(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2017-528151
(P2017-528151A)
(43)公表日　平成29年9月28日(2017.9.28)

| (51)Int.Cl. | | F I | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| C12N 15/09 | (2006.01) | C12N | 15/00 | A | 4B063 |
| C12Q 1/02 | (2006.01) | C12Q | 1/02 | ZNA | 4B065 |
| C12Q 1/68 | (2006.01) | C12Q | 1/68 | A | |
| C12N 1/15 | (2006.01) | C12N | 1/15 | | |
| C12N 1/19 | (2006.01) | C12N | 1/19 | | |

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 57 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-516424 (P2017-516424)
(86)(22)出願日　平成27年9月28日 (2015.9.28)
(85)翻訳文提出日　平成29年5月23日 (2017.5.23)
(86)国際出願番号　PCT/FR2015/052572
(87)国際公開番号　WO2016/046508
(87)国際公開日　平成28年3月31日 (2016.3.31)
(31)優先権主張番号　1459151
(32)優先日　平成26年9月26日 (2014.9.26)
(33)優先権主張国　フランス(FR)

(71)出願人　595040744
サントル・ナショナル・ドゥ・ラ・ルシェルシュ・シャンティフィク
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
フランス国、７５０１６　パリ、リュ・ミシェル・アンジュ　３
(71)出願人　515121759
ユニベルシテ　ドゥ　モンペリエ
フランス国，３４０９０　モンペリエ，リュ　オーギュスト　ブルソネ　１６３
(74)代理人　100080447
弁理士　太田　恵一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】干渉性分子のスクリーニング方法

(57)【要約】
本発明は、発現または発現された遺伝子配列の活性を増大させる干渉性核酸のスクリーニング方法において、－　翻訳を開始することを目的とする第１の非コード配列と、－　スクリーニングすべき前記干渉性核酸と相補的である第２の配列と、また、場合によっては、－　少なくとも１つの既定のペプチドをコードする第３のヌクレオチド配列と、を含むハイブリッド核酸分子を細胞内に導入するステップを含み、前記第１の配列が修飾され、こうして前記少なくとも１つのペプチドの翻訳レベルが、少なくとも１０％低減されるようになっている、方法に関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
－　遺伝子の発現および／または、
－　遺伝子および／または前記遺伝子の転写リボ核酸の活性、
を増大させる干渉性核酸のスクリーニング方法において、
前記干渉性核酸が、少なくとも部分的に、前記遺伝子または前記ＲＮＡと配列相補性を有する方法であって、
－　翻訳を開始することを目的とする第１の非コード配列と、
－　スクリーニングすべき前記干渉性核酸の配列と少なくとも部分的に相補的である第２の配列と、
－　第１の配列のシス翻訳制御下にあり、少なくとも１つの既定のペプチドをコードする第３のヌクレオチド配列と、
を含むハイブリッド核酸分子を、特にＲＮＡに対する干渉を行なうことのできる真核細胞内に導入するステップを含み、
前記第１の配列が、少なくとも１つのヌクレオチドの置換、欠失または付加により修飾され、こうして前記少なくとも１つのペプチドの翻訳レベルが、特に最適なその未修飾バージョンにおける前記第１の配列の制御下での前記少なくとも１つのペプチドの翻訳レベルに比べて少なくとも１０％低減されるようになっている、方法。
【請求項２】
ハイブリッド核酸分子が、前記第３の配列の上流側に位置づけされた前記第１の配列を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記核酸分子が、場合によって１つのベクター内に含まれる特に２本鎖のデオキシリボ核酸分子、または特に１本鎖のリボ核酸分子である、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
前記第１の配列が、その未修飾バージョンにおいて下記配列、

5’- ssmRccA(T/U)GG -3’ ( 配列番号 1)

により表わされるコザック配列であり、ここでＲはプリン、ｓはＧまたはＣ、ｍはＡ／ＵまたはＣを表わしている、請求項１から３のいずれか１つに記載の方法。
【請求項５】
前記第１の配列が、その修飾バージョンにおいて配列番号４または配列番号５の配列の１つを含む、またはそれにより構成されるコザック配列である、請求項１、２または３のいずれか１つに記載の方法。
【請求項６】
前記第２の配列が、前記干渉性核酸の配列と少なくとも部分的に相補的である１８～１００００個のヌクレオチドを含む、請求項１から５のいずれか１つに記載の方法。
【請求項７】
－　翻訳を開始することを目的とする第１の非コード配列と、
－　少なくとも１つの干渉性核酸と少なくとも部分的に相補的である第２の配列と、
－　第１の配列のシス翻訳制御下にあり、少なくとも１つの既定のペプチドをコードする第３のヌクレオチド配列と、
を含むハイブリッド核酸分子において、
前記第１の配列が、少なくとも１つのヌクレオチドの置換、欠失または付加により修飾され、こうして前記少なくとも１つのペプチドの翻訳レベルが、特に最適なその未修飾バージョンにおける前記第１の配列の制御下での前記少なくとも１つのペプチドの翻訳レベルに比べて少なくとも１０％低減されるようになっている、ハイブリッド核酸分子。
【請求項８】
前記核酸分子が、配列番号１１６、配列番号１１７、配列番号１１８、配列番号１１９

、配列番号１２０、配列番号１２１、配列番号１２２、配列番号１２３、配列番号１２４、配列番号１２５、配列番号１２６、配列番号１２７および配列番号１２８の配列の分子の中から選択される、請求項７に記載のハイブリッド核酸分子。
【請求項９】
請求項７または請求項８に記載の少なくとも１つのハイブリッド核酸分子を含む真核細胞。
【請求項１０】
－　請求項７または請求項８に記載の少なくとも１つの核酸分子と、
－　少なくとも１つの真核細胞および／または前記ハイブリッド核酸分子による真核細胞の形質転換手段と、
を含むキット。
【請求項１１】
－　請求項１に記載の、翻訳を開始することを目的とする第１の非コード配列と、
－　請求項１に記載の、第１の配列のシス翻訳制御下にあり、少なくとも１つの既定のペプチドをコードする第３のヌクレオチド配列と、
－　干渉性核酸と相補的な配列を有する核酸分子の挿入を可能にする、制限酵素による少なくとも１つの切断部位と、
を含む中間ハイブリッド核酸分子において、
前記第１の配列が、少なくとも１つのヌクレオチドの置換、欠失または付加により修飾され、こうして前記少なくとも１つのペプチドの翻訳レベルが、特に最適なその未修飾バージョンにおける前記第１の配列の制御下での前記少なくとも１つのペプチドの翻訳レベルに比べて少なくとも１０％低減されるようになっている、中間ハイブリッド核酸分子。
【請求項１２】
遺伝子の発現および／または遺伝子および／または前記遺伝子の転写リボ核酸の活性を増大させる干渉性核酸のスクリーニングのための、請求項７または請求項８、または請求項１１に記載の少なくとも１つの核酸分子の使用。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、干渉性分子のスクリーニング方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）として公知の現象は、低分子リボ核酸がメセンジャーＲＮＡと相互作用できるという事実に基づく。多くの酵素によって制御される複雑な機序が、メセンジャーＲＮＡの分解を導き、こうして前記メセンジャーＲＮＡをコードする遺伝子の発現を阻害し、ひいてはそれに由来するタンパク質の発現を阻害する。
【０００３】
低分子干渉性ＲＮＡの中では、ＲＮＡの複数の種、特にマイクロＲＮＡ、ヘヤピンＲＮＡが識別されており、これらは、遺伝子、ひいてはそれに由来するタンパク質の発現を類似の機序によって阻害する能力を有する。
【０００４】
現在、ＲＮＡ干渉による阻害が探求されている目的遺伝子の各々について試験すること、企図されている遺伝子の各々について各干渉性ＲＮＡを個別に試験することが極めて広く当然のこととして認められている。このような方法は、企図された各々の干渉性ＲＮＡが標的遺伝子の発現に対しその阻害効果を充分に及ぼすことを確認することが必要であるため、時間および費用のかかるものである。その上、適切な阻害効果を及ぼすものとみなされる干渉性ＲＮＡの各々が、さらに当初標的とされたもの以外の１つ以上の遺伝子の発現も同様に遮断することによる「寄生的」阻害効果を及ぼさないことを確認する必要がある。

【０００５】
米国特許第８２５２５３５号明細書は、公知の干渉性ＲＮＡの配列と相補的な標的にすべき配列を含む人工的配列の使用について記載している。この方法は、その上、異なる標的遺伝子をコードするＲＮＡを同時に阻害することを可能にする。しかしながら、このような方法はなお不完全なものであり、特に天然標的に特異的な干渉性ＲＮＡを効果的にスクリーニングすることができない。
【０００６】
さらに、遺伝子の発現にプラスの効果を有する核酸分子の技術的現状も知られている。
【０００７】
例えば、Ｖｏｕｔｉｌａら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ、２０１２－０８－０１は、細胞多分化能に関与する遺伝子を活性化するために使用されるｓｉＲＮＡについて記載している。国際公開第２００６／１１３２４６Ａ２号は、特にプロモータ領域に固定されて遺伝子の発現を活性化するｓＲＮＡについて記載している。しかしながら、これらの分子は、調節配列を標的化する効果を有するが、遺伝子のコード配列を特異的に標的化するものではない。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００８】
【特許文献１】米国特許第８２５２５３５号明細書
【特許文献２】国際公開第２００６／１１３２４６Ａ２号
【非特許文献】
【０００９】
【非特許文献１】Ｖｏｕｔｉｌａら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａ　ｐｙ、２０１２－０８－０１
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１０】
したがって、本発明は、これらの欠点を改善することを目的とする。
本発明の１つの目的は、より感度の高い干渉性分子スクリーニング方法を提供することにある。
【００１１】
本発明のもう１つの目的は、技術的現状から公知であるものよりも感度が高い、干渉性分子のスクリーニング方法を実施できるようにするハイブリッド核酸に関する。
【００１２】
本発明のさらにもう１つの目的は、上述の方法を容易かつ効果的に実施できるようにする手段を提供することにある。
【課題を解決するための手段】
【００１３】
したがって本発明は、
－　遺伝子の発現および／または、
－　遺伝子および／または前記遺伝子の転写リボ核酸つまりＲＮＡの活性、
を増大させる干渉性核酸の特にインビトロでのスクリーニング方法において、
前記干渉性核酸が、少なくとも部分的に、前記遺伝子または前記ＲＮＡと配列相補性を有する方法であって、
－　翻訳を開始することを目的とする第１の非コード配列と、
－　スクリーニングすべき前記干渉性核酸の配列と少なくとも部分的に相補的である第２の配列と、
－　第１の配列のシス翻訳制御下にあり、少なくとも１つの既定のペプチドをコードする第３のヌクレオチド配列と、
を含むハイブリッド核酸分子を、特にＲＮＡに対する干渉を行なうことのできる真核細胞

内に導入するステップを含み、
前記第１の配列が、特に少なくとも１つのヌクレオチドの置換または欠失または付加により修飾され、こうして前記少なくとも１つのペプチドの翻訳レベルが、特に最適なその未修飾バージョンにおける前記第１の配列の制御下での前記少なくとも１つのペプチドの翻訳レベルに比べて少なくとも１０％低減されるようになっている、方法に関する。
【００１４】
本発明は、修飾された翻訳開始配列（非最適）を有する核酸分子を用いて選択された場合に、遺伝子の発現を増大させることのできる干渉性分子をスクリーニングすることが可能であるということを意外にも当該発明者らが確認したことに基づいている。
【００１５】
したがって当該発明者らは、技術的現状において広く説明され認められてきたものとは相反する特性、すなわちＲＮＡ干渉機序の公知の発現阻害特性を有する干渉性ＲＮＡを初めて識別した。
【００１６】
本発明においては、野生の真核生物に認めることのできるような前記配列（すなわち前記翻訳開始配列レベルで突然変異を有していないもの）とは異なる非天然の第１の翻訳開始配列を含む核酸分子を入手することが最も重要である。
【００１７】
本発明において、翻訳開始配列なる用語は、遺伝子内およびそれに由来するメセンジャーＲＮＡ内に存在し、開始コドンＡＴＧを取り囲む核酸配列を意味する。この配列は、より一般的にはコザック配列と呼ばれる。
【００１８】
本発明において、「最適」なる用語は、所与の細胞型においてかつ所与の培養条件下で決定される、１つの遺伝子を操作する最大限の翻訳レベルを意味する。最適翻訳レベルは、メチオニンイニシエータ転移ＲＮＡによって移入された第１のアミノ酸の負荷が行なわれる前記翻訳開始部位に依存下でのＲＮＡによるタンパク質の最大産生レベルである。細胞は、天然の生理学的状態では所与のＲＮＡについてその最適レベルより多くのタンパク質を産生する能力がないものとして理解される。
【００１９】
本発明において、「遺伝子発現を増大させる」なる文言は、修飾無しで得られるタンパク質の量よりも多い前記遺伝子によりコードされたタンパク質の量を得る結果をもたらす全ての修飾を意味する。同様に、本発明に係る干渉性核酸の存在下では、（前記干渉性核酸により標的化される）遺伝子のタンパク質産物は、前記遺伝子を標的化する干渉性核酸の不在下または別の遺伝子を標的化する干渉性核酸の存在下での同じ遺伝子のタンパク質産物よりも豊富なものとなるであろう。「遺伝子発現を増大させる」なる用語のこの定義は、当業者が従来より用いている定義である。
【００２０】
同様に、たとえタンパク質のこの増大が関与する分子機序が転写後の機序（ＲＮＡの安定化、転写の増大）であるとしても、やはりそれは遺伝子発現の増大である。
【００２１】
本発明において、「遺伝子および／または前記遺伝子の転写リボ核酸つまりＲＮＡの活性の増大」は、上述の通り、遺伝子の発現の増大、すなわち前記遺伝子によりコードされるタンパク質産物の増大を導く機序の１つに対応する。
【００２２】
本発明において、干渉性分子なる用語は、ＲＮＡ干渉により遺伝子発現を調節する能力を有する核酸分子を意味する。したがって、本発明によって網羅される干渉性分子の一例は、低分子干渉性ＲＮＡ（Ｓｍａｌｌ　ｉｎｔｅｒｆｅｒｉｎｇ　ＲＮＡを略してｓｉＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（「ｍｉｃｒｏ　ＲＮＡ」を略してｍｉＲＮＡ）、または低分子ヘヤピンＲＮＡ（「ｓｈｏｒｔ　ｈａｉｒｐｉｎ　ＲＮＡ」を略してｓｈＲＮＡ）である。

【００２３】
ｓｉＲＮＡは、２１～２４個のヌクレオチドの２本鎖低分子ＲＮＡである。２本鎖状態の低分子干渉性ＲＮＡは、ＲＩＳＣ（ＲＮＡ ｉｎｄｕｃｅ ｓｉｌｅｎｃｉｎｇ ｃｏｍｐｌｅｘの略）複合体と命名されたタンパク質複合体により細胞の細胞質内で認識される。この複合体は、ＲＮＡの相補鎖またはセンス鎖を放出することによって活性化される。この活性化された複合体は、その標的転写物、メセンジャーＲＮＡを核酸塩基の相補性により認識する。この認識系が、この機序の高い特異性を保証する。ひとたび標的が結合されると、ＲＩＳＣ複合体の一部を成すアルゴノート（Ａｒｇｏｎａｕｔｅ）タンパク質は、認識部位のレベルで転写物を切断できる。したがって、Ａｇｏは、エンドヌクレアーゼとして作用し得る。Ａｇｏにより分割された転写物の２片は、エキソヌクレアーゼによりその末端を介して急速に分解される。
【００２４】
ｍｉＲＮＡは、２本鎖構造を基本対合によって形成する能力を有する１本鎖ＲＮＡである。ＲＩＳＣの形成中に、２本鎖ｍｉＲＮＡは１本鎖ｍｉＲＮＡへと移行する。ｍｉＲＮＡの標的メセンジャーＲＮＡの特異的鎖のみが、複合体の内部に保存される。このとき、標的ｍＲＮＡは、ＲＩＳＣ複合体の内部に負荷される。この場合、複合体がタンパク質Ａｇｏ２を含む場合の標的ｍＲＮＡの分解か、または複合体がタンパク質Ａｇｏ１を含むのこの標的ｍＲＮＡの翻訳抑制という２つの阻害方法が考えられる。
【００２５】
ｓｈＲＮＡは、ＲＮＡによる干渉現象に関与し得るロッドおよびループ構造を採用するＲＮＡである。ＲＩＳＣ複合体による取込みの後、センス鎖は分解される。アンチセンス鎖は、ＲＩＳＣ複合体を、相補的配列を有するｍＲＮＡへと導く。このとき、分解機序は、ｓｉＲＮＡにより操作されるものと類似である。
【００２６】
本発明の枠内では、或る種の干渉性分子が遺伝子の発現を増大させる能力の機序は、まだ解明されていない。しかしながら、当該発明者らは、本発明に係る方法を用いて、技術的現状においてメセンジャーＲＮＡの翻訳を阻害するかまたはメセンジャーＲＮＡを不安定化するものとして一般的にみなされている一部の分子が、実際には、前記メセンジャーＲＮＡの発現または安定性を増大させる能力を有することを示した。
【００２７】
本発明において、「少なくとも部分的に前記遺伝子または前記ＲＮＡとの配列相補性を有する前記干渉性核酸」なる文言は、スクリーニングすべき干渉性核酸が、一方では、一遺伝子またはそれがコードするメセンジャーＲＮＡの配列と少なくとも部分的に相補的となるように予め選択され、スクリーニングが特異的なものとなるようにされていることを意味する。その上、当業者であれば、干渉性核酸が、標的化される遺伝子のものよりもヌクレオチド数で小さいサイズを有するかぎりにおいて、これらの干渉性核酸が標的化する遺伝子の配列と完全に相補的とはなり得ないことを理解するであろう。
【００２８】
本発明において、ハイブリッド核酸分子なる用語は、自然界では隣接していない少なくとも２つの核酸フラグメントで構成されたハイブリッド核酸分子を意味する。したがって、このハイブリッド分子は、天然には存在しない。
【００２９】
上述の通りの前記ハイブリッド核酸分子は、少なくとも以下の３つの配列を含む：
－　翻訳を開始することを目的とする第１の非コード配列、またはより一般的には翻訳開始配列と呼ばれる配列。この配列は修飾されている、すなわち、一般的集団において見られる同じ配列との関係において異なる少なくとも１つのヌクレオチドを有する。
－　１つまたは複数の干渉性核酸の標的配列に対応する、スクリーニングすべき前記干渉性核酸の配列と少なくとも部分的に相補的である第２の配列、および、
－　免疫原性ラベルまたはタグ、さらには酵素活性を有する機能タンパク質または発光または蛍光特性を有するタンパク質に対応し得る少なくとも１つの既定のペプチドをコード

