

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2006年6月22日 (22.06.2006)

PCT

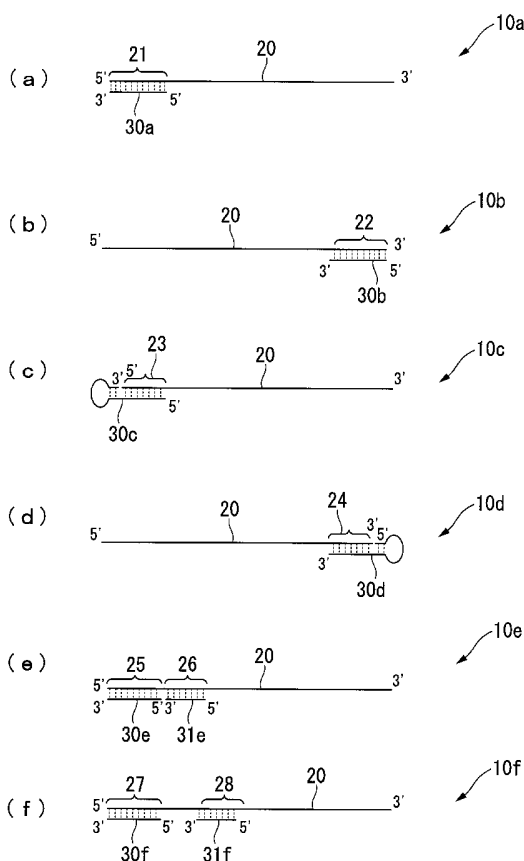
(10) 国際公開番号
WO 2006/064813 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 1/15* (2006.01)
A61K 31/711 (2006.01) *C12N 1/19* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/022890
- (22) 国際出願日: 2005年12月13日 (13.12.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
 特願 2004-360632
 2004年12月13日 (13.12.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人北海道大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目8番地 Hokkaido (JP).
- (72) 発明者; および
 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 紙谷 浩之 (KAMIYA, Hiroyuki). 原島 秀吉 (HARASHIMA, Hideyoshi). 土谷 博之 (TSUCHIYA, Hiroyuki).
- (74) 代理人: 早川 裕司, 外 (HAYAKAWA, Yuzi et al.); 〒1070052 東京都港区赤坂六丁目9番5号氷川アネックス2号館501アーケイディア特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,

[続葉有]

(54) Title: NUCLEIC ACID CONSTRUCT AND METHOD OF TRANSFERRING MUTATION INTO TARGET REGION BY USING THE SAME

(54) 発明の名称: 核酸構築物及びそれを利用した標的領域への変異導入方法



(57) Abstract: It is intended to provide a nucleic acid construct by which a mutation can be transferred into a target region of a double-stranded DNA in a cell. To achieve this object, a nucleic acid construct, which comprises a single-stranded DNA having a base sequence derived from a base sequence in the sense strand side region or the antisense strand side region of a target region located in a double-stranded DNA in a cell by deletion, substitution, insertion or addition of one or more bases and having a 90% or more homology with the base sequence of the sense strand side region or the antisense strand side region as described above and another single-stranded DNA containing a base sequence complementary to the base sequence of a part of the single-stranded DNA as described above and having been annealed to the single-stranded DNA as described above, is provided.

(57) 要約: 細胞内の二本鎖DNAのうち、標的領域に変異を導入することができる核酸構築物を提供することを目的とし、この目的を達成するために、細胞内の二本鎖DNAに存在する標的領域のうちセンス鎖側領域又はアンチセンス鎖側領域の塩基配列において、1又は複数個の塩基が欠失、置換、挿入又は付加された塩基配列からなり、前記センス鎖側領域又は前記アンチセンス鎖側領域の塩基配列との相同性が90%以上である一本鎖DNAと、前記一本鎖DNAの一部の塩基配列と相補的な塩基配列を含み、前記一本鎖DNAにアニーリングした一本鎖核酸とを有する核酸構築物を提供する。



RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

核酸構築物及びそれを利用した標的領域への変異導入方法

技術分野

- [0001] 本発明は、一本鎖DNAと該一本鎖DNAにアニーリングした一本鎖核酸とを有する核酸構築物、該核酸構築物を利用した標的領域への変異導入方法等に関する。

背景技術

- [0002] 近年のヒトゲノム計画の進展や大量遺伝子サンプルのスクリーニング方法の開発によって、個人の遺伝子情報をより詳細かつ簡便に調べることが可能になった。このような技術の進歩とともに、個々の患者の遺伝子情報に合わせて、変異の入った異常配列を直接正常配列に戻す遺伝子修復法は、テーラーメイド医療として、非常に期待できる技術である。
- [0003] 遺伝子修復法の一つであるSmall Fragment Homologous Replacement (SFHR) 法は、正常配列を含む、熱変性させたPCR産物を細胞へ導入することによって、変異遺伝子を正常型へ変換することを目的としている(非特許文献1～3)。
- [0004] 哺乳動物細胞において相同組換えに関与するRad51は、そのノックアウト動物が胎生致死であることから、細胞分裂時に生じるDNA複製の誤りを修復するために必要不可欠な蛋白質として知られている(非特許文献4及び5)。
- [0005] これまでのRad51の生化学的な解析から、in vitro相同組換え反応においてRad51が二本鎖よりも一本鎖DNAを基質として好むことが知られている(非特許文献6及び7)。また、Rad51が、一本鎖DNAの一部に二本鎖構造を持つTailed Duplexを、通常の一本鎖DNAと比べ、良い相同組換え反応の基質とすることが知られている(非特許文献7)。

