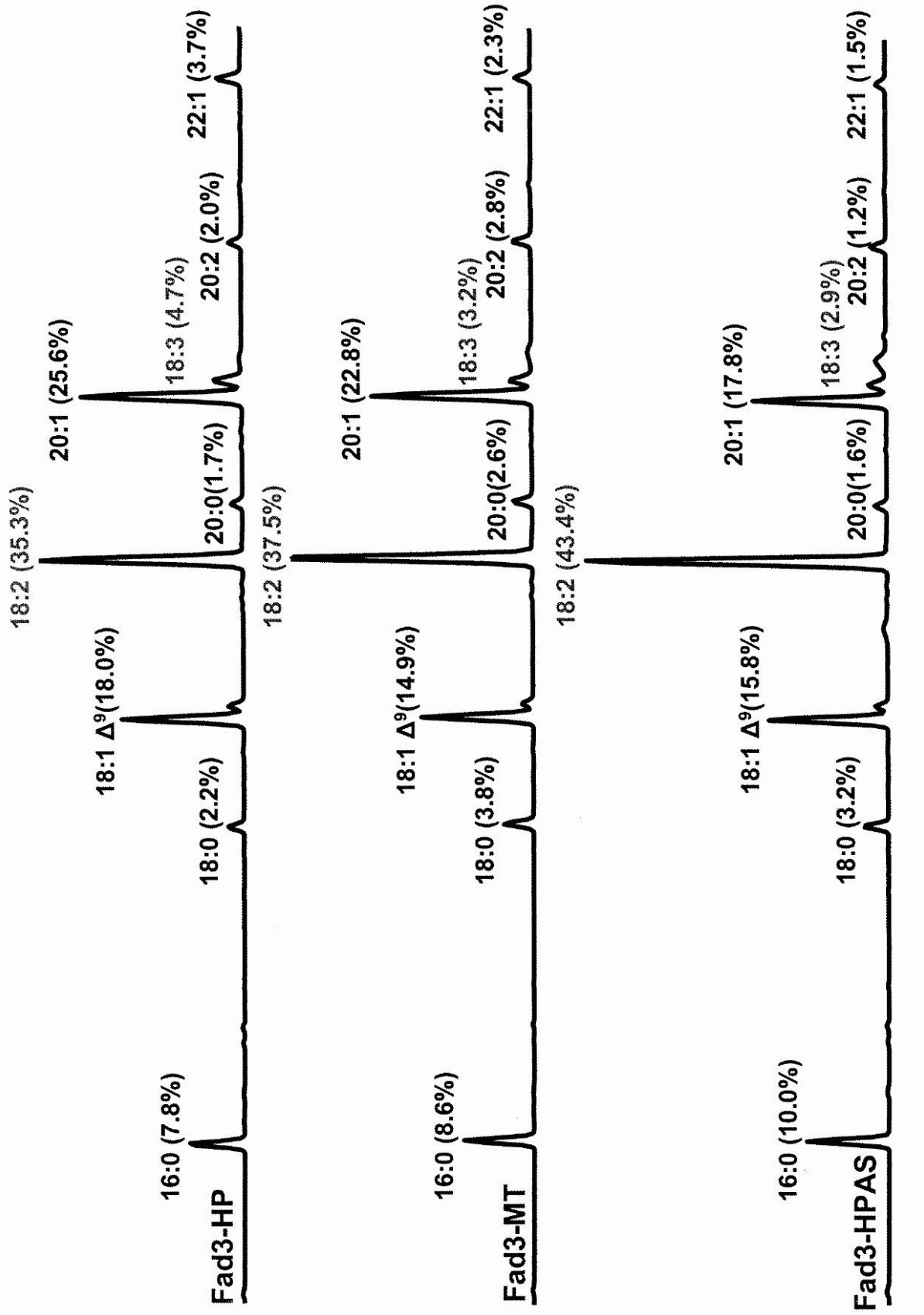
【図 12】



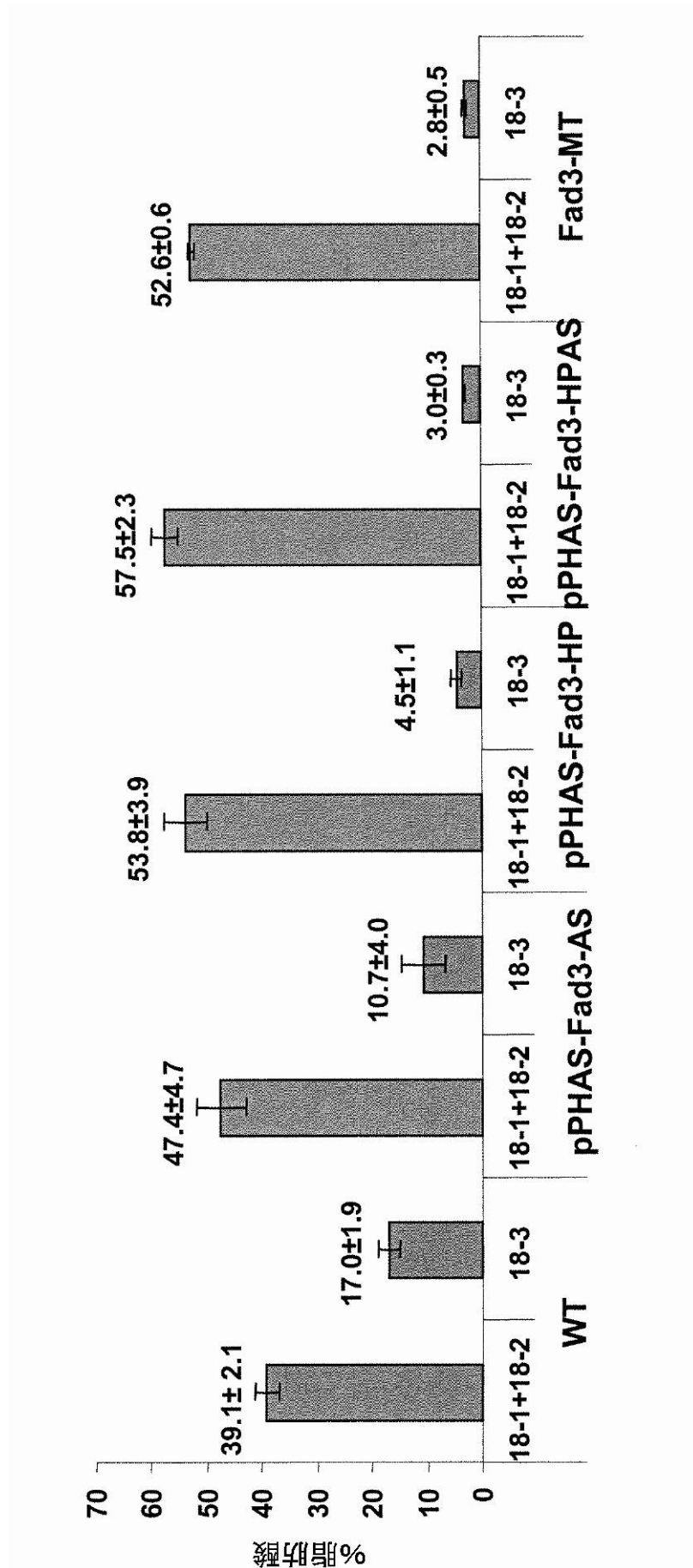
【 図 13 】



【 図 1 4 】



【図 15】



【配列表】

0005759673000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 シャンクリン, ジョン

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 11786, ショアハム, ダッチェス ストリート 4

(72)発明者 ニュエン, タム

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 11973, アップトン, ビーエヌエル, アpartment 30

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 特表2005-519607(JP, A)

特表平06-502758(JP, A)

Hereditas (Beijing), 2007年 1月, Vol.29, No.1, p.97-102

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007年 3月13日, Vol.104, No.11, p.4742-4747

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00 - 15/90

C12P 1/00 - 41/00

CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

JSTPlus(JDreamII)

PubMed