する第３のヌクレオチド配列。

【００３０】

本発明においては、第２の配列が第３の配列内に含まれていることが可能である。このことはすなわち、前記少なくとも１つの既定のペプチドをコードする第３の配列が、スクリーニングすべき前記干渉性核酸と少なくとも部分的に相補的であるその配列の一部分を含んでいることを意味する。このことは、一方では、第２の配列が第３の配列の一部分に対応し、２つとも既定のペプチドの一部分をコードしていること、また他方では、既定のペプチドが「ハイブリッド」であること、すなわちそれが、外因性配列（第２の配列）が中に導入されている１つの配列によってコードされていることを意味することができる。この第２の場合において、既定のペプチドは、天然には前記既定のペプチドの配列内に含まれていないその核酸配列の一部分を含む。

【００３１】

本発明においては、第２および第３の配列が同一であることも同様に可能である。既定のペプチドをコードする配列が同様に全面的に、スクリーニングすべき干渉性核酸と部分相補性または完全相補性を有する場合がそれである。特に、ＦＬＡＧラベルをコードする配列の場合がそれである。ラベルの発現を増大させる干渉性分子が探求されている場合、ＦＬＡＧラベルをコードする核酸配列は第１の配列の下流側に置かれ、このときハイブリッド核酸分子は３つの配列（実際には２つの配列しか表わさない）で構成され、第２および第３の配列は完全に一体になっているかまたは同一である。ハイブリッド核酸分子においては、第１の配列による第３の配列の機能的制御が存在し、この制御はシスで実施され、このことは、２つの配列が
同じ分子によって担持される場合に制御が行なわれるということを意味している。

【００３２】

ハイブリッド分子の第１の配列は、前記少なくとも１つのペプチドの翻訳が、特に最適なその未修飾バージョンにおける前記第１の配列の制御下での前記少なくとも１つのペプチドの翻訳レベルに比べて少なくとも１０％低減されるような形で修飾される。換言すると、干渉性核酸の不在下では、修飾された第１の配列を有していないハイブリッド核酸分子を含む真核細胞は、前記修飾された第１の配列を有するハイブリッド核酸分子を含む同じ真核細胞に比べて少なくとも１０％多い（第３の配列によりコードされている）既定のペプチドを発現する。

【００３３】

ハイブリッド核酸分子とスクリーニングすべき干渉性核酸との間の相互作用を可能にするためには、干渉性核酸の配列およびハイブリッド核酸分子の第２の配列が、当業者にとって周知である塩基Ａ－Ｔ／Ａ－ＵおよびＧ－Ｃの相補性に応じて、少なくとも部分的に相補的である必要がある。

【００３４】

本発明において、「少なくとも部分的に相補的」なる文言は、スクリーニングすべき干渉性核酸を構成する大部分のヌクレオチドが、ハイブリッド核酸分子の第２の配列を定義するヌクレオチドと相補的であることを意味する。詳細には、スクリーニングすべき干渉性核酸のヌクレオチドおよびハイブリッド核酸分子の第２の配列を構成するヌクレオチドが、９０％超、有利には９５％超、特に９９％超、詳細には１００％の相補性を示すこと、または換言すると、２つの分子が、１０％未満、５％未満、特に１％未満、詳細には０％のミスマッチを有することが有利である。干渉性核酸分子の第２の配列が、約２０個のヌクレオチドで構成されている場合、相補性が完全であることが極めて有利である。

【００３５】

本発明は、実際には、翻訳開始配列の修飾が、マーカーとして役立つ既定のペプチドのより小さい発現を可能にし、したがって干渉性核酸の効能が試験される場合に発現変動、特に発現増大をより正確に視覚化することを可能にする。

【００３６】

本発明に係る方法は、有利には、以下のステップを含む：

－　ハイブリッド核酸分子のトランスフェクションという技術的現状で周知の技術によりＲＮＡ干渉を実現することのできる真核細胞の形質転換で構成される第１のステップ。これは特に電気穿孔法、リン酸カルシウムでの形質転換、リポフェクション、ウイルス感染さらにはヌクレオフェクションである得る。真核細胞の形質転換のこれらの例が、例示目的で提供されるが、本発明の範囲を限定することはできない。

【００３７】

一時的または安定した形でひとたび形質転換されると、上述の細胞は、干渉性核酸のスクリーニングのためにいつでも利用可能な状態となる。つねに形質転換された同じ細胞を単なる細胞培養により使用できるように、安定した形で形質転換された細胞（すなわち前記ハイブリッド核酸分子をそのゲノム内に組込んだ細胞）を入手することが有利であり得る。

【００３８】

－　第２のステップでは、先のステップで形質転換された１つまたは複数の細胞は、前記スクリーニングすべき干渉性核酸を前記細胞内に導入するために、当業者にとって周知の従来の手段によってもう一度形質転換される。

【００３９】

－　一方ではハイブリッド核酸分子およびスクリーニングすべき干渉性核酸の集団でこのように形質転換された細胞は、当業者が自らのＲＮＡ干渉についての一般的知識を用いて、利用される細胞のタイプに応じて容易に決定することのできる既定の時間の間、ＲＮＡ干渉プロセスを実施できるようにするため、第３のステップにおいて培養される。

【００４０】

－　前記既定の時間が終了すると、細胞は、このとき第４のステップにおいて、前記ハイブリッド核酸分子によりコードされた前記既定のペプチドの発現率、すなわち存在、不在または数量を測定するために分析される。既定のペプチドのこの存在、不在または数量は、前記ハイブリッド核酸分子で形質転換されたもののスクリーニングすべき干渉性核酸を用いては形質転換されていない、またはハイブリッド核酸分子内に標的（すなわち相補的配列）を有していない干渉性核酸でトランスフェクトされた前記細胞により発現される、前記同じ既定のペプチドの数量と比較して評価される。

【００４１】

干渉性核酸で形質転換された細胞内の既定のペプチドの数量が、どの干渉性核酸でも形質転換されなかった細胞またはハイブリッド核酸分子内に標的（すなわち相補的配列）を有していない干渉性核酸でトランスフェクトされた細胞内のペプチドの数量以下であるまたは１０％未満しかそれを上回っていない場合、前記干渉性核酸は考慮されないであろう。反対に、干渉性核酸で形質転換された細胞内の既定のペプチドの数量が、どの干渉性核酸でも形質転換されなかった細胞またはハイブリッド核酸分子内に標的（すなわち相補的な配列）を有していない干渉性核酸でトランスフェクトされた細胞内のペプチドの数量を少なくとも１０％上回っている場合には、前記干渉性核酸は、それが標的化する遺伝子の発現または活性の活性化効果を及ぼすことから考慮されるであろう。

【００４２】

少なくとも１０％の発現レベル差を測定するためには、化学発光または蛍光による検出を用いて発出された光放射を定量的に検出することのできる従来の免疫検出技術を使用することが可能である。

【００４３】

例えば、ウエスタンブロット技術により目的ペプチドの免疫マーキングを実施し、化学発光によりその数量を測定することができる。同様にして、ペプチドに対して導かれた抗体が、蛍光マーカーに結合される場合、適切な波長での励起の後に発出された蛍光放射を測定することによりその数量を測定することが可能である。

【００４４】

ペプチド自体が、自家蛍光特性を備えている場合には、特にフローサイトメトリにより、生きた細胞から直接その数量を測定することが可能である。

【００４５】
ハイブリッド核酸分子が、蛍光分子またはＦＲＥＴ間のエネルギー伝達を実施することのできる少なくとも２つのペプチドを、第３の配列を介しコードすることが同様に有利であり得る。第３の配列が、ＦＲＥＴを実施できる少なくとも２つのペプチドをコードする特殊な場合においては、発現されたペプチドの数量、ひいては干渉性核酸の効果を、エネルギー伝達の結果である蛍光発出を測定することによって、干渉性核酸により形質転換されたまたはされていないハイブリッド核酸分子で形質転換された生きた細胞上で直接測定することができる。
【００４６】
要約すると、本発明に係る方法は、
－　遺伝子の発現および／または、
－　遺伝子および／または前記遺伝子の転写リボ核酸の活性、
を増大させる干渉性核酸のスクリーニング方法において、
前記干渉性核酸が、少なくとも部分的に、前記遺伝子または前記ＲＮＡと配列相補性を有する方法であって、
１－　翻訳を開始することを目的とする第１の非コード配列と、
－　スクリーニングすべき前記干渉性核酸の配列と少なくとも部分的に相補的である第２の配列と、
－　第１の配列のシス翻訳制御下にあり、少なくとも１つの既定のペプチドをコードする第３のヌクレオチド配列と、
を含むハイブリッド核酸分子を、特にＲＮＡに対する干渉を行なうことのできる真核細胞内に導入するステップであって、
前記第１の配列が、少なくとも１つのヌクレオチドの置換、欠失または付加により修飾され、こうして前記少なくとも１つのペプチドの翻訳レベルが、特に最適なその未修飾バージョンにおける前記第１の配列の制御下での前記少なくとも１つのペプチドの翻訳レベルに比べて少なくとも１０％低減されるようになっているステップと、
２－　干渉性核酸を先行するステップで得た真核細胞内に導入するステップと、
３－　前記少なくとも１つのペプチドの発現を測定するステップと、
を含む方法、である。
【００４７】
この方法により、前記少なくとも１つのペプチドの発現レベルが、ステップ１で得られた、ただし、いかなる干渉性核酸でも、または前記ハイブリッド核酸分子の第２の配列といかなる配列相補性も有していない干渉性核酸でも形質転換されていない真核細胞により発現された前記ペプチドの発現レベルよりも１０％上回っている場合、１０％超のこの発現増大を可能にした干渉性核酸は、本発明に係る目的干渉性核酸である、との結論を下すことが可能になる。
【００４８】
逆の場合、試験された干渉性核酸は、標的化された遺伝子の発現または活性の増大特性を有していないことから保存されない。
【００４９】
ここで、本発明において、ハイブリッド核酸分子は、リボ核酸（ＲＮＡ）、または１本鎖または２本鎖のデオキシリボ核酸（１本鎖ＤＮＡまたは２本鎖ＤＮＡ）である点に留意されたい。有利には、ハイブリッド核酸分子は、デオキシリボ核酸分子である。
【００５０】
有利には、本発明は、前記第１の配列が、リボソーム内部進入部位つまりＩＲＥＳ、またはＲＮＡキャップ（５’ＣＡＰ）の下流側の翻訳開始コザック配列である、上述の方法に関する。
【００５１】
翻訳の開始は、コザック配列の存在によって発生する。しかしながら、翻訳開始を可能にするためには、リボソームおよび翻訳装置全体がメセンジャーＲＮＡ上に「負荷されて

」いる必要がある。このような「負荷」は、ＲＮＡキャップ（５’ＣＡＰ）を用いてかまたはリボソーム進入内部配列つまりＩＲＥＳを用いて操作される。これらの配列（５’ＣＡＰ／ＩＲＥＳ）は、同様に、それらが負荷されているメセンジャーＲＮＡを安定化させ、さらにはメセンジャーＲＮＡをそれらの翻訳部位に向かって移出する能力をも有している。

【００５２】

ＲＮＡキャップ（５’ＣＡＰ）は、真核細胞内でメセンジャーＲＮＡの５’末端に見出される修飾されたヌクレオチドである。これは、核内に局在化した複数の酵素の連続的作用によって導入される転写後修飾である。キャップは、トリホスフェート５－５’結合により転写されたメセンジャーＲＮＡの第１のヌクレオチドに連結されたＮ７位でメチル化されたグアノシンで構成される。

【００５３】

ＩＲＥＳは、キャップの存在および走査機序とは無関係に、開始コドンレベルでリボソームを直接動員することを可能にする。ＩＲＥＳは、リボソームまたは翻訳開始因子と直接相互作用するｍＲＮＡの構造化された領域である。

【００５４】

有利な一実施形態において、本発明は、核酸分子が前記第３の配列の上流側または５’位に位置づけされた前記第１の配列を含んでいる、以上で定義された方法に関する。

【００５５】

第３の配列のシス調節をコーディネートするためには、ハイブリッド核酸分子の第１の配列が、既定のペプチドをコードする第３の配列の上流側に位置づけされることが有利である。こうして、第１および第３の配列は、直接結合されるか隣接することができるが、同様に、第２の配列または他のあらゆる配列のいずれであろうと、別の配列により分離されていることも可能である。

【００５６】

別の有利な実施形態によると、本発明は、前記第２の配列が、

－　前記第１の配列の５’位、または

－　前記第１の配列の３’位および前記第３の配列の５’位、または、

－　前記第３の配列の３’位、

に位置づけされるか、または

－　前記第３の配列内に含まれている、

上述の方法に関する。

【００５７】

ハイブリッド核酸分子の配列の異なるシークエンシングの可能性が図１によって例示されている。

【００５８】

別の有利な実施形態においては、本発明は、前記核酸分子が、場合によって１つのベクター内に含まれる特に２本鎖のデオキシリボ核酸分子、または特に１本鎖のリボ核酸分子である、以上で記載された通りの方法に関する。

【００５９】

先に言及した通り、ハイブリッド核酸分子は真核細胞内に導入される。このハイブリッド核酸分子は、前記真核細胞内に以下のような異なる形態で導入することができる：

－　前記第３の配列によりコードされた前記少なくとも１つのペプチドを翻訳するため、真核細胞の翻訳装置により取込まれる、１本鎖のリボ核酸またはＲＮＡの形態、

－　その後真核細胞の細胞機構によってＲＮＡに転写され次に翻訳されなければならない、特に２本鎖のデオキシリボ核酸すなわちＤＮＡの形態。この場合、ハイブリッド核酸分子が上述の３つの配列の他に、ＲＮＡの転写を可能にする配列を含むことが重要であろう。

－　前記ハイブリッド核酸配列を含むＤＮＡベクターの形態。このベクターは、ハイブリッド核酸分子の転写を可能にする手段、特にプロモータおよび付随的には転写を増大する

配列（エンハンサー）を含む。このとき、ベクターは、自律的に複製できるように真核生物またはウイルスの複製起点を含み得る円形ベクター、または真核細胞内へのその組込みを刺激するように線形ベクターであり得る。その上、前記ベクターが、例えば非限定的に、

・　ピューロマイシン、ネオマイシン／Ｇ１４８、ブラスチシジンさらにはゼオシンなどの一定の抗生物質に対する耐性を可能にするペプチドをコードする配列、
・　緑色蛍光タンパク質などの自家蛍光タンパク質のコード配列、または
・　例えばチミジン・キナーゼなどの、発現する細胞上で負の選択を行なうタンパク質をコードする配列、

など、前記ベクターを自らのゲノム内に組込んだ細胞を選択できるようにするタンパク質をコードする１つ以上の配列を含むことが有利である。

【００６０】

さらに一層有利には、本発明は、前記第１の配列が、その未修飾バージョンにおいて下記配列、

5’- ssmRccA(T/U)GG -3’（配列番号１）

により表わされるコザック配列であり、ここでＲはプリン、ｓはＧまたはＣ、ｍはＡ／ＵまたはＣを表わしている上述の方法に関する。

【００６１】

ここで問題となっているのは、少なくとも１つのヌクレオチドの削除、または欠失または挿入によって修飾されなければならないハイブリッド核酸分子の第１の配列に対応するこの配列番号１の配列である。

【００６２】

さらに別の実施形態において、本発明は、

－　ハイブリッド核酸分子が特に２本鎖のデオキシリボ核酸分子である場合、その未修飾バージョンにおける前記第１の配列は、

5’- ssmRccATGG -3’ ( 配列番号 2),

という配列によって表わされるか、あるいは、

－　ハイブリッド核酸分子が特に１本鎖リボ核酸分子である場合、その未修飾バージョンにおける前記第１の配列は、

5’- ssmRccAUGG -3’ ( 配列番号 3).