非特許文献1:Kunzelmann K. 等,「Gene targeting of CFTR DNA in CF epithelial cells.」, Gene Ther., 1996年, 第3巻, 859-867頁

非特許文献2:Goncz KK等,「Targeted replacement of normal and mutant CFTR sequences in human airway epithelial cells using DNA fragments.」 Hum Mol Genet .,1998年, 第7巻, 1913-1919頁

非特許文献3:Colosimo A等,「Targeted correction of a defective selectable marker gene in human epithelial cells by small DNA fragments.」, Mol Ther., 2001年, 第3巻, 178-185頁

非特許文献4:West SC.,「Molecular views of recombination proteins and their control.」, Nature Rev. Mol. Cell Biol., 2003年, 第4巻, 435-445頁

非特許文献5:Bertrand P等,「p53's double life: transactivation-independent repression of homologous recombination.」, Trends Genet., 2004年, 第20巻, 235-243頁

非特許文献6:Baumann P等,「Human rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro.」, Cell, 1996年, 第87巻, 757-766頁

非特許文献7:Mazin AV等,「Tailed duplex DNA is the preferred substrate for protein-mediated homologous pairing.」, EMBO J., 2000年, 第19巻, 1148-1156頁

発明の開示

発明が解決しようとする課題

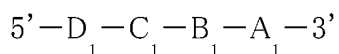
- [0006] 本発明は、細胞内の二本鎖DNAのうち、標的領域に変異を導入することができる核酸構築物、該核酸構築物を利用した標的領域への変異導入方法、該核酸構築物が導入された細胞、該細胞を保有する生物個体等を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0007] 上記課題を解決するために、本発明は、細胞内の二本鎖DNAに存在する標的領域のうちセンス鎖側領域又はアンチセンス鎖側領域の塩基配列において、1又は複数個の塩基が欠失、置換、挿入又は付加された塩基配列からなり、前記センス鎖側領域又は前記アンチセンス鎖側領域の塩基配列との相同性が90%以上である一本鎖DNAと、前記一本鎖DNAの一部の塩基配列と相補的な塩基配列を含み、前記一本鎖DNAにアニーリングした一本鎖核酸とを有する核酸構築物を提供する。
- [0008] また、本発明は、細胞内の二本鎖DNAに存在する標的領域に含まれる異常塩基配列が原因となる疾患の治療剤であって、本発明の核酸構築物を含む治療剤を提供する。
- [0009] さらに、本発明は、生物個体を構成していない細胞内又はヒト以外の生物個体を構

成している細胞内の二本鎖DNAに存在する標的領域の塩基配列に変異を導入する方法であって、前記細胞内に本発明の核酸構築物を導入する工程を含む方法を提供する。

- [0010] さらに、本発明は、本発明の核酸構築物が導入された細胞を提供する。
- [0011] さらに、本発明は、本発明の細胞を保有するヒト以外の生物個体を提供する。
- [0012] 本発明の核酸構築物において、前記一本鎖DNAの塩基数が300～3000であり、前記一本鎖核酸の塩基数が15～100であることが好ましい。
- [0013] 本発明の核酸構築物において、前記一本鎖核酸が、前記一本鎖DNAのうち、前記センス鎖側領域又は前記アンチセンス鎖側領域に対して欠失、置換、挿入又は付加された前記塩基のいずれをも含まない部分の塩基配列と相補的な塩基配列を含み、前記一本鎖DNAのうち、前記センス鎖側領域又は前記アンチセンス鎖側領域に対して欠失、置換、挿入又は付加された前記塩基のいずれをも含まない部分にアニーリングしていることが好ましい。
- [0014] 本発明の核酸構築物において、前記一本鎖核酸が、前記一本鎖DNAのうち、前記センス鎖側領域又は前記アンチセンス鎖側領域に対して欠失、置換、挿入又は付加された前記塩基のいずれよりも5'側又は3'側に位置する部分にアニーリングしていることが好ましい。
- [0015] 本発明の核酸構築物において、前記一本鎖核酸が、前記一本鎖DNAの5'末端側部分又は3'末端側部分の塩基配列と相補的な塩基配列を含み、前記一本鎖DNAの5'末端側部分又は3'末端側部分にアニーリングしていることが好ましい。
- [0016] 本発明の核酸構築物において、前記一本鎖核酸が、次式(I)：

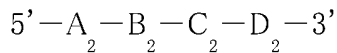


[式中、 A_1 は、2個以上の任意の塩基からなる塩基配列を表し、 B_1 は、 A_1 で表される塩基配列と相補的な塩基配列を含まない、3個以上の任意の塩基からなる塩基配列を表し、 C_1 は、 A_1 で表される塩基配列と相補的な塩基配列を表し、 D_1 は、前記一本鎖DNAの5'末端側部分の塩基配列と相補的な塩基配列を表す。]

で表される塩基配列からなり、 A_1 で表される塩基配列からなる部分が、 C_1 で表される塩基配列からなる部分にアニーリングし、ヘアピン構造を形成していることが好ましい

。

[0017] 本発明の核酸構築物において、前記一本鎖核酸が、次式(II)：



[式中、 A_2 は、2個以上の任意の塩基からなる塩基配列を表し、 B_2 は、 A_2 で表される塩基配列と相補的な塩基配列を含まない、3個以上の任意の塩基からなる塩基配列を表し、 C_2 は、 A_2 で表される塩基配列と相補的な塩基配列を表し、 D_2 は、前記一本鎖DNAの3'末端側部分の塩基配列と相補的な塩基配列を表す。]