という配列によって表わされる、
以上で定義された方法に関する。

【００６３】

同様に、配列番号２の配列は、以下の異なる配列を網羅する：

5'-GGCGCCATGG-3' ( 配列番号 4),
5'-GGCACCATGG-3' ( 配列番号 5),
5'-GGAGCCATGG-3' ( 配列番号 6),
5'-GGAACCATGG-3' ( 配列番号 7),
5'-GCCGCCATGG-3' ( 配列番号 8),
5'-GCCACCATGG-3' ( 配列番号 9),
5'-GCAGCCATGG-3' ( 配列番号 10),
5'-GCAACCATGG-3' ( 配列番号 11),
5'-CGCGCCATGG-3' ( 配列番号 12),
5'-CGCACCATGG-3' ( 配列番号 13),
5'-CGAGCCATGG-3' ( 配列番号 14),
5'-CGAACCATGG-3' ( 配列番号 15),
5'-CCCGCCATGG-3' ( 配列番号 16),
5'-CCCACCATGG-3' ( 配列番号 17),
5'-CCAGCCATGG-3' ( 配列番号 18), および
5'-CCAACCATGG-3' ( 配列番号 19).

【００６４】
同様にして、配列番号３の配列は、以下の異なる配列を網羅する：

5'-GGCGCCAUGG-3' (配列番号 20),
5'-GGCACCAUGG-3' (配列番号 21),
5'-GGAGCCAUGG-3' (配列番号 22),
5'-GGAACCAUGG-3' (配列番号 23),
5'-GCCGCCAUGG-3' (配列番号 24),
5'-GCCACCAUGG-3' (配列番号 25),
5'-GCAGCCAUGG-3' (配列番号 26),
5'-GCAACCAUGG-3' (配列番号 27),
5'-CGCGCCAUGG-3' (配列番号 28),
5'-CGCACCAUGG-3' (配列番号 29),
5'-CGAGCCAUGG-3' (配列番号 30),
5'-CGAACCAUGG-3' (配列番号 31),
5'-CCCGCCAUGG-3' (配列番号 32),
5'-CCCACCAUGG-3' (配列番号 33),
5'-CCAGCCAUGG-3' (配列番号 34), および
5'-CCAACCAUGG-3' (配列番号 35).

【００６５】
有利には、本発明は、第１の配列が、その修飾バージョンにおいて、

5'- SSMRCCA(T/U)Gt -3' (配列番号 36), または

5'- SSMRCCa(t/u)A(T/U)GG -3' (配列番号 37).

の配列の１つを含むかまたはこの配列で構成されるコザック配列である、上述の方法に関する。

【００６６】
当該発明者らは、意外なことに、コザック配列の翻訳開始コドンの前にダブレットＡ（Ｔ／Ｕ）を挿入すること、またはコザック配列の翻訳開始コドンの後でＧをＴへ置換することが、突然変異したこれらのコザック配列の制御下での全配列の翻訳効率に対して一定の効果を有していることを確認した。

【００６７】
さらに一層有利には、本発明は、前記第１の配列がその修飾バージョンにおいて、
－　ハイブリッド核酸分子が、特に２本鎖のデオキシリボ核酸である場合には、下記配列のいずれか１つ：

5'-GGCGCCATGt-3' (配列番号 38),
5'-GGCACCATGt-3' (配列番号 39),
5'-GGAGCCATGt-3' (配列番号 40),
5'-GGAACCATGt-3' (配列番号 41),
5'-GCCGCCATGt-3' (配列番号 42),
5'-GCCACCATGt-3' (配列番号 43),
5'-GCAGCCATGt-3' (配列番号 44),
5'-GCAACCATGt-3' (配列番号 45),
5'-CGCGCCATGt-3' (配列番号 46),
5'-CGCACCATGt-3' (配列番号 47),
5'-CGAGCCATGt-3' (配列番号 48),
5'-CGAACCATGt-3' (配列番号 49),
5'-CCCGCCATGt-3' (配列番号 50),
5'-CCCACCATGt-3' (配列番号 51),
5'-CCAGCCATGt-3' (配列番号 52),
5'-CCAACCATGt-3' (配列番号 53),
5'-GGCGCCATATGG-3' (配列番号 54),
5'-GGCACCATATGG-3' (配列番号 55),
5'-GGAGCCATATGG-3' (配列番号 56),
5'-GGAACCATATGG-3' (配列番号 57),
5'-GCCGCCATATGG-3' (配列番号 58),
5'-GCCACCATATGG-3' (配列番号 59),
5'-GCAGCCATATGG-3' (配列番号 60),
5'-GCAACCATATGG-3' (配列番号 61),
5'-CGCGCCATATGG-3' (配列番号 62),
5'-CGCACCATATGG-3' (配列番号 63),
5'-CGAGCCATATGG-3' (配列番号 64),
5'-CGAACCATATGG-3' (配列番号 65),
5'-CCCGCCATATGG-3' (配列番号 66),
5'-CCCACCATATGG-3' (配列番号 67),
5'-CCAGCCATATGG-3' (配列番号 68), および
5'-CCAACCATATGG-3' (配列番号 69),

かつ

－ ハイブリッド核酸分子が、特に１本鎖のリボ核酸である場合には、下記配列のいずれか１つ：

5'-GGCGCCAUGU-3' (配列番号 70),
5'-GGCACCAUGU-3' (配列番号 71),
5'-GGAGCCAUGU-3' (配列番号 72),
5'-GGAACCAUGU-3' ( 配列番号 73),
5'-GCCGCCAUGU-3' ( 配列番号 74),
5'-GCCACCAUGU-3' ( 配列番号 75),
5'-GCAGCCAUGU-3' ( 配列番号 76),
5'-GCAACCAUGU-3' ( 配列番号 77),
5'-CGCGCCAUGU-3' ( 配列番号 78),
5'-CGCACCAUGU-3' ( 配列番号 79),
5'-CGAGCCAUGU-3' ( 配列番号 80),
5'-CGAACCAUGU-3' ( 配列番号 81),
5'-CCCGCCAUGU-3' ( 配列番号 82),
5'-CCCACCAUGU-3' ( 配列番号 83),
5'-CCAGCCAUGU-3' ( 配列番号 84),
5'-CCAACCAUGU-3' ( 配列番号 85),
5'-GGCGCCAUAUGG-3' ( 配列番号 86),
5'-GGCACCAUAUGG-3' ( 配列番号 87),
5'-GGAGCCAUAUGG-3' ( 配列番号 88),
5'-GGAACCAUAUGG-3' ( 配列番号 89),
5'-GCCGCCAUAUGG-3' ( 配列番号 90),
5'-GCCACCAUAUGG-3' ( 配列番号 91),
5'-GCAGCCAUAUGG-3' ( 配列番号 92),
5'-GCAACCAUAUGG-3' ( 配列番号 93),
5'-CGCGCCAUAUGG-3' ( 配列番号 94),
5'-CGCACCAUAUGG-3' ( 配列番号 95),
5'-CGAGCCAUAUGG-3' ( 配列番号 96),
5'-CGAACCAUAUGG-3' ( 配列番号 97),
5'-CCCGCCAUAUGG-3' ( 配列番号 98),
5'-CCCACCAUAUGG-3' ( 配列番号 99),
5'-CCAGCCAUAUGG-3' ( 配列番号 100), および
5'-CCAACCAUAUGG-3' ( 配列番号 101).

を含むかまたはこれにより構成されているコザック配列である、上述の方法に関する。

【００６８】

さらに一層有利には、本発明は、前記第１の配列が、その修飾バージョンにおいて、配列番号３８～１０１の配列のいずれか１つを含むまたはそれにより構成されるコザック配列である、上述の方法に関する。

【００６９】

なお一層有利には、本発明は、前記第１の配列が、その修飾バージョンにおいて、配列

番号４３、配列番号４６、配列番号５２、配列番号５９、配列番号６２、配列番号６８、配列番号７５、配列番号７８、配列番号８４、配列番号９１、配列番号９４および配列番号１００の配列のいずれか１つを含むかまたはそれにより構成されるコザック配列である、上述の方法に関する。

【００７０】

本発明は、こうして、有利には、

－　遺伝子の発現および／または、

－　遺伝子および／または前記遺伝子の転写リボ核酸の活性、

を増大させる干渉性核酸のスクリーニング方法において、

前記干渉性核酸が、少なくとも部分的に、前記遺伝子または前記ＲＮＡと配列相補性を有する方法であって、

－　配列番号１を含むかまたは配列番号１で構成され、修飾されている、翻訳を開始することを目的とする第１の非コード配列と、

－　スクリーニングすべき前記干渉性核酸の配列と少なくとも部分的に相補的である第２の配列と、

－　第１の配列のシス翻訳制御下にあり、少なくとも１つの既定のペプチドをコードする第３のヌクレオチド配列と、

を含むハイブリッド核酸分子を、特にＲＮＡに対する干渉を行なうことのできる真核細胞内に導入するステップを含み、

修飾された前記第１の配列が、配列番号３８～１０１、特に配列番号４３、配列番号４６、配列番号５２、配列番号５９、配列番号６２、配列番号６８、配列番号７５、配列番号７８、配列番号８４、配列番号９１、配列番号９４および配列番号１００の配列のいずれか１つを含むかまたはそれにより構成される方法に関する。

【００７１】

前述の定義は、変更すべきところは変更して適用される。

【００７２】

こうして、有利には、本発明は、

－　遺伝子の発現および／または、

－　遺伝子および／または前記遺伝子の転写リボ核酸の活性、

を増大させる干渉性核酸のスクリーニング方法において、

前記干渉性核酸が、少なくとも部分的に、前記遺伝子または前記ＲＮＡと配列相補性を有する方法であって、

－　翻訳を開始することを目的とする第１の非コード配列と、

－　スクリーニングすべき前記干渉性核酸の配列と少なくとも部分的に相補的である第２の配列と、

－　第１の配列のシス翻訳制御下にあり、少なくとも１つの既定のペプチドをコードする第３のヌクレオチド配列と、

を含むハイブリッド核酸分子を、特にＲＮＡに対する干渉を行なうことのできる真核細胞内に導入するステップを含み、

修飾された前記第１の配列が、配列番号３８～１０１、特に、配列番号４３、配列番号４６、配列番号５２、配列番号５９、配列番号６２、配列番号６８、配列番号７５、配列番号７８、配列番号８４、配列番号９１、配列番号９４および配列番号１００の配列のいずれか１つを含むかまたはそれにより構成される方法に関する。

【００７３】

本発明は、さらに一層有利には、前記第２の配列が、スクリーニングすべき前記干渉性核酸の配列と少なくとも部分的に相補的である１８～１００００個のヌクレオチド、特に１８～１０００個、詳細には１８～５００個、より詳細には１８～１００個のスクリーニングすべき前記干渉性核酸の配列と少なくとも部分的に相補的である連続するヌクレオチドを含んでいる、上述の方法に関する。

【００７４】

本発明に係る干渉性核酸をスクリーニングする可能性を増加させるためには、低分子干渉性ＲＮＡの最小サイズであるヌクレオチド１８個未満には決してならない大きいサイズの第３の配列を有するハイブリッド核酸分子を入手することが望ましい。

【００７５】

第３の配列の有利なサイズは、ヌクレオチド１８～５００個であり、これは、配列が

18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29,
30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52,
53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75,
76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98,
99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116,
117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133,
134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150,
151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167,
168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184,
185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201,
202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218,
219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235,
236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252,
253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269,
270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286,
287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303,
304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320,
321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337,
338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354,
355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371,
372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388,
389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405,
406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422,
423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439,
440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456,
457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473,
474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490,
491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 または 500

個のヌクレオチドを含み得ることを意味する。

【００７６】

有利には、本発明は、前記少なくとも１つのペプチドが、ラベル付けされているまたはされていない天然または組換え型のタンパク質、特に自家蛍光タンパク質である、以上で定義された方法に関する。

【００７７】

したがって、第３の配列は、１つ以上のペプチド、特に、ラベル（またはタグ）ＦＬＡＧ、ＨＡ、Ｖ５、ＭＹＣ、ＨＩＳなどの免疫原性ペプチドを用いてラベル付けされ得るか、またはＧＦＰ、ＣＦＰ、ＲＦＰ、ｍＣｈｅｒｒｙなどの蛍光タンパク質でラベル付けされ得る１つ以上のタンパク質をコードする。このリストは限定的なものではなく、本発明の範囲を制限することはできない。

【００７８】
より有利には、使用されるペプチドは、配列番号１０２の配列によりコードされるｅＧＦＰ、配列番号１０３の配列によりコードされるマウスサイクリンＤ１（ＣＤ１）、配列番号１０４の配列によりコードされるマウスＨｒａｓタンパク質、または配列番号１０５の配列によりコードされるエクスポーチン１（ＸＰＯ）である。有利なラベルは、以下の通りである：配列番号１０６の配列によりコードされるＦＬＡＧ（Ｆｌａｇ）ラベル、配列番号１０７の配列によりコードされるＨＡラベル、配列番号１０８の配列によりコードされるＮｔａｇラベル、配列番号１０９の配列によりコードされるＶ５ラベル、配列番号１１０の配列によりコードされるＭｙｃラベル、あるいは配列番号１１１の配列によりコードされるＣｔａｇラベルである。
【００７９】
同様に、本発明の枠内で使用可能なラベル付けされたペプチドは、特に、配列番号１１２の配列によりコードされるＭｙｃ－ＸＰＯ、配列番号１１３の配列によりコードされるＸＰＯ－Ｖ５、配列番号１１４の配列によりコードされるＭｙｃ－ＸＰＯ－Ｖ５、配列番号１１５の配列によりコードされるＨａ－ＣＤ１である。
【００８０】
本発明は、さらに、
－　翻訳を開始することを目的とする第１の非コード配列と、
－　少なくとも１つの干渉性核酸と少なくとも部分的に相補的である第２の配列と、
－　第１の配列のシス翻訳制御下にあり、少なくとも１つの既定のペプチドをコードする第３のヌクレオチド配列と、
を含むハイブリッド核酸分子において、
前記第１の配列が、少なくとも１つのヌクレオチドの置換、欠失または付加により修飾され、こうして前記少なくとも１つのペプチドの翻訳レベルが、特に最適なその未修飾バージョンにおける前記第１の配列の制御下での前記少なくとも１つのペプチドの翻訳レベルに比べて少なくとも１０％低減されるようになっている、ハイブリッド核酸分子に関する。
【００８１】
このようなハイブリッド核酸分子は新規であり、由来およびゲノム局在性が異なる分子のフラグメントで構成された人工的分子であるため、天然には存在しない。
【００８２】
有利には、本発明は、前記第１の配列が、リボソーム内部進入部位つまりＩＲＥＳまたはキャップ（５’ｃａｐ）の下流側の、コザックタイプの転写開始配列である、以上で定義されている通りのハイブリッド核酸分子に関する。
【００８３】
別の有利な実施形態において、本発明は、前記第１の配列が、その未修飾バージョンにおいて下記配列、

5’- ssmRccA(T/U)GG -3’ ( 配列番号 1)

により表わされるコザック配列であり、ここでＲはプリン、ｓはＧまたはＣ、ｍはＡ／ＵまたはＣを表わしている、上述のハイブリッド核酸分子に関する。
【００８４】
有利には、本発明は、前記第１の配列が、その未修飾バージョンにおいて、配列番号４～配列番号３５の配列の１つを含むかまたはそれにより構成されているコザック配列である、上述のハイブリッド核酸分子に関する。
【００８５】
別の有利な実施形態において、本発明は、修飾された前記第１の配列が、
－　ハイブリッド核酸分子が、特に２本鎖のデオキシリボ核酸分子である場合には、配列番号３８～６９の配列のいずれか１つ、

－　ハイブリッド核酸分子が、特に１本鎖のリボ核酸分子である場合には、配列番号７０～１０１の配列のいずれか１つ、
の中から選択される、以上で定義された通りのハイブリッド核酸分子に関する。

【００８６】

さらに一層有利には、本発明は、前記核酸分子が配列番号１１６、配列番号１１７、配列番号１１８、配列番号１１９、配列番号１２０、配列番号１２１、配列番号１２２、配列番号１２３、配列番号１２４、配列番号１２５、配列番号１２６、配列番号１２７および配列番号１２８の配列分子の中から選択される、以上で定義されたハイブリッド核酸分子に関する。

【００８７】

| | |
|---|---|
| 配列番号116<br><br>KOZopt-HA-ras-Flag | GCCACCATGTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCACAGAA<br>TACAAGCTTGTGGTGGTGGGCGCTGGAGGCGTGGGAAAGAGT<br>GCCCTGACCATCCAGCTGATCCAGAACCACTTTGTGGACGAGT<br>ATGATCCCACTATAGAGGACTCCTACCGGAAACAGGTGGTCAT<br>TGATGGGGAGACATGTCTACTGGACATCTTAGACACAGCAGGT<br>CAAGAAGAGTATAGTGCCATGCGGGACCAGTACATGCGCACAG<br>GGGAGGGCTTCCTCTGTGTATTTGCCATCAACAACACCAAGTC<br>CTTCGAGGACATCCATCAGTACAGGGAGCAGATCAAGCGGGT<br>GAAAGATTCAGATGATGTGCCAATGGTGCTGGTGGGCAACAAG<br>TGTGACCTGGCTGCTCGCACTGTTGAGTCTCGGCAGGCCCAG<br>GACCTTGCTCGCAGCTATGGCATCCCCTACATTGAAACATCAG<br>CCAAGACCCGGCAGGGCGTGGAGGATGCCTTCTATACACTAG<br>TCCGTGAGATTCGGCAGCATAAATTGCGGAAACTGAACCCACC<br>CGATGAGAGTGGTCCTGGCTGCATGAGCTGCAAATGTGTGCT<br>GTCCGACTACAAGGACGACGATGACAAG |

10　20　30

| | |
|---|---|
| 配列番号117<br><br>KOZopt-HA-ras$^{G12V}$-Flag | GCCACCATGTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCACAGAA<br>TACAAGCTTGTGGTGGTGGGCGCTGtAGGCGTGGGAAAGAGT<br>GCCCTGACCATCCAGCTGATCCAGAACCACTTTGTGGACGAGT<br>ATGATCCCACTATAGAGGACTCCTACCGGAAACAGGTGGTCAT<br>TGATGGGGAGACATGTCTACTGGACATCTTAGACACAGCAGGT<br>CAAGAAGAGTATAGTGCCATGCGGGACCAGTACATGCGCACAG<br>GGGAGGGCTTCCTCTGTGTATTTGCCATCAACAACACCAAGTC<br>CTTCGAGGACATCCATCAGTACAGGGAGCAGATCAAGCGGGT<br>GAAAGATTCAGATGATGTGCCAATGGTGCTGGTGGGCAACAAG<br>TGTGACCTGGCTGCTCGCACTGTTGAGTCTCGGCAGGCCCAG<br>GACCTTGCTCGCAGCTATGGCATCCCCTACATTGAAACATCAG<br>CCAAGACCCGGCAGGGCGTGGAGGATGCCTTCTATACACTAG<br>TCCGTGAGATTCGGCAGCATAAATTGCGGAAACTGAACCCACC<br>CGATGAGAGTGGTCCTGGCTGCATGAGCTGCAAATGTGTGCT<br>GTCCGACTACAAGGACGACGATGACAAG |

10

20

| | |
|---|---|
| 配列番号118<br>mKoz-AT-<br>mCD1-Ctag | CGCGCCATatgGAACACCAGCTCCTGTGCTGCGAAGTGGAGAC<br>CATCCGCCGCGCGTACCCTGACACCAATCTCCTCAACGACCG<br>GGTGCTGCGAGCCATGCTCAAGACGGAGGAGACCTGTGCGC<br>CCTCCGTATCTTACTTCAAGTGCGTGCAGAAGGAGATTGTGCC<br>ATCCATGCGGAAAATCGTGGCCACCTGGATGCTGGAGGTCTGT<br>GAGGAGCAGAAGTGCGAAGAGGAGGTCTTCCCGCTGGCCAT<br>GAACTACCTGGACCGCTTCCTGTCCCTGGAGCCCTTGAAGAA<br>GAGCCGCCTGCAGCTGCTGGGGGCCACCTGCATGTTCGTGG<br>CCTCTAAGATGAAGGAGACCATTCCCTTGACTGCCGAGAAGTT<br>GTGCATCTACACTGACAACTCTATCCGGCCCGAGGAGCTGCTG<br>CAAATGGAACTGCTTCTGGTGAACAAGCTCAAGTGGAACCTGG<br>CCGCCATGACTCCCCACGATTTCATCGAACACTTCCTCTCCAA<br>AATGCCAGAGGCGGATGAGAACAAGCAGACCATCCGCAAGCA<br>TGCACAGACCTTTGTGGCCCTCTGTGCCACAGATGTGAAGTTC<br>ATTTCCAACCCACCCTCCATGGTAGCTGCTGGGAGCGTGGTG<br>GCTGCGATGCAAGGCCTGAACCTGGGCAGCCCCAACAACTTC<br>CTCTCCTGCTACCGCACAACGCACTTTCTTTCCAGAGTCATCA<br>AGTGTGACCCGGACTGCCTCCGTGCCTGCCAGGAACAGATTG<br>AAGCCCTTCTGGAGTCAAGCCTGCGCCAGGCCCAGCAGAACG<br>TCGACCCCAAGGCCACTGAGGAGGAGGGGGAAGTGGAGGAA<br>GAGGCTGGTCTGGCCTGCACGCCCACCGACGTGCGAGATGT<br>GGACATCgcggccgctggaggagactacaaggacgacgatgacaagtcggccgct<br>ggaggatacccctacgacgtgcccgactacgcc |

10

20

30

| | |
|---|---|
| 配列番号119<br>mKoz-AT-mCD1 | CGCGCCATatgGAACACCAGCTCCTGTGCTGCGAAGTGGAGAC<br>CATCCGCCGCGCGTACCCTGACACCAATCTCCTCAACGACCG<br>GGTGCTGCGAGCCATGCTCAAGACGGAGGAGACCTGTGCGC<br>CCTCCGTATCTTACTTCAAGTGCGTGCAGAAGGAGATTGTGCC<br>ATCCATGCGGAAAATCGTGGCCACCTGGATGCTGGAGGTCTGT<br>GAGGAGCAGAAGTGCGAAGAGGAGGTCTTCCCGCTGGCCAT<br>GAACTACCTGGACCGCTTCCTGTCCCTGGAGCCCTTGAAGAA<br>GAGCCGCCTGCAGCTGCTGGGGGCCACCTGCATGTTCGTGG<br>CCTCTAAGATGAAGGAGACCATTCCCTTGACTGCCGAGAAGTT<br>GTGCATCTACACTGACAACTCTATCCGGCCCGAGGAGCTGCTG<br>CAAATGGAACTGCTTCTGGTGAACAAGCTCAAGTGGAACCTGG<br>CCGCCATGACTCCCCACGATTTCATCGAACACTTCCTCTCCAA<br>AATGCCAGAGGCGGATGAGAACAAGCAGACCATCCGCAAGCA<br>TGCACAGACCTTTGTGGCCCTCTGTGCCACAGATGTGAAGTTC<br>ATTTCCAACCCACCCTCCATGGTAGCTGCTGGGAGCGTGGTG<br>GCTGCGATGCAAGGCCTGAACCTGGGCAGCCCCAACAACTTC<br>CTCTCCTGCTACCGCACAACGCACTTTCTTTCCAGAGTCATCA<br>AGTGTGACCCGGACTGCCTCCGTGCCTGCCAGGAACAGATTG<br>AAGCCCTTCTGGAGTCAAGCCTGCGCCAGGCCCAGCAGAACG<br>TCGACCCCAAGGCCACTGAGGAGGAGGGGGAAGTGGAGGAA<br>GAGGCTGGTCTGGCCTGCACGCCCACCGACGTGCGAGATGT<br>GGACATC |

10

20

30

| | |
|---|---|
| 配列番号120<br><br>mKoz-AT-Ntag-mCD1 | CGCGCCATatggactacaaggacgacgatgacaagctcgatggaggataccccta<br>cgacgtgcccgactacgccggaggactcgagGAACACCAGCTCCTGTGCTG<br>CGAAGTGGAGACCATCCGCCGCGCGTACCCTGACACCAATCT<br>CCTCAACGACCGGGTGCTGCGAGCCATGCTCAAGACGGAGGA<br>GACCTGTGCGCCCTCCGTATCTTACTTCAAGTGCGTGCAGAAG<br>GAGATTGTGCCATCCATGCGGAAAATCGTGGCCACCTGGATGC<br>TGGAGGTCTGTGAGGAGCAGAAGTGCGAAGAGGAGGTCTTCC<br>CGCTGGCCATGAACTACCTGGACCGCTTCCTGTCCCTGGAGC<br>CCTTGAAGAAGAGCCGCCTGCAGCTGCTGGGGGCCACCTGCA<br>TGTTCGTGGCCTCTAAGATGAAGGAGACCATTCCCTTGACTGC<br>CGAGAAGTTGTGCATCTACACTGACAACTCTATCCGGCCCGAG<br>GAGCTGCTGCAAATGGAACTGCTTCTGGTGAACAAGCTCAAGT<br>GGAACCTGGCCGCCATGACTCCCCACGATTTCATCGAACACTT<br>CCTCTCCAAAATGCCAGAGGCGGATGAGAACAAGCAGACCAT<br>CCGCAAGCATGCACAGACCTTTGTGGCCCTCTGTGCCACAGA<br>TGTGAAGTTCATTTCCAACCCACCCTCCATGGTAGCTGCTGGG<br>AGCGTGGTGGCTGCGATGCAAGGCCTGAACCTGGGCAGCCC<br>CAACAACTTCCTCTCCTGCTACCGCACAACGCACTTTCTTTCC<br>AGAGTCATCAAGTGTGACCCGGACTGCCTCCGTGCCTGCCAG<br>GAACAGATTGAAGCCCTTCTGGAGTCAAGCCTGCGCCAGGCC<br>CAGCAGAACGTCGACCCCAAGGCCACTGAGGAGGAGGGGGA<br>AGTGGAGGAAGAGGCTGGTCTGGCCTGCACGCCCACCGACG<br>TGCGAGATGTGGACATC |

10

20

30

| | |
|---|---|
| 配列番号121<br>hKOZ-HA-FLAG-hCD1 | CCAGCCATGtaccctacgacgtgcccgactacgccctcgatggaggagactacaa<br>ggacgacgatgacaagggaggactcgagGAACACCAGCTCCTGTGCTGC<br>GAAGTGGAAACCATCCGCCGCGCGTACCCCGATGCCAACCTC<br>CTCAACGACCGGGTGCTGCGGGCCATGCTGAAGGCGGAGGA<br>GACCTGCGCGCCCTCGGTGTCCTACTTCAAATGTGTGCAGAA<br>GGAGGTCCTGCCGTCCATGCGGAAGATCGTCGCCACCTGGAT<br>GCTGGAGGTCTGCGAGGAACAGAAGTGCGAGGAGGAGGTCT<br>TCCCGCTGGCCATGAACTACCTGGACCGCTTCCTGTCGCTGG<br>AGCCCGTGAAAAAGAGCCGCCTGCAGCTGCTGGGGGCCACT<br>TGCATGTTCGTGGCCTCTAAGATGAAGGAGACCATCCCCCTGA<br>CGGCCGAGAAGCTGTGCATCTACACCGACAACTCCATCCGGC<br>CCGAGGAGCTGCTGCAAATGGAGCTGCTCCTGGTGAACAAGC<br>TCAAGTGGAACCTGGCCGCAATGACCCCGCACGATTTCATTGA<br>ACACTTCCTCTCCAAAATGCCAGAGGCGGAGGAGAACAAACA<br>GATCATCCGCAAACACGCGCAGACCTTCGTTGCCCTCTGTGC<br>CACAGATGTGAAGTTCATTTCCAATCCGCCCTCCATGGTGGCA<br>GCGGGGAGCGTGGTGGCCGCAGTGCAAGGCCTGAACCTGAG<br>GAGCCCCAACAACTTCCTGTCCTACTACCGCCTCACACGCTTC<br>CTCTCCAGAGTGATCAAGTGTGACCCGGACTGCCTCCGGGCC<br>TGCCAGGAGCAGATCGAAGCCCTGCTGGAGTCAAGCCTGCGC<br>CAGGCCCAGCAGAACATGGACCCCAAGGCCGCCGAGGAGGA<br>GGAAGAGGAGGAGGAGGAGGTGGACCTGGCTTGCACACCCA<br>CCGACGTGCGGGACGTGGACATC |

10

20

30

| | |
|---|---|
| 配列番号122<br>hKoz-AT-FLAG-hCD1-HA | CCAGCCATatggactacaaggacgacgatgacaagGAACACCAGCTCCT<br>GTGCTGCGAAGTGGAAACCATCCGCCGCGCGTACCCCGATGC<br>CAACCTCCTCAACGACCGGGTGCTGCGGGCCATGCTGAAGGC<br>GGAGGAGACCTGCGCGCCCTCGGTGTCCTACTTCAAATGTGT<br>GCAGAAGGAGGTCCTGCCGTCCATGCGGAAGATCGTCGCCAC<br>CTGGATGCTGGAGGTCTGCGAGGAACAGAAGTGCGAGGAGG<br>AGGTCTTCCCGCTGGCCATGAACTACCTGGACCGCTTCCTGTC<br>GCTGGAGCCCGTGAAAAAGAGCCGCCTGCAGCTGCTGGGGG<br>CCACTTGCATGTTCGTGGCCTCTAAGATGAAGGAGACCATCCC<br>CCTGACGGCCGAGAAGCTGTGCATCTACACCGACAACTCCAT<br>CCGGCCCGAGGAGCTGCTGCAAATGGAGCTGCTCCTGGTGAA<br>CAAGCTCAAGTGGAACCTGGCCGCAATGACCCCGCACGATTT<br>CATTGAACACTTCCTCTCCAAAATGCCAGAGGCGGAGGAGAAC<br>AAACAGATCATCCGCAAACACGCGCAGACCTTCGTTGCCCTCT<br>GTGCCACAGATGTGAAGTTCATTTCCAATCCGCCCTCCATGGT<br>GGCAGCGGGGAGCGTGGTGGCCGCAGTGCAAGGCCTGAACC<br>TGAGGAGCCCCAACAACTTCCTGTCCTACTACCGCCTCACACG<br>CTTCCTCTCCAGAGTGATCAAGTGTGACCCGGACTGCCTCCG<br>GGCCTGCCAGGAGCAGATCGAAGCCCTGCTGGAGTCAAGCCT<br>GCGCCAGGCCCAGCAGAACATGGACCCCAAGGCCGCCGAGG<br>AGGAGGAAGAGGAGGAGGAGGAGGTGGACCTGGCTTGCACA<br>CCCACCGACGTGCGGGACGTGGACATCtacccctacgacgtgcccgact<br>acgcc |

10

20

30

| | |
|---|---|
| 配列番号123<br>hKoz-AT-Ntag-hCD1 | CCAGCCATatggactacaaggacgacgatgacaagctcgatggaggatacccctac<br>gacgtgcccgactacgccggaggactcgagGAACACCAGCTCCTGTGCTG<br>CGAAGTGGAAACCATCCGCCGCGCGTACCCCGATGCCAACCT<br>CCTCAACGACCGGGTGCTGCGGGCCATGCTGAAGGCGGAGG<br>AGACCTGCGCGCCCTCGGTGTCCTACTTCAAATGTGTGCAGAA<br>GGAGGTCCTGCCGTCCATGCGGAAGATCGTCGCCACCTGGAT<br>GCTGGAGGTCTGCGAGGAACAGAAGTGCGAGGAGGAGGTCT<br>TCCCGCTGGCCATGAACTACCTGGACCGCTTCCTGTCGCTGG<br>AGCCCGTGAAAAAGAGCCGCCTGCAGCTGCTGGGGGCCACT<br>TGCATGTTCGTGGCCTCTAAGATGAAGGAGACCATCCCCCTGA<br>CGGCCGAGAAGCTGTGCATCTACACCGACAACTCCATCCGGC<br>CCGAGGAGCTGCTGCAAATGGAGCTGCTCCTGGTGAACAAGC<br>TCAAGTGGAACCTGGCCGCAATGACCCCGCACGATTTCATTGA<br>ACACTTCCTCTCCAAAATGCCAGAGGCGGAGGAGAACAAACA<br>GATCATCCGCAAACACGCGCAGACCTTCGTTGCCCTCTGTGC<br>CACAGATGTGAAGTTCATTTCCAATCCGCCCTCCATGGTGGCA<br>GCGGGGAGCGTGGTGGCCGCAGTGCAAGGCCTGAACCTGAG<br>GAGCCCCAACAACTTCCTGTCCTACTACCGCCTCACACGCTTC<br>CTCTCCAGAGTGATCAAGTGTGACCCGGACTGCCTCCGGGCC<br>TGCCAGGAGCAGATCGAAGCCCTGCTGGAGTCAAGCCTGCGC<br>CAGGCCCAGCAGAACATGGACCCCAAGGCCGCCGAGGAGGA<br>GGAAGAGGAGGAGGAGGAGGTGGACCTGGCTTGCACACCCA<br>CCGACGTGCGGGACGTGGACATC |