で表される塩基配列からなり、 A_2 で表される塩基配列からなる部分が、 C_2 で表される塩基配列からなる部分にアニーリングし、ヘアピン構造を形成していることが好ましい。

。

[0018] 本発明の核酸構築物において、前記センス鎖側領域又は前記アンチセンス鎖側領域に対して欠失、置換、挿入又は付加された前記塩基のいずれもが、前記一本鎖DNAの5'末端側部分又は3'末端側部分に存在しないことが好ましい。

[0019] 本発明の核酸構築物において、前記一本鎖DNAにアニーリングした複数の一本鎖核酸を有し、前記複数の一本鎖核酸がそれぞれ前記一本鎖DNAの異なる部分の塩基配列と相補的な塩基配列を含むことが好ましい。

[0020] 本発明の核酸構築物において、前記標的領域に疾患の原因となる異常塩基配列が含まれており、前記一本鎖DNAが、前記標的領域のうちセンス鎖側領域又はアンチセンス鎖側領域の塩基配列において、前記異常塩基配列が正常塩基配列となるように、1又は複数個の塩基が欠失、置換、挿入又は付加された塩基配列からなることが好ましい。

図面の簡単な説明

[0021] [図1]本発明の核酸構築物の実施形態を示す模式図である。

[図2]pTENHEXの構成を示す模式図である。

[図3]フラグメント1単独、フラグメント1とフラグメント1にアニーリングしたフラグメント2からなる核酸構築物S1、フラグメント1とフラグメント1にアニーリングしたフラグメント3からなる核酸構築物S2、及びフラグメント1とフラグメント1にアニーリングしたフラグメント6からなる核酸構築物S5を用いた場合の、pTENHEXに含まれる変異型HygEGF

P遺伝子の修復効率を示す図である。

[図4]フラグメント1とフラグメント1にアニーリングしたフラグメント4からなる核酸構築物S3、及びフラグメント1とフラグメント1にアニーリングしたフラグメント5からなる核酸構築物S4を用いた場合の、pTENHEXに含まれる変異型HygEGFP遺伝子の修復効率を示す図である。

符号の説明

[0022] 10a, 10b, 10c, 10d, 10e, 10f・・・核酸構築物

20・・・一本鎖DNA

30a, 30b, 30c, 30d, 30e, 31e, 30f, 31f・・・一本鎖核酸

発明を実施するための最良の形態

[0023] 本発明の核酸構築物は、細胞内の二本鎖DNAに存在する標的領域のうちセンス鎖側領域又はアンチセンス鎖側領域の塩基配列において、1又は複数個の塩基が欠失、置換、挿入又は付加された塩基配列からなり、センス鎖側領域又はアンチセンス鎖側領域の塩基配列との相同性が90%以上である一本鎖DNAと、一本鎖DNAの一部の塩基配列と相補的な塩基配列を含み、一本鎖DNAにアニーリングした一本鎖核酸とを有する。

[0024] 細胞内の二本鎖DNAのうち、変異を導入したい塩基配列を含む領域が標的領域である。二本鎖DNAはセンス鎖とアンチセンス鎖とから構成されているので、標的領域はセンス鎖側領域とアンチセンス鎖側領域とから構成されている。センス鎖側領域の塩基配列及びアンチセンス鎖側領域の塩基配列は相補的であり、センス鎖側領域及びアンチセンス鎖側領域の塩基数は同一であり、通常300～3000、好ましくは300～1500、さらに好ましくは300～900である。

[0025] 標的領域が存在する二本鎖DNAは、内因性の二本鎖DNA(ゲノムDNA)であってもよいし、外因性の二本鎖DNA(細胞内に導入された外来DNA)であってもよいが、内因性の二本鎖DNA(ゲノムDNA)であることが好ましい。

[0026] 標的領域は、細胞内の二本鎖DNAのうち、いずれの領域であってもよいが、疾患の原因となる異常塩基配列が含まれる領域であることが好ましい。異常塩基配列は、正常塩基配列において1又は複数個の塩基が欠失、置換、挿入又は付加された塩基

配列である。疾患の原因となる変異としては、例えば、ハンチントン舞踏病で見られるCAGリピートによる長鎖挿入変異、筋ジストロフィーのジストロフィン遺伝子における長鎖欠失変異、血友病の第9因子遺伝子における一塩基置換等が挙げられる。

- [0027] 標的領域としては、例えば、構造遺伝子領域、調節遺伝子領域等の一部又は全部を含む領域を選択することができる。なお、構造遺伝子領域は、タンパク質のアミノ酸配列を規定している領域であり、真核細胞の構造遺伝子領域には、エクソン及びイントロンの両者が含まれる。調節遺伝子領域としては、例えば、オペレーター領域、プロモーター領域、アテニューエーター領域等が挙げられる。
- [0028] センス鎖側領域又はアンチセンス鎖側領域の塩基配列において欠失、置換、挿入又は付加される塩基の個数は、センス鎖側領域又はアンチセンス鎖側領域の塩基配列との相同性が90%以上である限り特に限定されるものではないが、通常1～10個、好ましくは1～5個、さらに好ましくは1～3個である。
- [0029] 一本鎖DNAは直鎖状であり、その端部は非修飾である。すなわち、一本鎖DNAは天然型DNAであり、ホスホロチオエートDNA等のように端部が修飾された非天然型DNAは含まれない。
- [0030] センス鎖側領域又はアンチセンス鎖側領域の塩基配列において欠失、置換、挿入又は付加される塩基の位置は特に限定されるものではないが、標的領域に疾患の原因となる異常塩基配列が含まれている場合、センス鎖側領域又はアンチセンス鎖側領域の塩基配列において、異常塩基配列が正常塩基配列となるように、1又は複数個の塩基が欠失、置換、挿入又は付加されていることが好ましい。
- [0031] 一本鎖DNAの塩基配列とセンス鎖側領域又はアンチセンス鎖側領域の塩基配列と相同性は90%以上であるが、好ましくは95%以上であり、さらに好ましくは99%以上である。なお、一本鎖DNAの塩基配列がセンス鎖側領域の塩基配列と90%以上の相同性を有する場合、一本鎖DNAはセンス鎖側領域と相同置換可能であると考えられ、一本鎖DNAの塩基配列がアンチセンス鎖側領域の塩基配列と90%以上の相同性を有する場合、一本鎖DNAはアンチセンス鎖側領域と相同置換可能であると考えられる。一本鎖DNAのセンス鎖側領域又はアンチセンス鎖側領域との相同置換は、本発明の核酸構築物による標的領域の塩基配列への変異導入メカニズムの一つと