10

20

30

| | |
|---|---|
| 配列番号124<br>FLAG-KOZopt-AT-mCD1-HA | gactacaaggacgacgatgacaag**GCCACCatATGG**AACACCAGCTCCT<br>GTGCTGCGAAGTGGAGACCATCCGCCGCGCGTACCCTGACAC<br>CAATCTCCTCAACGACCGGGTGCTGCGAGCCATGCTCAAGAC<br>GGAGGAGACCTGTGCGCCCTCCGTATCTTACTTCAAGTGCGT<br>GCAGAAGGAGATTGTGCCATCCATGCGGAAAATCGTGGCCAC<br>CTGGATGCTGGAGGTCTGTGAGGAGCAGAAGTGCGAAGAGGA<br>GGTCTTCCCGCTGGCCATGAACTACCTGGACCGCTTCCTGTC<br>CCTGGAGCCCTTGAAGAAGAGCCGCCTGCAGCTGCTGGGGG<br>CCACCTGCATGTTCGTGGCCTCTAAGATGAAGGAGACCATTCC<br>CTTGACTGCCGAGAAGTTGTGCATCTACACTGACAACTCTATC<br>CGGCCCGAGGAGCTGCTGCAAATGGAACTGCTTCTGGTGAAC<br>AAGCTCAAGTGGAACCTGGCCGCCATGACTCCCCACGATTTCA<br>TCGAACACTTCCTCTCCAAAATGCCAGAGGCGGATGAGAACAA<br>GCAGACCATCCGCAAGCATGCACAGACCTTTGTGGCCCTCTG<br>TGCCACAGATGTGAAGTTCATTTCCAACCCACCCTCCATGGTA<br>GCTGCTGGGAGCGTGGTGGCTGCGATGCAAGGCCTGAACCT<br>GGGCAGCCCCAACAACTTCCTCTCCTGCTACCGCACAACGCA<br>CTTTCTTTCCAGAGTCATCAAGTGTGACCCGGACTGCCTCCGT<br>GCCTGCCAGGAACAGATTGAAGCCCTTCTGGAGTCAAGCCTG<br>CGCCAGGCCCAGCAGAACGTCGACCCCAAGGCCACTGAGGA<br>GGAGGGGGAAGTGGAGGAAGAGGCTGGTCTGGCCTGCACGC<br>CCACCGACGTGCGAGATGTGGACATCTACCCCTACGACGTGC<br>CCGACTACGCC |

10

20

30

| | |
|---|---|
| 配列番号125<br>KOZopt-AT-mCD1-HA-STOP-FLAG | GCCACCatATGGAACACCAGCTCCTGTGCTGCGAAGTGGAGA<br>CCATCCGCCGCGCGTACCCTGACACCAATCTCCTCAACGACC<br>GGGTGCTGCGAGCCATGCTCAAGACGGAGGAGACCTGTGCG<br>CCCTCCGTATCTTACTTCAAGTGCGTGCAGAAGGAGATTGTGC<br>CATCCATGCGGAAAATCGTGGCCACCTGGATGCTGGAGGTCT<br>GTGAGGAGCAGAAGTGCGAAGAGGAGGTCTTCCCGCTGGCC<br>ATGAACTACCTGGACCGCTTCCTGTCCCTGGAGCCCTTGAAGA<br>AGAGCCGCCTGCAGCTGCTGGGGGCCACCTGCATGTTCGTG<br>GCCTCTAAGATGAAGGAGACCATTCCCTTGACTGCCGAGAAGT<br>TGTGCATCTACACTGACAACTCTATCCGGCCCGAGGAGCTGCT<br>GCAAATGGAACTGCTTCTGGTGAACAAGCTCAAGTGGAACCTG<br>GCCGCCATGACTCCCCACGATTTCATCGAACACTTCCTCTCCA<br>AAATGCCAGAGGCGGATGAGAACAAGCAGACCATCCGCAAGC<br>ATGCACAGACCTTTGTGGCCCTCTGTGCCACAGATGTGAAGTT<br>CATTTCCAACCCACCCTCCATGGTAGCTGCTGGGAGCGTGGT<br>GGCTGCGATGCAAGGCCTGAACCTGGGCAGCCCCAACAACTT<br>CCTCTCCTGCTACCGCACAACGCACTTTCTTTCCAGAGTCATC<br>AAGTGTGACCCGGACTGCCTCCGTGCCTGCCAGGAACAGATT<br>GAAGCCCTTCTGGAGTCAAGCCTGCGCCAGGCCCAGCAGAAC<br>GTCGACCCCAAGGCCACTGAGGAGGAGGGGGAAGTGGAGGA<br>AGAGGCTGGTCTGGCCTGCACGCCCACCGACGTGCGAGATGT<br>GGACATCTACCCACGACGTGCCCGACTACGCCTGAgactacaagg<br>acgacgatgacaag |

10

20

30

| | |
|---|---|
| 配列番号126<br>FLAG-hKoz-AT-hCD1-STOP-HA | gactacaaggacgacgatgacaagGGAAGAGCGCCAGCCatATGGAAC<br>ACCAGCTCCTGTGCTGCGAAGTGGAAACCATCCGCCGCGCGT<br>ACCCCGATGCCAACCTCCTCAACGACCGGGTGCTGCGGGCCA<br>TGCTGAAGGCGGAGGAGACCTGCGCGCCCTCGGTGTCCTACT<br>TCAAATGTGTGCAGAAGGAGGTCCTGCCGTCCATGCGGAAGA<br>TCGTCGCCACCTGGATGCTGGAGGTCTGCGAGGAACAGAAGT<br>GCGAGGAGGAGGTCTTCCCGCTGGCCATGAACTACCTGGACC<br>GCTTCCTGTCGCTGGAGCCCGTGAAAAAGAGCCGCCTGCAGC<br>TGCTGGGGGCCACTTGCATGTTCGTGGCCTCTAAGATGAAGG<br>AGACCATCCCCCTGACGGCCGAGAAGCTGTGCATCTACACCG<br>ACAACTCCATCCGGCCCGAGGAGCTGCTGCAAATGGAGCTGC<br>TCCTGGTGAACAAGCTCAAGTGGAACCTGGCCGCAATGACCC<br>CGCACGATTTCATTGAACACTTCCTCTCCAAAATGCCAGAGGC<br>GGAGGAGAACAAACAGATCATCCGCAAACACGCGCAGACCTT<br>CGTTGCCCTCTGTGCCACAGATGTGAAGTTCATTTCCAATCCG<br>CCCTCCATGGTGGCAGCGGGGAGCGTGGTGGCCGCAGTGCA<br>AGGCCTGAACCTGAGGAGCCCCAACAACTTCCTGTCCTACTAC<br>CGCCTCACACGCTTCCTCTCCAGAGTGATCAAGTGTGACCCG<br>GACTGCCTCCGGGCCTGCCAGGAGCAGATCGAAGCCCTGCT<br>GGAGTCAAGCCTGCGCCAGGCCCAGCAGAACATGGACCCCAA<br>GGCCGCCGAGGAGGAGGAAGAGGAGGAGGAGGAGGTGGAC<br>CTGGCTTGCACACCCACCGACGTGCGGGACGTGGACATCTGA<br>taccctacgacgtgcccgactacgcc |

10

20

30

| | |
|---|---|
| 配列番号127<br>KOZopt-AT-Myc-CDK4-V5 | **gccaccATATGG**AACAGAAACTGATTAGCGAAGAGGATCTGGCT<br>GCCACTCGATATGAACCCGTGGCTGAAATTGGTGTCGGTGCCT<br>ATGGGACGGTGTACAAAGCCCGAGATCCCCACAGTGGCCACT<br>TTGTGGCCCTCAAGAGTGTGAGAGTTCCTAATGGAGGAGCAG<br>CTGGAGGGGGCCTTCCCGTCAGCACAGTTCGTGAGGTGGCC<br>TTGTTAAGGAGGCTGGAGGCCTTTGAACATCCCAATGTTGTAC<br>GGCTGATGGATGTCTGTGCTACTTCCCGAACTGATCGGGACAT<br>CAAGGTCACCCTAGTGTTTGAGCATATAGACCAGGACCTGAGG<br>ACATACCTGGACAAAGCACCTCCACCGGGCCTGCCGGTTGAG<br>ACCATTAAGGATCTAATGCGTCAGTTTCTAAGCGGCCTGGATTT<br>TCTTCATGCAAACTGCATTGTTCACCGGGACCTGAAGCCAGAG<br>AACATTCTAGTGACAAGTAATGGGACCGTCAAGCTGGCTGACT<br>TTGGCCTAGCTAGAATCTACAGCTACCAGATGGCCCTCACGCC<br>TGTGGTGGTTACGCTCTGGTACCGAGCTCCTGAAGTTCTTCTG<br>CAGTCTACATACGCAACACCCGTGGACATGTGGAGCGTTGGCT<br>GTATCTTTGCAGAGATGTTCCGTCGGAAGCCTCTCTTCTGTGG<br>AAACTCTGAAGCCGACCAGTTGGGGAAAATCTTTGATCTCATT<br>GGATTGCCTCCAGAAGACGACTGGCCTCGAGAGGTATCTCTAC<br>CTCGAGGAGCCTTTGCCCCCAGAGGGCCTCGGCCAGTGCAG<br>TCAGTGGTGCCAGAGATGGAGGAGTCTGGAGCGCAGCTGCTA<br>CTGGAAATGCTGACCTTTAACCCACATAAGCGAATCTCTGCCTT<br>CCGAGCCCTGCAGCACTCCTACCTGCACAAGGAGGAAAGCGA<br>CGCAGAGGGCAAACCGATTCCGAACCCGCTGCTGGGCCTGGA<br>TAGCACC |

10 20 30

| | |
|---|---|
| 配列番号128<br>FLAG-KOZopt-AT-Gly-Ras-HA | gactacaaggacgacgatgacaagGCCACCatATGGgaACAGAATACAAG<br>CTTGTGGTGGTGGGCGCTGGAGGCGTGGGAAAGAGTGCCCT<br>GACCATCCAGCTGATCCAGAACCACTTTGTGGACGAGTATGAT<br>CCCACTATAGAGGACTCCTACCGGAAACAGGTGGTCATTGATG<br>GGGAGACATGTCTACTGGACATCTTAGACACAGCAGGTCAAGA<br>AGAGTATAGTGCCATGCGGGACCAGTACATGCGCACAGGGGA<br>GGGCTTCCTCTGTGTATTTGCCATCAACAACACCAAGTCCTTC<br>GAGGACATCCATCAGTACAGGGAGCAGATCAAGCGGGTGAAA<br>GATTCAGATGATGTGCCAATGGTGCTGGTGGGCAACAAGTGTG<br>ACCTGGCTGCTCGCACTGTTGAGTCTCGGCAGGCCCAGGACC<br>TTGCTCGCAGCTATGGCATCCCCTACATTGAAACATCAGCCAA<br>GACCCGGCAGGGCGTGGAGGATGCCTTCTATACACTAGTCCG<br>TGAGATTCGGCAGCATAAATTGCGGAAACTGAACCCACCCGAT<br>GAGAGTGGTCCTGGCTGCATGAGCTGCAAATGTGTGCTGTCC<br>TACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCC |

【００８８】
上記表中、突然変異したバージョンでの第１の配列は、枠に囲まれて示されている。
【００８９】
ハイブリッド核酸分子のこれらの例は、非限定的に、本発明により網羅されている異なる可能性を例示しており、例えば：
－　配列番号１２８の配列中、第１の配列は枠で囲まれ、第２の配列は第１の配列の３’にあり、第３の配列は、第１の配列の５’にある。このハイブリッド核酸分子は、理想的には、ペプチドＦＬＡＧの発現を増大させる核酸を選択することを可能にする。
－　配列番号１２６または１２５の配列中、第１の配列は枠で囲まれ、第２の配列は第１の配列の３’にあり、第３の配列は、第２の配列の３’にある。このハイブリッド核酸分子は、理想的には、それぞれペプチドＨＡまたはＦＬＡＧの発現を増大させる核酸を選択することを可能にする。
【００９０】
当然のことながら、以上で言及されている通り、第２および第３の配列は重ね合わされてよい。すなわち、第２の配列の一部分は、第３の配列に対応する。したがって、同様に、配列番号１１６～１２８の配列により例示されるハイブリッド核酸分子は、マウスまたはヒトのサイクリンＤ１タンパク質さらにはＲａｓタンパク質に対する干渉性核酸を選択することを可能にする。
【００９１】
上述の配列の各々は、（配列番号の下の）その名称中でＳＴＯＰ（配列番号１２５および１２６の配列中で強調されているコドン）と記載されていない場合には、終止コドンＴＡＧ、ＴＡＡまたはＴＧＡによって終結される。
【００９２】
塩基の相補性のため、当業者は、ＲＮＡについての上述の配列の対応を決定することができる。
【００９３】
有利には、上述のハイブリッド核酸分子は、ベクター内、特に真核生物ベクター内に含

まれる。
【００９４】
より有利には、ベクターは本質的に、以下の配列で構成される：特に配列番号１２９または１３０の配列の１つにより表わされるｐＢＡＢＥ、または特に配列番号１３１の配列によって表わされるＭＳＣＶ。
【００９５】
その上、本発明は、以上で定義された通りの少なくとも１つのハイブリッド核酸分子を含む真核細胞に関する。本発明は同様に、以上で定義された通りの少なくとも１つのハイブリッド核酸分子を含む動物、特に哺乳動物、詳細にはゲッ歯類にも関する。
【００９６】
本発明は、ＲＮＡ干渉能力を有するあらゆるタイプの真核細胞を包含する。当業者であれば、インビトロで培養された真核細胞についての自らの一般的知識を用いて、適切な細胞を容易に識別し、それに対し以上に定義された核酸分子を導入するための形質転換またはトランスフェクション方法を決定することができる。
【００９７】
本発明はさらに、
－　先に定義された通りの、翻訳を開始することを目的とする第１の非コード配列と、
－　先に定義された通りの、第１の配列のシス翻訳制御下にあり、少なくとも１つの既定のペプチドをコードする第３のヌクレオチド配列と、
さらに、干渉性核酸と相補的な配列を有する核酸分子の挿入を可能にする、制限酵素による少なくとも１つの切断部位と、
を含む中間ハイブリッド核酸分子において、
前記第１の配列が、少なくとも１つのヌクレオチドの置換、欠失または付加により修飾され、こうして前記少なくとも１つのペプチドの翻訳レベルが、特に最適なその未修飾バージョンにおける前記第１の配列の制御下での前記少なくとも１つのペプチドの翻訳レベルに比べて少なくとも１０％低減されるようになっている、中間ハイブリッド核酸分子に関する。
【００９８】
有利には、本発明は、前記第１の配列が、その未修飾バージョンにおいて下記配列、

5’- ssmRccA(T/U)GG -3’ ( 配列番号 1)

により表わされるコザック配列であり、ここでＲはプリン、ｓはＧまたはＣ、ｍはＡ／ＵまたはＣを表わしており、かつ特に前記第１の配列が、その修飾バージョンにおいて配列番号４または配列番号５の配列の１つを含む、またはそれにより構成されるコザック配列である、上述の分子に関する。
【００９９】
この中間ハイブリッド核酸分子は、実際には、上述のハイブリッド核酸分子の基本構造であり、前記制限酵素による少なくとも１つの切断部位は、前記遺伝子の発現および／または前記遺伝子および／または前記遺伝子の転写リボ核酸の活性を増大させる干渉性核酸をスクリーニングすることが望ましい遺伝子に応じて、前記第２の配列のクローニングを可能にする。
【０１００】
本発明は同様に、遺伝子の発現および／または遺伝子および／または前記遺伝子の転写リボ核酸の活性を増大させる干渉性核酸の、特にインビトロでのスクリーニングのための、先に定義された通りの少なくとも１つの核酸分子の使用に関する。
【０１０１】
その上、本発明は、
－　先に説明された通りの少なくとも１つのハイブリッド核酸分子と、
－　少なくとも１つの真核細胞と、

を含むキットまたはパッケージにも関する。
【０１０２】
本発明に係るパッケージまたはキットは同様に、
－　先に説明された通りの少なくとも１つのハイブリッド核酸分子と、
－　前記ハイブリッド核酸分子による真核細胞の形質転換手段と、
を含むこともできる。
【０１０３】
本発明に係るパッケージまたはキットは同様に、
－　先に説明された通りの少なくとも１つのハイブリッド核酸分子と、
○前記ハイブリッド核酸分子による真核細胞の形質転換手段および／または
○ＲＮＡ干渉能力を有する少なくとも１つの真核細胞と、
を含むこともできる。
【０１０４】
使用される形質転換手段は、リン酸カルシウムでの細胞の形質転換手段、リポゾームでの形質転換手段、ポリカチオン性作用物質での形質転換手段、さらにはエレクトロロケーションまたはヌクレオフェクションによる形質転換手段であり得る。
【０１０５】
本発明は同様に、
－　真核細胞内に含まれている、以上で定義された通りの少なくとも１つの核酸分子と、
－　干渉性核酸による前記細胞の形質転換手段と、
を含むキットまたはパッケージにも関する。
【０１０６】
以上の記述全体において、細胞の「形質転換」なる用語は、考慮対象の真核細胞内への外因性核酸分子の導入の意味で使用されている。したがって、当業者であれば、この形質転換なる概念が、技術的現状において一般的に使用されている「トランスフェクション」の概念に対応していることを理解するものであろう。
【０１０７】
本発明は、以下で説明する図および実施例に照らして、より良く理解することができる。
【図面の簡単な説明】
【０１０８】
【図１】本発明に記載の異なるタイプのハイブリッド核酸分子を概略的に描く。１は第１の配列を概略的に表わし、２は第２の配列を概略的に表わし、３は第３の配列を概略的に表わす。３＊は、第２の配列が中に挿入された第３の配列を表わす。ｎは、第１、第２および第３の配列のいずれでもない配列を表わす。
【図２】突然変異していない第１の配列を有するハイブリッド核酸分子の第１の配列（上の図表）、および楕円により表示されているジヌクレオチドＡＴの挿入による突然変異した第１の配列を有するハイブリッド核酸分子の第１の配列（上の図表）の配列決定に由来する図表を表わす。
【図３】配列番号１２０のハイブリッド核酸分子と、試験対象の干渉性核酸分子の配列とのアライメントを表わす。配列番号（ＳＥＱ　ＩＤ）が標示されている。
【図４】配列番号１２０のハイブリッド核酸分子を有し、ｓｉＲＮＡ：配列番号１３８（１）、配列番号１４０（３）、配列番号１４２（５）、配列番号１４４（７）、対照の配列番号１６１／１６２（Ｔ．）、配列番号１５０（Ｆ３）、配列番号１５２（Ｆ５）、配列番号１５３（Ｆ６）または配列番号１５４（Ｆ－Ｍ）でトランスフェクトされた細胞から実施されたウエスタンブロット法を表わす。タンパク質は、抗ＨＡ抗体（Ｂ．）を用いて顕示される。対照群として、タンパク質負荷は、抗アクチン抗体（Ａ．）を用いて顕示される。
【図５】配列番号１２０のハイブリッド核酸分子を有し、トランスフェクトされていない（－）または対照ｓｉＲＮＡ：配列番号１６１／１６２（Ｔ．）、配列番号１４６（Ｆ－

Ｎ）、配列番号１４９（Ｆ２）、配列番号１４８（Ｆ）、配列番号１４２（５）または配列番号１４５（ＣＴ）でトランスフェクトされた細胞から実施されたウエスタンブロット法を表わす。タンパク質は、抗ＨＡ抗体（Ｂ．）を用いて顕示される。対照群として、タンパク質負荷は、抗アクチン抗体（Ａ．）を用いて顕示される。

【図６Ａ－６Ｂ】ハイブリッド核酸分子の第１の配列の突然変異効果の比較を表わす。

【図６Ａ】対照ｓｉＲＮＡ：配列番号１６１／１６２（Ｔ．）、配列番号１５０（Ｆ３）または配列番号１５４（Ｆ－Ｍ）でトランスフェクトされた配列番号１３６のハイブリッド核酸分子を有する細胞から実施されたウエスタンブロット法を表わす。タンパク質は、抗ＨＡ抗体（Ｂ．）を用いて顕示される。対照群として、タンパク質負荷は、抗アクチン抗体（Ａ．）を用いて顕示される。

【図６Ａ】対照ｓｉＲＮＡ：配列番号１６１／１６２（Ｔ．）、配列番号１５０（Ｆ３）または配列番号１５４（Ｆ－Ｍ）でトランスフェクトされた配列番号１２０のハイブリッド核酸分子を有する細胞から実施されたウエスタンブロット法を表わす。タンパク質は、抗ＨＡ抗体（Ｂ．）を用いて顕示される。対照群として、タンパク質負荷は、抗アクチン抗体（Ａ．）を用いて顕示される。

【図７】配列番号１４６（Ｂ）、配列番号１４７（Ｃ）、配列番号１４８（Ｄ）、配列番号１４９（Ｅ）、配列番号１５０（Ｆ）、配列番号１５１（Ｇ）、配列番号１５２（Ｈ）、配列番号１５３（Ｉ）、配列番号１５５（Ｊ）、配列番号１５６（Ｋ）、配列番号１５４（Ｌ）、配列番号１３７（Ｍ）、配列番号１３８（Ｎ）、配列番号１３９（Ｏ）、配列番号１４０（Ｐ）、配列番号１４１（Ｑ）、配列番号１４２（Ｒ）、配列番号１４３（Ｓ）、配列番号１４４（Ｔ）または配列番号１４５（Ｕ）のｓｉＲＮＡの１つでトランスフェクトされた配列番号１の配列を有する細胞内のＣＤ１の発現数量を、配列番号１２０の配列を有し対照ｓｉＲＮＡ（配列番号１６１／１６２）でトランスフェクトされた細胞と比較して表わす、ＦＲＥＴの結果のヒストグラムを表わす。結果は、百分率で表現されている。対照群として、トランスフェクトされていない細胞について得た結果が提示されている（Ｕ）。発現を増大させたｓｉＲＮＡは、矢印で標示されている。

【図８】配列番号１２１のハイブリッド核酸分子を有し、ｓｉＲＮＡ：配列番号１３９（２）、配列番号１４０（３）、配列番号１４２（５）、配列番号１４４（７）、対照の配列番号１６１／１６２（Ｔ．）、配列番号１５０（Ｆ３）、配列番号１５２（Ｆ５）、配列番号１５３（Ｆ６）または配列番号１５４（Ｆ－Ｍ）でトランスフェクトされた細胞から実施されたウエスタンブロット法を表わす。タンパク質は、抗ＨＡ抗体（Ｂ．）を用いて顕示される。対照群として、タンパク質負荷は、抗アクチン抗体（Ａ．）を用いて顕示される。

【図９】配列番号１２１のハイブリッド核酸分子を有し、ｓｉＲＮＡ：配列番号１３９（２）、配列番号１４０（３）、配列番号１４２（５）、配列番号１４４（７）、対照の配列番号１６１／１６２（Ｔ．）、配列番号１５０（Ｆ３）、配列番号１５２（Ｆ５）、配列番号１５３（Ｆ６）または配列番号１５４（Ｆ－Ｍ）でトランスフェクトされた細胞から実施されたウエスタンブロット法を表わす。タンパク質は、抗ＨＡ抗体（Ｂ．）を用いて顕示される。対照群として、タンパク質負荷は、抗アクチン抗体（Ａ．）を用いて顕示される。

【図１０】マウスコザック配列（Ａ）、ＡＴ挿入による突然変異したマウスコザック配列（Ｂ）、または最適化されたコザック配列（Ｃ）を伴う構築体を有する細胞内での（恣意的単位での）ＣＤ１発現数量を表わすＦＲＥＴの結果のヒストグラムを表わす。エラーバーは、３つの独立した実験について得られた標準偏差を標示している。

【図１１】マウスコザック配列（Ａ）、ＡＴ挿入による突然変異したマウスコザック配列（Ｂ）、または最適化されたコザック配列（Ｃ）を伴う構築体を有する細胞から実施されたウエスタンブロット法を表わす。サイクリンＤ１のレベルは、抗サイクリン抗体Ｄ１（１．ＲＢ－０１０－ＰＡＢＸ（ＡＢ３）、Ｆｉｓｈｅｒ　ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて顕示される。対照群として、タンパク質負荷は、抗アクチン抗体（２．ａｂ６２７６、Ａｂｃａｍ）を用いて顕示される。

【図１２】マウスコザック配列（Ａ）、ＡＴ挿入による突然変異したマウスコザック配列（Ｂ）または最適化されたコザック配列（Ｃ）を伴う構築体を有する細胞内のサイクリンＤ１メセンジャーＲＮＡの存在量を示すヒストグラムを表わす。
【図１３】異なるｓｉＲＮＡ：非関連対照（Ａ）；配列番号１４９／１５０のｓｉＲＮＡ（Ｂ）；配列番号１５５のｓｉＲＮＡ（Ｃ）、配列番号１５４のｓｉＲＮＡ（Ｄ）および配列番号１４２のｓｉＲＮＡ（Ｃ）を用いて処理された以下の構築体のうちの１つを有する細胞内での（恣意的単位での）ＣＤ１発現数量を表わすＦＲＥＴの結果のヒストグラムを表わす：－　マウスコザックの制御下でＮ末端において、ＡＴ挿入を有するサイクリンＤ１（Ｎｔａｇ－ｍＫｏｚＡＴ）を用いてサイクリンＤ１ラベル付けされた構築体；黒色の棒、－　マウスコザックの制御下でＮ末端において、サイクリンＤ１（Ｎｔａｇ－ｍＫｏｚ）を用いてサイクリンＤ１ラベル付けされた構築体；白色の棒、－　マウスコザックの制御下でＣ末端において、サイクリンＤ１ＡＴ（Ｃｔａｇ－ｍＫｏｚＡＴ）を用いてサイクリンＤ１ラベル付けされた構築体；灰色の棒、－　マウスコザックの制御下でＣ末端において、ＡＴ挿入を有するサイクリンＤ１（Ｃｔａｇ－ｍＫｏｚＡＴ）を用いてサイクリンＤ１ラベル付けされた構築体；斜線を有する棒、－　マウスコザックの制御下でＮ末端において、発現を増大させるために最適化されたサイクリンＤ１（Ｎｔａｇ－ＫｏｚＯＰＴ）を用いてサイクリンＤ１ラベル付けされた構築体；水平線を有する棒。
【実施例】
【０１０９】
実施例１：配列番号３７の第１の配列（ＡＴ挿入）を含むハイブリッド核酸分子の構築体の例
配列番号３６の配列により表わされる突然変異した第１の配列を含む構築体を得るために、当該発明者らは、ＧｅｎｅＡｒｔ（登録商標）（Ｌｉｆｅ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）キットを使用し、供給業者の使用説明書にしたがって、ＰＣＲによりジヌクレオチドＡＴを配列番号９のコザック配列内に導入することで、定方向突然変異誘発戦略を利用した。
【０１１０】
簡単に言うと、挿入は、配列番号９の配列を含むマトリックスベクターおよび突然変異／ＡＴ挿入を含むセンスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて行なわれる：

**センス**: 5'-TGGTACGGCgccaccATatggactacaaggac-3' ( **配列番号** 132),

**アンチセンス**: 5'-gtccttgtagtccatATggtggcGCCGTACCA-3' (**配列番号** 133).

【０１１１】
ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）は、以下の条件で行なわれる：
ステップ１：　マトリックス・プラスミドのメチル化：３７℃で２０分間
ステップ２：　ＰＣＲ／突然変異誘発
ａ　９５℃で２分間のサイクル１回
ｂ　９５℃で３０秒間のサイクル１回
　　６０℃で３０秒間のサイクル１回
　　６８℃で４分間のサイクル１回
ｃ　ｂへの戻り、３５回
ｄ　６８℃で５分間のサイクル１回
ｅ　反応産物を保存するため、４℃で不定の時間にわたるサイクル１回
【０１１２】
このようにして得たＰＣＲ産物はこのとき配列決定され、配列番号５９の配列を含むベクターが選択される。
【０１１３】
図２は、配列決定の結果を示す。
【０１１４】

実施例２：配列番号３６の第１の配列（ＧからＴへの置換）を含むハイブリッド核酸分子の構築体例

ＡＴＧ直後に位置するＧをＴに置換することにより突然変異した第１の配列を含むハイブリッド核酸分子を得るためには：

１．　Ｇに代ってＴ（例えばＦｌａｇに代ってＨＡ）で始まるタグをもってくることによりタグを置き換えること、または

２．　Ｔから始まるコドンによりコードされたアミノ酸を付加するためにトリプレット（１コドン）の挿入を行なうこと。後続するレポーター・ペプチドの翻訳のリーディング・フレームを保つためには、３個（または３の倍数個）の塩基を付加しなければならない。

【０１１５】

コード配列の修飾が重要でない場合には、以下のオリゴヌクレオチドを用いて、実施例１で標示された通りの定方向突然変異誘発を実現することも可能である：

**センス**：5‘-TGGTACGGCgccaccatg**TTR**actacaaggac-3’（ **配列番号** 157),

Ｒはプリンである。

**アンチセンス**：5’-gtccttgtagt**YAA**catggtggcGCCGTACCA-3’（ **配列番号** 158),

Ｙはピリミジンである。

【０１１６】

実施例３：ハイブリッド核酸分子による真核細胞の形質転換例

行なうべき実験に応じて、以下のような複数のトランスフェクション技術を用いることができる：

ａ．　リポフェクタミン（登録商標）３０００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）でのトランスフェクション：

この方法は、ハイブリッド核酸構築体を用いて一時的に細胞を急速にトランスフェクトすることを可能にする。トランスフェクションは供給業者の使用説明書にしたがって実施される。

ｂ．　有利な構築体を含むウイルスの産生後のウイルス感染：

本発明に係るハイブリッド核酸分子を安定した形で発現する細胞を得るために、当該発明者らは、ウイルス感染を利用した。

【０１１７】

使用されるプロトコルは以下の通りである：

１日目：指数関数的成長中の３×１０$^{6}$個の２９３Ｔ細胞を、１０ｍＬの完全培地（ＤＭＥＭ、ウシ胎児血清１０％、ペニシリン、ストレプトマイシンおよびＬ－グルタミン）の入った１００ｍｍ入りのボックス内に播種し、一晩中３７℃でインキュベートする。

【０１１８】

２日目：トランスフェクションの２～３時間前に、培地を交換してｐＨ変動を制限する。

【０１１９】

管内に、以下のプラスミドを順番に添加する：

－　ハイブリッド核酸分子を含むＭＳＣＶベクターまたはレトロウイルスベクター、１２μｇ、

－　Ｇａｇ－ｐｏｌプラスミド、６μｇ、

－　Ｅｃｏプラスミド（ＧＭＯ操作に関連する安全上の理由で使用される、マウス細胞に特異的なウイルス認識タンパク質）、２μｇ。

【０１２０】

その後、５００μＬの滅菌水をベクターに添加する。次に５００μＬの２×ＨＢＳ緩衝液を添加し、全体を撹拌するが、それでもヴォルテックス撹拌は行わない。最後に、ｐＨ５．５の$CaCl_2$溶液５０μＬを添加し、混合物を撹拌するが、それでもヴォルテックス撹拌は行わない。ＨＳＢ２×培地は、以下のように調製する：すなわち０．８ｇのＮａＣｌ、０．０２７ｇの$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$および１．２ｇのＨＥＰＥＳを９０ｍｌの体積の精製水中に溶解させる。０．５ＮのＮａＯＨを用いてｐＨを７．０５に調製し、精製水で体積を１００ｍＬに調整する。０．２２μｍの孔を有するフィルターを通してろ過することによって溶液を滅菌し、溶液を５ｍＬのアリコートにしてから、最長１年間にわたり－２０℃で凍結させる。

【０１２１】

混合物を、随時穏やかに撹拌しながら、周囲温度で２０～３０分間放置する。

【０１２２】

その後、混合物を培地に添加し、細胞を一晩中３７℃でインキュベートする。

【０１２３】

３日目：３日目の朝、培地の約半分を交換する。その後、培地を４℃で保存する。この作業を６時間おきに繰り返し、上清を４℃で保存する。夜間に上清を混合し、場合によって一晩中、１００００ｒｐｍで遠心分離する。

【０１２４】

４日目：ウイルスを回収し、培地を昼間３回交換して、ウイルスを感染性のまま維持する。

【０１２５】

５日目：０．４５μｍのフィルター上でウイルスをろ過し、８μｇ／ｍＬのポリブレンを含む１．５～２ｍＬの体積内で１～２時間ＮＩＨ３Ｔ３細胞を感染させるために使用する。次に、１０ｍＬの培地を添加し、細胞を一晩中インキュベートする。

【０１２６】

６日目：１０ｍＬの新鮮培地で、培地を交換する。

【０１２７】

８日目および９日目：このとき、蛍光タンパク質の発現を試験するためにフローサイトメトリによって細胞を分析する。

【０１２８】

このとき、細胞は分子によって感染させられている。

【０１２９】

実施例４：遺伝子の発現および／または遺伝子および／または前記遺伝子の転写リボ核酸の活性を増大させる干渉性核酸分子のスクリーニング例

１－プロトコル

－　細胞の培養

○　ハイブリッド核酸構築体を発現する安定した細胞を、$CO_2$が５％のインキュベータ内において３７℃でサブコンフルエント培養状態に維持する。

【０１３０】

－　プレート固定

スクリーニングすべきｓｉＲＮＡのトランスフェクションの朝に、ハイブリッド構築体を発現するストック細胞をトリプシンで処理して、培養支持体から剥離させ、２４ウェルプレートの形に播種して、夜に４０～８０％の付着細胞コンフルエンシーを達成する。

【０１３１】

－　ｓｉＲＮＡの調製およびトランスフェクション

試験すべきｓｉＲＮＡを、リポフェクタミン（登録商標）ＲＮＡｉＭＡＸ試薬（Ｌｉｆｅ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）プロトコルにしたがって調製する。簡潔には、２５μＬのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）培地中に１．５μＬのリポフェクタミン（登録商標）を希釈する。並行して、０．５μＬの滅菌水中の５ｐｍｏｌのｓｉＲＮＡを２５μＬのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）培地中に希釈する。その後、ＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）の