して考えられる。

- [0032] 一本鎖DNAの塩基数は、センス鎖側領域又はアンチセンス鎖側領域の塩基配列に対して加えられた変異に応じて異なるが、通常300～3000、好ましくは300～1500、さらに好ましくは300～900である。
- [0033] 一本鎖核酸は、DNA、RNA、核酸誘導体、核酸類似体等のいずれであってもよい。核酸誘導体又は類似体としては、例えば、ホスホロチオエートDNA、ホスホロチオエートRNA、2'-O-Me-RNA、LNA (Locked nucleic acid)、PNA (ペプチド核酸)、ENA (Ethylene-bridged nucleic acid) 等が挙げられる。
- [0034] 一本鎖核酸は、一本鎖DNAにアニーリングできる限り、一本鎖DNAのいずれの部分の塩基配列と相補的な塩基配列を含んでいてもよいが、一本鎖核酸は、一本鎖DNAの5'末端側部分又は3'末端側部分の塩基配列と相補的な塩基配列を含み、一本鎖DNAの5'末端側部分又は3'末端側部分にアニーリングしていることが好ましく、一本鎖DNAの3'末端側部分の塩基配列と相補的な塩基配列を含み、一本鎖DNAの3'末端側部分にアニーリングしていることがさらに好ましい。一本鎖核酸が、一本鎖DNAの一本鎖DNAの5'末端側部分又は3'末端側部分、特に3'末端側部分にアニーリングした核酸構築物によれば、標的領域への変異導入効率を向上させることができる。
- [0035] 一本鎖DNAの5'末端側部分は、一本鎖DNAの5'末端に位置する塩基を含む塩基配列からなる部分であり、一本鎖DNAの3'末端側部分は、一本鎖DNAの3'末端に位置する塩基を含む塩基配列からなる部分である。
- [0036] 一本鎖DNAのうち、センス鎖側領域又はアンチセンス鎖側領域に対して欠失、置換、挿入又は付加された塩基の位置と、一本鎖核酸がアニーリングする位置との関係は特に限定されるものではないが、一本鎖核酸は、一本鎖DNAのうち、センス鎖側領域又はアンチセンス鎖側領域に対して欠失、置換、挿入又は付加された塩基のいずれをも含まない部分の塩基配列と相補的な塩基配列を含み、一本鎖DNAのうち、センス鎖側領域又はアンチセンス鎖側領域に対して欠失、置換、挿入又は付加された塩基のいずれをも含まない部分にアニーリングしていることが好ましい。一本鎖DNAのうち、センス鎖側領域又はアンチセンス鎖側領域に対して欠失、置換、挿入又は付加された塩基の位置と、一本鎖核酸がアニーリングする位置とが異なる核酸構築

物によれば、標的領域への変異導入効率を向上させることができる。

[0037] 例えば、一本鎖核酸が、一本鎖DNAのうち、センス鎖側領域又はアンチセンス鎖側領域に対して欠失、置換、挿入又は付加された塩基のいずれよりも5'側又は3'側に位置する部分にアニーリングした核酸構築物においては、一本鎖核酸が、一本鎖DNAのうち、センス鎖側領域又はアンチセンス鎖側領域に対して欠失、置換、挿入又は付加された塩基のいずれをも含まない部分にアニーリングしているので、このような核酸構築物によれば、標的領域への変異導入効率を向上させることができる。特に、一本鎖核酸が、一本鎖DNAのうち、センス鎖側領域又はアンチセンス鎖側領域に対して欠失、置換、挿入又は付加された塩基のいずれよりも3'側に位置する部分にアニーリングした核酸構築物によれば、標的領域への変異導入効率を向上させることができる。

[0038] また、一本鎖核酸が、一本鎖DNAの5'末端側部分又は3'末端側部分にアニーリングしている核酸構築物においては、センス鎖側領域又はアンチセンス鎖側領域に対して欠失、置換、挿入又は付加されたいずれの塩基も、一本鎖DNAの5'末端側部分又は3'末端側部分に存在しなければ、一本鎖核酸が、一本鎖DNAのうち、センス鎖側領域又はアンチセンス鎖側領域に対して欠失、置換、挿入又は付加された塩基のいずれをも含まない部分にアニーリングすることとなるので、このような核酸構築物によれば、標的領域への変異導入効率を向上させることができる。

[0039] 一本鎖核酸に含まれる一本鎖DNAの一部の塩基配列と相補的な塩基配列の塩基数は、通常15～100、好ましくは20～70、さらに好ましくは20～50である。