２つの溶液を混合し、５分間周囲温度でインキュベートする。

【０１３２】

その後、５０μＬの先行する混合物を各ウェル内に添加する。細胞を翌日まで３７℃でインキュベートする。

【０１３３】

－　結果の分析

翌日、細胞をＰＢＳで清浄し、次に溶解緩衝液（ＴＲＩＳ　１０ｍＭ　ｐＨ＝８、ＥＤＴＡ　１ｍＭ、ＮＰ－４０　０．０５％、＋／－プロテアーゼ阻害剤－ＲＯＣＨＥ－ｃＯｍｐｌｅｔｅ）および１５秒間の活発な音波処理（器具の最大出力）とそれに続く１５秒間の休止で構成される５サイクルのバイオラプタ（Ｄｌａｇｅｎｏｄｅ）音波処理の割合での音波処理ステップを用いて細胞を溶解させて、細胞内タンパク質、特にハイブリッド配列によって産生される融合タンパク質を回収する。その後、試験された異なる条件のタンパク質溶解物を、ＤＮＡまたはタンパク質の定量化を用いて正規化して、異なる処理条件に由来する材料の等価総量を比較する。その後、正規化された溶解物を、ハイブリッド構築体の翻訳産物の特異的抗体を用いたウエスタンブロット法で、またはハイブリッド構築体の翻訳産物が許容する場合にはＦＲＥＴまたは蛍光測定で分析する。

【０１３４】

２－　結果

ａ－　ＡＴ挿入による突然変異

最初の一連の実験において、当該発明者らは、配列番号２２０のハイブリッド核酸分子を使用することによって、本発明に係る干渉性分子のスクリーニングを実施した。この分子中で、第１の配列は、

CGCGCCATatgg ( **配列番号** 62),

であり、

第２の配列は、

ACTACAAGGACGACGATGACAAGCTCGATGGAGGATACCCCTACGACGTGCCCGA
CTACGCCGGAGGACTCGAGG ( **配列番号** 134),

であり、ＦＬＡＧ－インターカラント－ＨＡ－インターカラントの連鎖に対応し、

第３の配列は、以下のものである：

AACACCAGCTCCTGTGCTGCGAAGTGGAGACCATCCGCCGCGCGTACCCTGACAC
CAATCTCCTCAACGACCGGGTGCTGCGAGCCATGCTCAAGACGGAGGAGACCTGT
GCGCCCTCCGTATCTTACTTCAAGTGCGTGCAGAAGGAGATTGTGCCATCCATGCG
GAAAATCGTGGCCACCTGGATGCTGGAGGTCTGTGAGGAGCAGAAGTGCGAAGA
GGAGGTCTTCCCGCTGGCCATGAACTACCTGGACCGCTTCCTGTCCCTGGAGCCC
TTGAAGAAGAGCCGCCTGCAGCTGCTGGGGGCCACCTGCATGTTCGTGGCCTCTA
AGATGAAGGAGACCATTCCCTTGACTGCCGAGAAGTTGTGCATCTACACTGACAAC
TCTATCCGGCCCGAGGAGCTGCTGCAAATGGAACTGCTTCTGGTGAACAAGCTCA
AGTGGAACCTGGCCGCCATGACTCCCCACGATTTCATCGAACACTTCCTCTCCAAA
ATGCCAGAGGCGGATGAGAACAAGCAGACCATCCGCAAGCATGCACAGACCTTTG
TGGCCCTCTGTGCCACAGATGTGAAGTTCATTTCCAACCCACCCTCCATGGTAGCT
GCTGGGAGCGTGGTGGCTGCGATGCAAGGCCTGAACCTGGGCAGCCCCAACAAC
TTCCTCTCCTGCTACCGCACAACGCACTTTCTTTCCAGAGTCATCAAGTGTGACCC
GGACTGCCTCCGTGCCTGCCAGGAACAGATTGAAGCCCTTCTGGAGTCAAGCCTG
CGCCAGGCCCAGCAGAACGTCGACCCCAAGGCCACTGAGGAGGAGGGGGGAAGT
GGAGGAAGAGGCTGGTCTGGCCTGCACGCCCACCGACGTGCGAGATGTGGACAT
C（配列番号 135）

【０１３５】

上述の通りの実験条件において、当該発明者らは、以下の異なる干渉性核酸（ｓｉＲＮＡ）を試験した：

HA リンカー Nter : GAGCUACCUCCUAUGGGGAUG ( 配列番号 137),
HA : AUGCUGCACGGGCUGAUGCGG ( 配列番号 138),
HA 2 : GGGAUGCUGCACGGGCUGAUG (配列番号 139),
HA 3 : AUGGGGAUGCUGCACGGGCUG ( 配列番号 140),
HA 4 : UGGGGAUGCUGCACGGGCUGA ( 配列番号 141),
HA 5 : GGGGAUGCUGCACGGGCUGAU ( 配列番号 142),
HA 6 : GGAUGCUGCACGGGCUGAUGC ( 配列番号 143),
HA 7 : GAUGCUGCACGGGCUGAUGCG ( 配列番号 144),
HA リンカー Cter : AGCCGGCGACCUCCUAUGGGG ( 配列番号 145),
FLAG N : CUGCUGCUACUGUUCGAGCUA ( 配列番号 146),
FLAG N2 : UUCCUGCUGCUACUGUUCGAG ( 配列番号 147),
FLAG : AUGUUCCUGCUGCUACUGUUC ( 配列番号 148),
FLAG V2 : CUGAUGUUCCUGCUGCUACUG ( 配列番号 149),
Flag 3 : CUGAUGUUCCUGCUGCUACUG ( 配列番号 150),
FLAG 4 : UGAUGUUCCUGCUGCUACUGU ( 配列番号 151),
FLAG 5 : GAUGUUCCUGCUGCUACUGUU ( 配列番号 152),
FLAG 6 : ACCUGAUGUUCCUGCUGCUAC ( 配列番号 153),
FLAG M : AUGUUCCUGCUGCUGCUAUUC ( 配列番号 154),
FLAG+リンカー Cter : CUGCUGCUACUGUUCAGCCGG ( 配列番号 155 ), および
FLAG Cter2 ha ct : UUCCUGCUGCUACUGUUCAGC ( 配列番号 156 ).

【０１３６】
読み易さのために、図３は、試験される異なる干渉性核酸（ｓｉＲＮＡ）が配列番号１２０の分子配列上にあるアラインメントを表わしている。
【０１３７】
ｓｉＲＮＡのトランスフェクション対照群として、負の対照ｓｉＲＮＡ（「スクランブル」：Ｔ．）も同様にトランスフェクトする。これらのｓｉＲＮＡは、

5’- UUCUCCGAACGUGUCACGUtt-3’ ( 配列番号 161)

のセンス配列を有し、相補鎖は、

5’-ACGUGACACA UUCGGAGAAtt -3’ ( 配列番号 162).

を有する。
【０１３８】
ウエスタンブロット法により得た結果は、図４に表わされている。
【０１３９】
この図から、試験された異なるｓｉＲＮＡのうち、ｓｉＲＮＡ Ｆｌａｇ Ｍ（配列番号１５４）が、非関連対照で観察されたレベルよりも高いマーカーペプチドＣＤ１の発現レベルの検出を可能にすることが確認できる。
【０１４０】
第３の配列の位置が、発現を増大させる干渉性核酸のスクリーニングに対して影響を及

ぼさないことを確認するために、当該発明者らは、配列番号１１８のハイブリッド核酸分子を使用した。

【０１４１】

ウエスタンブロット法により得た結果は、図５に表わされている。

【０１４２】

この図から、試験された異なるｓｉＲＮＡのうち、ｓｉＲＮＡ　Ｆｌａｇ　Ｎ（配列番号１４６）およびｓｉＲＮＡ　ＨＡ－ＣＴ（配列番号１４５）が、非関連対照で観察されたレベルよりも高いマーカーペプチドＣＤ１の発現レベルの検出を可能にすることが確認できる。

【０１４３】

最後に、当該発明者は、突然変異を受けていない第１の配列（配列番号１３６）を有するハイブリッド核酸分子の存在下での干渉性核酸の効果を比較することによって突然変異した第１の配列を有するハイブリッド核酸分子のみが、干渉性核酸分子のスクリーニングを可能にすることを確認した。

【０１４４】

ウエスタンブロット法によって得た結果は、図６Ａおよび６Ｂに表わされている。

【０１４５】

この実験から、ｓｉＲＮＡ　ＦＬＡＧ　Ｍ（配列番号１５４）は、ハイブリッド核酸分子がその第１の配列内に突然変異を含んでいる場合のみにＣＤ１の発現レベルの増大を検出でき（図６Ａ）、第１の配列が突然変異していない場合にはこれを検出できない（図６Ｂ）こと、が確認される。

【０１４６】

ｂ－　ＧからＴへの置換による突然変異

第２の一連の実験において、当該発明者らは、配列番号１２１のハイブリッド核酸分子を使用することによって、本発明に係る干渉性分子のスクリーニングを実施した。この分子中で、第１の配列は、

CCAGCCATGt ( 配列番号 52)

である。

【０１４７】

ｓｉＲＮＡのトランスフェクション対照群として、負の対照ｓｉＲＮＡ（「スクランブル」：Ｔ．）も同様にトランスフェクトする。これらのｓｉＲＮＡは、

5'- UUCUCCGAACGUGUCACGUtt-3' ( 配列番号 161)

のセンス配列を有し、相補鎖は、

5'-ACGUGACACA UUCGGAGAAtt -3' ( 配列番号 162).

を有する。

【０１４８】

ウエスタンブロット法により得た結果は、図８に表わされている。

【０１４９】

この図から、試験された異なるｓｉＲＮＡのうち、ｓｉＲＮＡ　Ｆｌａｇ　Ｍ（配列番号１５４）が、非関連対照で観察されたレベルよりも高いマーカーペプチドＣＤ１の発現レベルの検出を可能にすることが確認できる。したがって、配列番号１２０のハイブリッド核酸分子について得られたものと同じ結果が観察される。

【０１５０】

当該発明者らは、突然変異を受けていない第１の配列（配列番号１３６）を有するハイブリッド核酸分子の存在下での干渉性核酸の効果を比較することによって突然変異した第

１の配列を有するハイブリッド核酸分子のみが、干渉性核酸分子のスクリーニングを可能にすることを確認した。

【０１５１】

ウエスタンブロット法によって得た結果は、図９に表わされている。

【０１５２】

この実験から、ｓｉＲＮＡ　ＦＬＡＧ　Ｍ（配列番号１５４）は、ハイブリッド核酸分子がその第１の配列内に突然変異を含んでいる場合のみにＣＤ１の発現レベルの増大を検出できることが確認される。

【０１５３】

結論として、特にＧからＴへの置換またはＡＴジヌクレオチドＡＴの挿入による突然変異した第１の配列を含むハイブリッド核酸分子のみが、発現を増大させる干渉性核酸分子スクリーニングを可能にする。

【０１５４】

実施例５：検出手段としてＦＲＥＴを用いたスクリーニングの例

夜間にｓｉＲＮＡでのトランスフェクションの６０％のコンフルエンスを達成するように、朝方２４ウェルプレートに、配列番号１２０の構築体を安定した形で発現する細胞を播種した。夜間に、ウェルあたり１０ｍＭのｓｉＲＮＡの割合で、細胞をリポフェクタミン（ＲＮＡｉｍａｘ－供給業者の手順）でトランスフェクトした。異なるｓｉＲＮＡ（実施例４を参照）を試験して、目的トランス遺伝子の発現に対するそれぞれの影響を評価した。翌朝、細胞を、ＰＢＳで１回洗浄し、緩衝液（ＴＲＩＳ　１０ｍＭ　ｐＨ＝８、ＥＤＴＡ　１ｍＭ、０．０５％　ＮＰ－４０、＋プロテアーゼ阻害剤）１００マイクロリットル中に溶解させ、エッペンドルフ型管内に収集し、その後Ｄｉａｇｅｎｏｄｅブランドの浴型音波処理器内において、１５秒間の活発な音波処理（最大出力）とそれに続く１５秒間の休止で構成される５サイクルの割合での音波処理に付した。次に、細胞溶解物を４℃、１５０００ｒｃｆで５分間遠心分離する。

【０１５５】

上清を回収し、１リットルにつき１００マイクログラムのＤＮＡの割合で（ナノドロップでの定量によるＤＮＡ濃度の測定またはＢｒｅｄｆｏｒｄ方法によるタンパク質濃度の測定の後に）各試料のＤＮＡ（および／またはタンパク質）の類似の濃度での調整の後、１ウェルあたり５マイクロリットルを、３８４ウェルのボックス（Ｇｒｅｉｎｅｒ－＃７８４０７６）にトリプリケートで入れる。５マイクロリットルのドナー抗体（ＣＩＳＢＩＯ－＃６１０ＨＡＴＡＢ）およびアクセプタ抗体（ＣＩＳＢＩＯ－＃６１ＦＧ２ＸＬＢ）の、供給業者（ＣＩＳＢＩＯ）の使用説明書にしたがった混合物を、各ウェルに添加し、それに続いて遮光状態において、周囲温度で１時間インキュベートする。目的トランス遺伝子により産生されたＴＡＧに対して向けられたドナーとアクセプタの間のＦＲＥＴ（ＦｌａｇおよびＨＡ）に由来する蛍光の読取りを、供給業者の使用説明書にしたがってＨＴＲＦ装置（ＰＨＥＲＡｓｔａｒ　ＦＳ－ＢＭＧ　ＬＡＢＴＥＣＨ）を用いて実施する。ＦＲＥＴを有していない対照群（ＦＲＥＴシグナルを生成する能力を有するＴＡＧを含んでいない溶解物）との関係におけるデータの正規化の後、対照群のｓｉＲＮＡ（Ｔ．）と比べたシグナルの１０％の増大が、目的トランス遺伝子の発現の増大のために有意であるとみなされる。

【０１５６】

結果は、図７に標示されている。

【０１５７】

ＦＲＥＴの定量的結果は、干渉性核酸分子Ｆ－Ｎ（配列番号１４８；Ｂ）、Ｆｌａｇ（配列番号１４８および１４９；ＤおよびＥ）、ＦＬＡＧ　Ｃｔｅｒ（配列番号１５６；Ｊ）、Ｆ－Ｍ（配列番号１５４；Ｌ）およびＨＡ３（配列番号１４０；Ｐ）が発現を増大させることを示している。

【０１５８】

これらのデータ全体は、本発明に係る方法により遺伝子の発現を増大させる干渉性核酸

分子スクリーニングが可能になることを示している。

【０１５９】

実施例６：根本的機序の決定

上述の通り、遺伝子発現を増大させる干渉性核酸分子のスクリーニングには、既定の突然変異を有するコザック配列の使用が必要であることが確認される。このようなコザック配列は、それが制御する遺伝子の発現を削減する、すなわちタンパク質の翻訳を削減する効果を有する。

【０１６０】

したがって、最初、当該発明者らは、

－　特に配列番号１２により表わされる、サイクリンＤ１のマウスコザック配列（ｍＫｏｚ）、

－　配列番号９により表わされる、本発明に係るＡＴ挿入を有するサイクリンＤ１のマウスコザック配列（ｍＫｏｚＡＴ）、および

－　配列番号６２の配列の、最適化されたサイクリンＤ１のコザック配列（ＫｏｚＯＰＴ）

によりそのタンパク質発現が制御されるサイクリンＤ１タンパク質のタンパク質発現レベルを比較した。

【０１６１】

サイクリンＤ１の内因性遺伝子（Ｃｃｎｄ１－／－）が備わっておらず、かつｍＫｏｚ－Ｎｔａｇ－ＣｙｃＤ１またはｍＫｏｚＡＴ－Ｎｔａｇ－ＣｙｃＤ１（配列番号１２０）またはＫｏｚＯＰＴ－Ｎｔａｇ－ＣｙｃＤ１を安定した形で発現するマウス線維芽細胞の細胞系統を、１日目の朝に播種し、５％で安定した率の$CO_2$と共に３７℃のインキュベータ内で培養して、翌日およそ８０％の細胞コンフルエンスに達するようにした。この段階で、当該系統を収集して、そこからタンパク質（溶解緩衝液＝Ｔｒｉｓ　１０ｍＭ、ＥＤＴＡ１ｍＭおよびＮＰ－４０、０．０５％）または全ＲＮＡをトリゾールで抽出した。

【０１６２】

タンパク質溶解物を次に、Ｂｒａｄｆｏｒｄ方法により総タンパク質等価濃度で正規化し、その後、アクチンまたはサイクリンＤ１に対してウエスタンブロット法で分析した。これらの試料を、実施例５に記載のタンデム－ＨＴＲＦ方法によっても分析した。

【０１６３】

得られた結果は、図１０および図１１に提示されている。

【０１６４】

結果は、野生型ｍＫｏｚ配列に比べた、または人工的配列ＫｏｚＯＰＴに比べた、ｍＫｏｚＡＴ由来の発現の低減を示している。したがって、これは、突然変異したコザック配列がタンパク質発現を減少させる効果を有することを意味している。

【０１６５】

逆転写により相補的ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）を生成するためにメセンジャーＲＮＡを使用し、次にこれらのｃＤＮＡを定量的ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）で分析した。ｍＫｏｚ－Ｎｔａｇ－ＣｙｃＤ１またはｍＫｏｚＡＴ－Ｎｔａｇ－ＣｙｃＤ１またはＫｏｚＯＰＴ－Ｎｔａｇ－ＣｙｃＤ１由来のメセンジャーＲＮＡの比率を、ハウスキーピング遺伝子（Ｈｐｒｔ、Ｂ２Ｍ、Ｔｒｆｒ１、ＴｕｂｂおよびＧａｐｄｈ）を用いることによって、正規化の後のｑＰＣＲにしたがって評価した。