[0040] 一本鎖核酸は、一本鎖DNAの一部の塩基配列と相補的な塩基配列のみからなってもよいし、当該塩基配列の5'末端及び／又は3'末端に任意の塩基配列が付加された塩基配列からなってもよい。一本鎖核酸が、一本鎖DNAの一部の塩基配列と相補的な塩基配列の5'末端及び／又は3'末端に任意の塩基配列が付加された塩基配列からなる場合、一本鎖核酸のうち、一本鎖DNAの一部の塩基配列と相補的な塩基配列からなる部分が一本鎖DNAの対応部分にアニーリングする。一本鎖核酸が、一本鎖DNAの一部の塩基配列と相補的な塩基配列の5'末端及び／又は3'末端に任意の塩基配列が付加された塩基配列からなる場合、一本鎖核酸の塩基配列

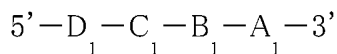
の塩基数は通常25～130、好ましくは25～100、さらに好ましくは25～80である。

[0041] 一本鎖核酸が一本鎖DNAの一部の塩基配列と相補的な塩基配列からなる場合の、本発明の核酸構築物の一実施形態を図1(a)及び(b)に示す。

[0042] 図1(a)に示すように、核酸構築物 10aは、一本鎖DNA 20と、一本鎖DNA 20の5'末端側部分21と相補的な塩基配列からなり、一本鎖DNA 20の5'末端側部分21にアニーリングした一本鎖核酸 30aとを有する。

[0043] 図1(b)に示すように、核酸構築物 10bは、一本鎖DNA 20と、一本鎖DNA20の3'末端側部分 22と相補的な塩基配列からなり、一本鎖DNA 20の3'末端側部分 22にアニーリングした一本鎖核酸 30bとを有する。

[0044] 一本鎖DNAの一部の塩基配列と相補的な塩基配列の3'末端に任意の塩基配列が付加された塩基配列からなる一本鎖核酸としては、例えば、次式(I)：



で表される塩基配列からなり、 A_1 で表される塩基配列からなる部分が、 C_1 で表される塩基配列からなる部分にアニーリングし、ヘアピン構造を形成している一本鎖核酸が挙げられる。

[0045] 式(I)において、 A_1 は、2個以上の塩基からなる任意の塩基配列を表す。 A_1 で表される塩基配列の塩基数の上限値は特に限定されるものではないが、通常30、好ましくは20、さらに好ましくは10である。 A_1 で表される塩基配列は特に限定されるものではないが、CG含有率が高い塩基配列であることが好ましい。 A_1 で表される塩基配列におけるCG含有率は通常70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上である。

[0046] 式(I)において、 B_1 は、 A_1 で表される塩基配列と相補的な塩基配列を含まない、3個以上の塩基からなる任意の塩基配列を表す。 B_1 で表される塩基配列の塩基数の上限値は特に限定されるものではないが、通常10、好ましくは7、さらに好ましくは5である。 B_1 で表される塩基配列は、 A_1 で表される塩基配列と相補的な塩基配列を含まない限り特に限定されるものではないが、熱的に安定なループを形成可能な塩基配列、例えば、一本鎖核酸がDNAである場合にはgaa、gxya、gxay(x及びyは任意の塩基を表す。)等であることが好ましい。

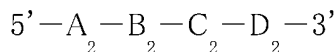
[0047] 式(I)において、 C_1 は、 A_1 で表される塩基配列と相補的な塩基配列を表す。

式(I)において、 D_1 は、一本鎖DNAの5'末端側部分の塩基配列と相補的な塩基配列を表す。 D_1 で表される塩基配列の塩基数は、通常15～100、好ましくは20～70、さらに好ましくは20～50である。

[0048] 一本鎖核酸が式(I)で表される塩基配列からなる場合の、本発明の核酸構築物の一実施形態を図1(c)に示す。

[0049] 図1(c)に示すように、核酸構築物 10cは、一本鎖DNA 20と、一本鎖DNA 20にアニーリングした、式(I)で表される塩基配列からなる一本鎖核酸 30cと有し、一本鎖核酸 30cのうち、 D_2 で表される塩基配列からなる部分が、一本鎖DNA 20の5'末端側部分23にアニーリングしており、 A_1 で表される塩基配列からなる部分が、 C_1 で表される塩基配列からなる部分にアニーリングし、ヘアピン構造を形成している。

[0050] 一本鎖DNAの一部の塩基配列と相補的な塩基配列の5'末端に任意の塩基配列が付加された塩基配列からなる一本鎖核酸としては、例えば、次式(II)：



で表される塩基配列からなり、 A_2 で表される塩基配列からなる部分が、 C_2 で表される塩基配列からなる部分にアニーリングし、ヘアピン構造を形成している一本鎖核酸が挙げられる。

[0051] 式(II)において、 A_2 は、2個以上の塩基からなる任意の塩基配列を表す。 A_2 で表される塩基配列の塩基数の上限値は特に限定されるものではないが、通常30、好ましくは20、さらに好ましくは10である。 A_2 で表される塩基配列は特に限定されるものではないが、CG含有率が高い塩基配列であることが好ましい。 A_2 で表される塩基配列におけるCG含有率は通常70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上である。

[0052] 式(II)において、 B_2 は、 A_2 で表される塩基配列と相補的な塩基配列を含まない、3個以上の塩基からなる任意の塩基配列を表す。 B_2 で表される塩基配列の塩基数の上限値は特に限定されるものではないが、通常10、好ましくは7、さらに好ましくは5である。 B_2 で表される塩基配列は、 A_2 で表される塩基配列と相補的な塩基配列を含まない限り特に限定されるものではないが、熱的に安定なループを形成可能な塩基配