【０１６６】

結果は、図１２に提示されている。

【０１６７】

Ｎｔａｇ－ＣｙｃＤ１についてのメセンジャーＲＮＡの比率は、ｍＫｏｚ－Ｎｔａｇ－ＣｙｃＤ１またはｍＫｏｚＡＴ－Ｎｔａｇ－ＣｙｃＤ１またはＫｏｚＯＰＴ－Ｎｔａｇ－ＣｙｃＤ１系統間において匹敵するものである（スチューデント検定によるグループ間の偏差は有意なものではない）と思われる。

【０１６８】

したがって、発現レベルも同様に翻訳レベルに変調される。

【０１６９】

実施例７：本発明のｓｉＲＮＡのスクリーニングの枠内でのコザック配列の比較

突然変異したコザック配列の重要性を確認するために、当該発明者らは、最後に、以下の異なる構築体から、異なるｓｉＲＮＡの効果（発現の増大または減少）を試験した：

－　マウスコザックの制御下でＮ末端において、ＡＴ挿入を有するサイクリンＤ１（Ｎｔａｇ－ｍＫｏｚＡＴ）を用いてサイクリンＤ１ラベル付けされた構築体、

－　マウスコザックの制御下でＮ末端において、サイクリンＤ１（Ｎｔａｇ－ｍＫｏｚ）を用いてサイクリンＤ１ラベル付けされた構築体、

－　マウスコザックの制御下でＣ末端において、サイクリンＤ１　ＡＴ（Ｃｔａｇ－ｍＫｏｚＡＴ）を用いてサイクリンＤ１ラベル付けされた構築体、

－　マウスコザックの制御下でＣ末端において、ＡＴ挿入を有するサイクリンＤ１（Ｃｔａｇ－ｍＫｏｚＡＴ）を用いてサイクリンＤ１ラベル付けされた構築体、および

－　マウスコザックの制御下でＮ末端において、発現を増大させるために最適化されたサイクリンＤ１（Ｎｔａｇ－ＫｏｚＯＰＴ）を用いてサイクリンＤ１ラベル付けされた構築体。

【０１７０】

図７で試験した複数のｓｉＲＮＡ、すなわち配列番号１４９／１５０、配列番号１５５、配列番号１５４および配列番号１４２を使用した。

【０１７１】

比較試験は、図１３に提示されている。

【０１７２】

これらのデータは、コザック配列の如何に関わらず、発現を減少させるｓｉＲＮＡがつねに、そのようなものとして同定されることを示している。これに対し発現を増大させるｓｉＲＮＡは、レポーターが、（ここではＡＴ挿入を有する）突然変異したコザック配列の制御下に置かれた場合に、一貫して同定される。

【０１７３】

これらの結果全体は、本発明に係る遺伝子の発現を増大させるｓｉＲＮＡのスクリーニングにおけるレポーターの翻訳を調節する領域の重要性を確認するものである。

【０１７４】

本発明は、提示された実施形態に限定されず、当業者には、他の実施形態が明確に現われるものである。

【図１】

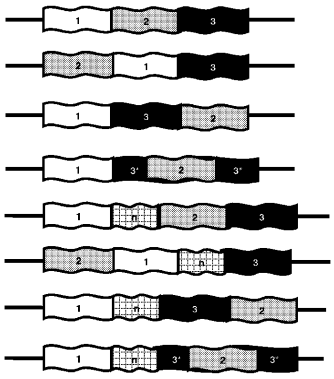


Figure 1

【図２】

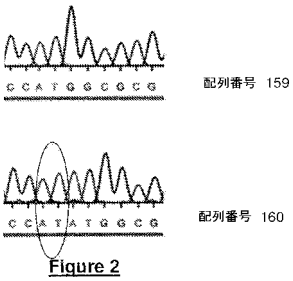



Figure 2

【図３】

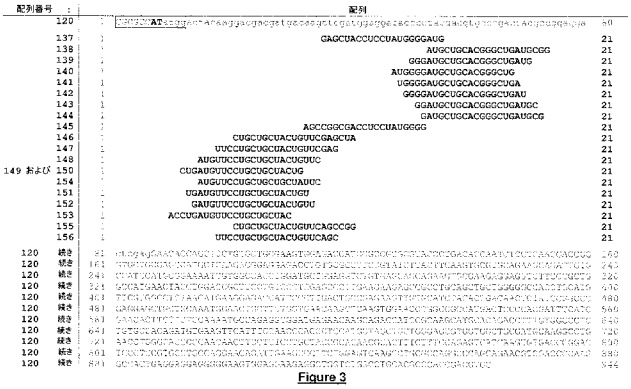


Figure 3

【図４】

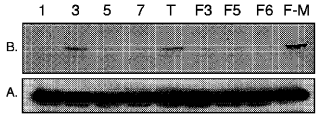



Figure 4

【図５】

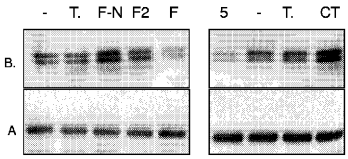



Figure 5

【図６Ａ－６Ｂ】

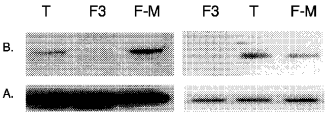



Figure 6A Figure 6B

【図７】

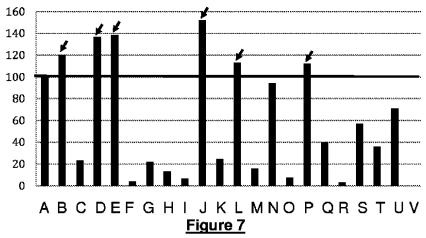



Figure 7

【図８】

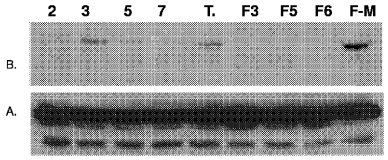



Figure 8

【図９】

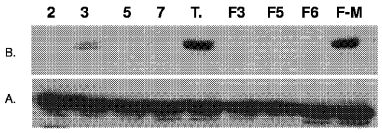



Figure 9

【図１０】

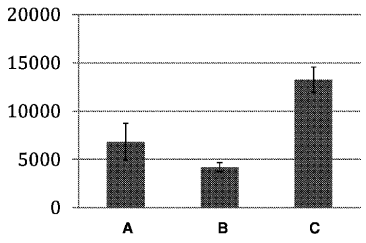



Figure 10

【図１１】

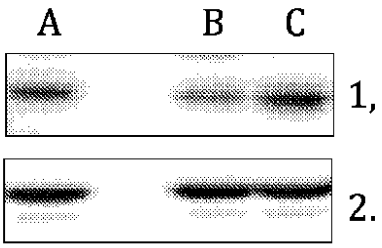



Figure 11

【図１２】

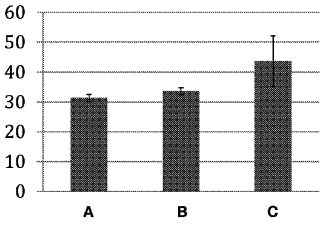



Figure 12

【図１３】

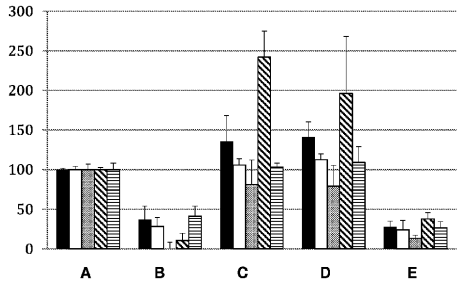



Figure 13

【配列表】
2017528151000001.app

【国際調査報告】

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2015/052572

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/67 C12Q1/68 C12N15/63
ADD.

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)
C12N C12Q

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)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | JON VOUTILA ET AL: "Gene Expression Profile Changes After Short-activating RNA-mediated Induction of Endogenous Pluripotency Factors in Human Mesenchymal Stem Cells", MOLECULAR THERAPY - NUCLEIC ACIDS, vol. 1, no. 8, 1 August 2012 (2012-08-01), page e35, XP055128516, ISSN: 2162-2531, DOI: 10.1038/mtna.2012.20 the whole document | 1-6,12 |
| X | WO 2006/113246 A2 (UNIV CALIFORNIA [US]; LI LONGCHENG [US]; DAHIYA RAJVIR [US]) 26 October 2006 (2006-10-26) claims 1, 4 | 1-6,12 |

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] 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 but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 4 November 2015 | 18/11/2015 |

| Name and mailing address of the ISA/ | Authorized officer |
|---|---|
| European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016 | Faber, Cerstin |

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2015/052572

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | LI LONG-CHENG ET AL: "Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 103, no. 46, 14 November 2006 (2006-11-14), pages 17337-17342, XP002589998, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.0607015103 [retrieved on 2006-11-03] the whole document | 1-6,12 |
| X | JANOWSKI B A ET AL: "Activating gene expression in mammalian cells with promoter-targeted duplex RNAs", NATURE CHEMICAL BIOLOGY, NATURE PUB. GROUP, vol. 3, no. 3, 28 January 2007 (2007-01-28), pages 166-173, XP003026584, ISSN: 1552-4450, DOI: 10.1038/NCHEMBIO860 the whole document | 1-6,12 |
| X | YANG BICHENG ET AL: "Induction of TRPV5 expression by small activating RNA targeting gene promoter as a novel approach to regulate cellular calcium transportation", LIFE SCIENCES, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 114, no. 2, 17 August 2014 (2014-08-17), pages 70-76, XP029063571, ISSN: 0024-3205, DOI: 10.1016/J.LFS.2014.08.007 the whole document | 1-6,12 |
| X | YANG KAI ET AL: "Promoter-targeted double-stranded small RNAs activate PAWR gene expression in human cancer cells", INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 45, no. 7, 10 April 2013 (2013-04-10) , pages 1338-1346, XP028562110, ISSN: 1357-2725, DOI: 10.1016/J.BIOCEL.2013.03.022 the whole document | 1-6,12 |

-/--

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2015/052572

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | ROBERT F PLACE ET AL: "Formulation of Small Activating RNA Into Lipidoid Nanoparticles Inhibits Xenograft Prostate Tumor Growth by Inducing p21 Expression", MOLECULAR THERAPY - NUCLEIC ACIDS, vol. 1, no. 3, 1 March 2012 (2012-03-01), page e15, XP055202856, ISSN: 2162-2531, DOI: 10.1038/mtna.2012.5 the whole document<br>----- | 1-6,12 |
| X | WO 2005/038054 A1 (LIANG ZICAI [SE]; DU QUAN; ZHANG HONG-YAN) 28 April 2005 (2005-04-28) claims 1-16<br>----- | 7-11 |

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/FR2015/052572

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---|---|
| WO 2006113246 A2 | 26-10-2006 | CA 2604532 A1 | 26-10-2006 |
| | | EP 1871426 A2 | 02-01-2008 |
| | | JP 5362350 B2 | 11-12-2013 |
| | | JP 2008538896 A | 13-11-2008 |
| | | US 2010210707 A1 | 19-08-2010 |
| | | US 2015104869 A1 | 16-04-2015 |
| | | WO 2006113246 A2 | 26-10-2006 |
| WO 2005038054 A1 | 28-04-2005 | NONE | |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2015/052572

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. C12N15/67 C12Q1/68 C12N15/63
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
C12N C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie* | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|---|---|---|
| X | JON VOUTILA ET AL: "Gene Expression Profile Changes After Short-activating RNA-mediated Induction of Endogenous Pluripotency Factors in Human Mesenchymal Stem Cells", MOLECULAR THERAPY - NUCLEIC ACIDS, vol. 1, no. 8, 1 août 2012 (2012-08-01), page e35, XP055128516, ISSN: 2162-2531, DOI: 10.1038/mtna.2012.20 le document en entier<br>----- | 1-6,12 |
| X | WO 2006/113246 A2 (UNIV CALIFORNIA [US]; LI LONGCHENG [US]; DAHIYA RAJVIR [US]) 26 octobre 2006 (2006-10-26) revendications 1, 4<br>----- | 1-6,12 |
| | -/-- | |

[X] Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

[X] Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale |
|---|---|
| 4 novembre 2015 | 18/11/2015 |

| Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale | Fonctionnaire autorisé |
|---|---|
| Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016 | Faber, Cerstin |

1

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (avril 2005)

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2015/052572

**Cadre N° I Séquence(s) de nucléotides ou d'acides aminés (suite du point 1.c de la première feuille)**

1. En ce qui concerne la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale, la recherche internationale a été effectuée sur la base d'un listage des séquences :

   a. [X] faisant partie de la demande internationale telle que déposée :

      [X] sous forme d'un fichier texte selon la norme de l'annexe C/ST.25.

      [ ] sur papier ou sous forme d'un fichier image.

   b. [ ] remis avec la demande internationale, exclusivement aux fins de la recherche internationale en vertu de la règle 13*ter*.1.a), sous forme d'un fichier texte selon la norme de l'annexe C/ST.25.

   c. [ ] remis postérieurement à la date de dépôt international exclusivement aux fins de la recherche internationale :

      [ ] sous forme d'un fichier texte selon la norme de l'annexe C/ST.25 (règle 13*ter*.1.a)).

      [ ] sur papier ou sous forme d'un fichier image (règle 13*ter*.1.b) et instruction administrative 713).

2. [ ] De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listage des séquences a été déposée ou remise, les déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles faisant partie de la demande telle que déposée et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, selon le cas, ont été remises.

3. Commentaire complémentaires:

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2015/052572

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie* | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|---|---|---|
| X | LI LONG-CHENG ET AL: "Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 103, no. 46, 14 novembre 2006 (2006-11-14), pages 17337-17342, XP002589998, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.0607015103 [extrait le 2006-11-03] le document en entier | 1-6,12 |
| X | JANOWSKI B A ET AL: "Activating gene expression in mammalian cells with promoter-targeted duplex RNAs", NATURE CHEMICAL BIOLOGY, NATURE PUB. GROUP, vol. 3, no. 3, 28 janvier 2007 (2007-01-28), pages 166-173, XP003026584, ISSN: 1552-4450, DOI: 10.1038/NCHEMBIO860 le document en entier | 1-6,12 |
| X | YANG BICHENG ET AL: "Induction of TRPV5 expression by small activating RNA targeting gene promoter as a novel approach to regulate cellular calcium transportation", LIFE SCIENCES, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 114, no. 2, 17 août 2014 (2014-08-17) , pages 70-76, XP029063571, ISSN: 0024-3205, DOI: 10.1016/J.LFS.2014.08.007 le document en entier | 1-6,12 |
| X | YANG KAI ET AL: "Promoter-targeted double-stranded small RNAs activate PAWR gene expression in human cancer cells", INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 45, no. 7, 10 avril 2013 (2013-04-10) , pages 1338-1346, XP028562110, ISSN: 1357-2725, DOI: 10.1016/J.BIOCEL.2013.03.022 le document en entier | 1-6,12 |

-/--

1

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2015/052572

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie* | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|---|---|---|
| X | ROBERT F PLACE ET AL: "Formulation of Small Activating RNA Into Lipidoid Nanoparticles Inhibits Xenograft Prostate Tumor Growth by Inducing p21 Expression", MOLECULAR THERAPY - NUCLEIC ACIDS, vol. 1, no. 3, 1 mars 2012 (2012-03-01), page e15, XP055202856, ISSN: 2162-2531, DOI: 10.1038/mtna.2012.5 le document en entier<br>----- | 1-6,12 |
| X | WO 2005/038054 A1 (LIANG ZICAI [SE]; DU QUAN; ZHANG HONG-YAN) 28 avril 2005 (2005-04-28) revendications 1-16<br>----- | 7-11 |

1

Formulaire PCT/ISA/210 (suite de la deuxième feuille) (avril 2005)

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°
PCT/FR2015/052572

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|---|---|---|
| WO 2006113246 A2 | 26-10-2006 | CA 2604532 A1 | 26-10-2006 |
| | | EP 1871426 A2 | 02-01-2008 |
| | | JP 5362350 B2 | 11-12-2013 |
| | | JP 2008538896 A | 13-11-2008 |
| | | US 2010210707 A1 | 19-08-2010 |
| | | US 2015104869 A1 | 16-04-2015 |
| | | WO 2006113246 A2 | 26-10-2006 |
| WO 2005038054 A1 | 28-04-2005 | AUCUN | |

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (avril 2005)

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | F I | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|
| *Ｃ１２Ｎ　5/10* | *(2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 5/10 | |

(81)指定国　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72)発明者　ビアンヴニュ，フレデリック
フランス共和国，エフ－３４９８０　サン－クレマン－ドゥ－リヴィエール，リュ　ドゥ　クロンドル，６０

Ｆターム(参考) 4B063 QA01 QA05 QA18 QQ08 QQ52 QQ79 QR35 QR77 QR79 QR80
QS38 QX02
4B065 AA93X AB01 AC20 BA02 BA05 BB12 BB25 BB37 BC03 BC07
CA46 CA60