列、例えば、一本鎖核酸がDNAである場合にはgaa、gxya、gxay (x及びyは任意の塩基を表す。)等であることが好ましい。

[0053] 式(II)において、 C_2 は、 A_2 で表される塩基配列と相補的な塩基配列を表す。

式(II)において、 D_2 は、一本鎖DNAの3'末端側部分の塩基配列と相補的な塩基配列を表す。 D_2 で表される塩基配列の塩基数は、通常15～100、好ましくは20～70、さらに好ましくは20～50である。

[0054] 一本鎖核酸が式(II)で表される塩基配列からなる場合の、本発明の核酸構築物の一実施形態を図1(d)に示す。

[0055] 図1(d)に示すように、核酸構築物 10dは、一本鎖DNA 20と、式(II)で表される塩基配列からなる一本鎖核酸 30dと有し、一本鎖核酸30dのうち、 D_2 で表される塩基配列からなる部分は、一本鎖DNA 20の3'末端側部分 24にアニーリングしており、 A_2 で表される塩基配列からなる部分が、 C_2 で表される塩基配列からなる部分にアニーリングし、ヘアピン構造を形成している。

[0056] 本発明の核酸構築物において、一本鎖DNAにアニーリングしている一本鎖核酸の数は特に限定されるものではなく、単数であってもよいし、複数であってもよい。一本鎖DNAに複数の一本鎖核酸がアニーリングしている場合、複数の一本鎖核酸はそれぞれ、一本鎖DNAの異なる部分の塩基配列と相補的な塩基配列を含み、一本鎖DNAの異なる部分にアニーリングしている。一本鎖DNAに複数の一本鎖核酸がアニーリングしている場合、一本鎖DNAのうち、ある一本鎖核酸がアニーリングする領域と、他の一本鎖核酸がアニーリングする領域とが連続していてもよいし、不連続であってもよい。

[0057] 一本鎖DNAに2つの一本鎖核酸がアニーリングしている場合の、本発明の核酸構築物の一実施形態を示す模式図を図1(e)及び(f)に示す。

[0058] 図1(e)に示すように、核酸構築物 10eは、一本鎖DNA 20と、一本鎖DNA 20の5'末端側部分25と相補的な塩基配列からなり、一本鎖DNAの5'末端側部分25にアニーリングした一本鎖核酸 30eと、一本鎖DNA20の5'末端側部分25に隣接する部分 26と相補的な塩基配列からなり、一本鎖DNAの部分 26にアニーリングした一本鎖核酸 31eとを有する。なお、一本鎖DNAのうち、5'末端側部分 25と、5'末端側部分 25

に隣接する部分 26とは連続している。

- [0059] 図1(f)に示すように、核酸構築物 10fは、一本鎖DNA 20と、一本鎖DNA 20の5'末端側部分27と相補的な塩基配列からなり、一本鎖DNAの5'末端側部分27にアニーリングした一本鎖核酸30fと、一本鎖DNA 20の5'末端側部分 27の近傍に位置する部分 28と相補的な塩基配列からなり、一本鎖DNAの部分 28にアニーリングした一本鎖核酸 31fとを有する。なお、一本鎖DNAのうち、5'末端側部分 27と、5'末端側部分 27の近傍に位置する部分 28とは不連続である。
- [0060] 一本鎖DNA及び一本鎖核酸は、公知の化学合成法を用いて作製することができる。この際、短鎖(例えば100塩基長程度)のものを複数合成し、それらを公知のライゲーション法により連結し、目的の塩基長の一本鎖DNA及び一本鎖核酸を作製することができる。また、一本鎖DNAは、標的領域を有する二本鎖DNAを鋳型とした変異導入型PCR、市販の変異導入キット等により調製したファージ又はファージミドDNAを制限酵素処理することにより作製することができる。
- [0061] 本発明の治療剤は、細胞内の二本鎖DNAに存在する標的領域のうち、センス鎖側領域又はアンチセンス鎖側領域に含まれる異常塩基配列が原因となる疾患の治療剤であって、本発明の核酸構築物を含む治療剤である。
- [0062] 本発明の治療剤は、核酸構築物を細胞内に導入可能な形態で含むことが好ましい。細胞内に導入可能な形態としては、適当な溶媒(例えば水)に分散させた形態、中空ナノ粒子、リポソーム等の内部に封入した形態、カチオン性ポリマーとの複合体等が挙げられる。
- [0063] 本発明の方法は、細胞内の二本鎖DNAに存在する標的領域の塩基配列に変異を導入する方法であって、細胞内に本発明の核酸構築物を導入する工程を含む方法である。
- [0064] 細胞は、生物個体を構成していない細胞又は生物個体を構成している細胞のいずれであってもよい。細胞は真核細胞又は原核細胞のいずれであってもよく、細胞が由来する生物種は特に限定されるものではない。細胞が由来する生物種としては、例えば、哺乳類、鳥類、昆虫類等の動物、植物、微生物等のいずれであってもよいが、動物であることが好ましく、哺乳類であることがさらに好ましい。哺乳類としては、例え

ば、ヒト、サル、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ブタ、ウサギ、イヌ、ネコ、ラット、マウス、モルモット等が挙げられる。微生物は、原核微生物及び真核微生物のいずれであってもよく、原核微生物としては、例えば、グラム陽性菌(例えば、Micrococcus属、Staphylococcus属、Bacillus属、Clostridium属、Lactobacillus属、Corynebacterium属、Streptomyces属等)、グラム陰性菌(例えば、Rhodopseudomonas属、Pseudomonas属、Escherichia属、Salmonella属、Nitrobacter属、Thiobacillus属、Neisseria属等)等の細菌類が挙げられ、真核微生物としては、例えば、糸状菌(カビ類)、酵母等の真菌類が挙げられる。

[0065] 細胞の種類は特に限定されるものではなく、例えば、体細胞、生殖細胞、幹細胞、又はこれらの培養細胞等が挙げられる。体細胞の具体例としては、脳、脊髄等の神経系組織;網膜細胞、嗅細胞等の感覚器;食道、胃、小腸、大腸等の消化器;肺、気管支等の呼吸器;精巣、卵巣、子宮、胎盤等の生殖器;腎臓、膀胱等の泌尿器;骨髓細胞、血球細胞等の造血器;骨格筋、平滑筋、心筋等の筋組織;骨芽細胞、破骨細胞等の骨組織;皮膚、毛根細胞等の皮膚組織等の各種組織・器官から分離された生細胞又はその培養細胞等が挙げられ、生殖細胞の具体例としては、卵、精子又はその培養細胞等が挙げられ、幹細胞の具体例としては、胚性幹細胞(ES細胞)、胚性生殖細胞(EG細胞)、栄養膜幹細胞(TS細胞)、骨髓幹細胞、神経幹細胞等が挙げられる。

[0066] 本発明の核酸構築物の細胞内への導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法等を使用することができる。

[0067] 細胞内に本発明の核酸構築物が導入されると、細胞内の二本鎖DNAに存在する標的領域のうちセンス鎖側領域又はアンチセンス鎖側領域が本発明の核酸構築物に含まれる一本鎖DNAで相同置換されたのと同様の変異(1又は複数個の塩基の欠失、置換、挿入又は付加)が、センス鎖側領域又はアンチセンス鎖側領域のうち一方の領域に導入され、他方の領域も一方の領域と相補的となるように修正され、その結果、センス鎖側領域及びアンチセンス鎖側領域の両方に変異が導入される。

[0068] 標的領域に疾患に原因となる異常塩基配列が含まれる場合、異常塩基配列に変

異を導入し、正常塩基配列に変換することにより、異常塩基配列が原因となる疾患を治療することができる。

[0069] 標的領域に変異が導入された細胞及び該細胞を保有する生物個体は、特定の化合物等に対する感受性が正常型とは異なるスクリーニング系、疾患モデル等として有用である。

[0070] 本発明の核酸構築物を保有する生物個体は、生物個体を構成する細胞内に本発明の核酸構築物が導入された生物個体であってもよいし、本発明の核酸構築物が導入された細胞を移植された生物個体であってもよい。

実施例

[0071] 1. 方法

(1) プラスミドの作製

pHygEGFP (CLONTECH Laboratories社製) のKpnI-Sall断片を、pALTER-1 (Promega社製) の同じ制限酵素部位へ導入したpALHEに対し、Altered Sites II in vitro Mutagenesis System (Promega社製) を用いて部位特異的変異導入反応を行った。なお、HygEGFPはハイグロマイシン耐性遺伝子(Hyg)と緑色蛍光タンパク質(EGFP)遺伝子との融合遺伝子である。

[0072] 一回目の反応では、オリゴヌクレオチドXho (5'-cggcacctcgagcacgcggat:配列番号1)を用いてXhoI部位を導入し、pALHEXを作製した。このとき、正常HygEGFP遺伝子のコドン195はValからGluへ変化するが、遺伝子修復反応の定量には影響しなかった。

[0073] 二回目の反応では、オリゴヌクレオチドSilent (5'-gcgaagaatcacgtgctttca-3':配列番号2)を用いて正常HygEGFP遺伝子のコドン34に遺伝子マーカーとなるPmaCI部位を導入し、pALHEXPを作製した。さらに、pALHEXPに対し、オリゴヌクレオチドOpal (5'-ggcgaagaatgacgtgctttc-3':配列番号3)を用いて、正常HygEGFP遺伝子のコドン34にopal変異を導入し、pALHEXBを作製した。最後の反応では、opal変異と同時に、先ほど導入されたPmaCI部位が除去され、代わりに変異型HygEGFP遺伝子のマーカーとしてBmgBI部位が導入される。

それぞれのプラスミドに含まれるHygEGFP遺伝子の配列はシークエンス反応によっ

て確認した。

- [0074] pALHEXP及びpALHEXBから精製したBamHI-Sall断片を、NXBリンカー (Upper: 5'-catggcgatcctcga-3': 配列番号4, Lower: 5'-gatctcgaggatcgc-3': 配列番号5) を用いて、pTriEx-3Neo (Novagen社製) のCMVプロモーター及びT7プロモーターの下流に存在するNcoI-XhoI部位へ導入し、pTENHES及びpTENHEXを作製した。pTENHES及びpTENHEXは、大腸菌及び哺乳動物の細胞内でそれぞれ正常型及び変異型HygEGFP遺伝子を発現することができることが確認された。これらのプラスミドを大腸菌DH-5 α 株に導入し、Endofree Mega Kit (QIAGEN社製) を用いて精製した。

- [0075] (2) ファージミドの作製

pTENHESのXhoI断片をpBluescript II SK+ (Stratagene社製) のXhoI部位に導入することにより、ファージミドpBSHES/AntiSense及びpBSHES/Senseを作製した。pBSHES/AntiSense及びpBSHES/Senseにおいて、XhoI断片は、pBluescript II SK+のfl oriに対して逆の向きに挿入され、pBSHES/AntiSense及びpBSHES/Senseから得られる一本鎖環状DNAは、それぞれ正常型HygEGFP遺伝子のアンチセンス鎖及びセンス鎖を含んでいる。それぞれの挿入方向は制限酵素NaeI及びPmaCIによって確認した。ファージミドを大腸菌JM105株に導入し、2 $\times$ YT培地 (50 μ g/mLアンピシリン(Amp)含有) で一晩培養した後、5mLを500mLの2 $\times$ YT培地 (50 μ g/mL Amp含有) に移し、激しく攪拌しながら37 $^{\circ}$ Cで培養した。1時間後に25 μ g/mLとなるようにカナマイシンを加え、再び培養を続け、23時間後、遠心分離 (2.15 $\times 10^3$ g, 15分) によってファージミドを大腸菌と分離した。上清に含まれるファージミドに、75mLの20%PEG6000/2.5M NaCl溶液を加え、4 $^{\circ}$ Cで一晩静置した。遠心分離 (18.8 $\times 10^3$ g, 20分) により、ファージミドを沈殿させた後、20mLの0.3M AcONa/1mM EDTAに懸濁し、フェノール、フェノール/クロロホルム (1/1)、クロロホルムを用いて、環状一本鎖DNAを回収した。DNA溶液に25mL EtOHを加え、室温で15分間静置した後、遠心分離によって沈殿させ、500 μ Lの水に溶解した。

- [0076] (3) フラグメント1の調製

pBSHES/Senseから得られた環状一本鎖DNA 1pmol (1.1 μ g) を、5UのXhoIで消化し、606ntの断片を3.5% 低融点アガロースゲルで分離した後、フェノール・クロロフォ

ルム抽出によって回収した。環状一本鎖DNAの制限酵素処理において、XhoI部位周辺を二本鎖とするため、pBSHES/Senseの5'及び3'側のXhoI部位に相補的なオリゴヌクレオチドS5' (5'-ccccctcgaggtgccg-3':配列番号6) 及びS3' (5'-ggggctctcgaggcgac-3':配列番号7)を、環状一本鎖DNAに対して5モル当量加えた。

[0077] 回収した断片は、ゲルろ過 (NAP5カラム, Amersham Biosciences社製) で精製し、 A_{260}/A_{280} が1.8以上であることを確認した。DNA量は、 OD_{260} 1.0あたり一本鎖DNA 40 μ gとして算出した。

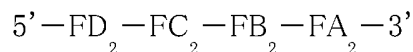
こうして調製されたセンス配列からなる一本鎖DNA (フラグメント1) の塩基配列を配列番号8に示す。なお、フラグメント1のうち、標的領域へ変異を導入するための塩基 (以下「変異導入塩基」という。) は、配列番号8のうち126～128番目の塩基 (tca) である。

[0078] (4) フラグメント2～6の調製

フラグメント1の5'末端部分と相補的な塩基配列からなるフラグメント2 (配列番号9)、フラグメント1の3'末端部分と相補的な塩基配列からなるフラグメント3 (配列番号10)、及びフラグメント1のうち変異導入塩基よりも3'側に位置する部分 (配列番号8のうち286～320番目の塩基からなる塩基配列部分) と相補的な塩基配列からなるフラグメント6 (配列番号16) を化学合成により作製した。化学合成はSigma Genosys Japanに委託した。

[0079] フラグメント1の5'末端部分と相補的な塩基配列を含むフラグメント4 (配列番号11)、及びフラグメント1の3'末端部分と相補的な塩基配列を含むフラグメント5 (配列番号12) を化学合成により作製した。化学合成は北海道システムサイエンスに委託した。

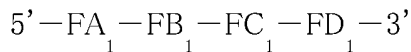
[0080] なお、フラグメント4は、次式:



[式中、 FD_2 はggcggtccgggatctcga (フラグメント1の5'末端側部分の塩基配列と相補的な塩基配列) であり、 FC_2 はgcであり、 FB_2 はgaaaであり、 FA_2 はgcである。]

で表される塩基配列からなり、 FA_2 部分が FC_2 部分にアニーリングし、ヘアピン構造を形成することができる。

[0081] フラグメント5は、次式:



[式中、FA₁ はgcであり、FB₁ はgaaaであり、FC₁ はgcであり、FD₁ はgggtgccggacttcggggcagg (フラグメント1の3'末端側部分の塩基配列と相補的な塩基配列) である。]

で表される塩基配列からなり、FA₁ 部分がFC₁ 部分にアニーリングし、ヘアピン構造を形成することができる。

[0082] (5) 核酸構築物の作製

10pmolのフラグメント1に対し、アニーリング効率を考慮して10倍量(100pmol)の各フラグメントを、20 μLのTE緩衝液中で混合した。95°Cで5分間加熱してDNAを変性させた後、氷中で5分間急冷した。さらに80°Cで5分間加熱した後、徐冷することによってフラグメント1と各フラグメントとをアニーリングさせた。

[0083] (6) 核酸構築物の導入

核酸構築物の導入反応の前日に、4mLの10% FBSを含むD'MEM/F12 (Invitrogen社製) 中に懸濁した 3×10^5 個のCHO-K1細胞を6cmディッシュに播き、37°C、5% CO₂ 雰囲気下において培養した。フラグメント1又は各核酸構築物(それぞれ10pmolのフラグメント1を含む)をpTENHEX (25 fmol, 125 ng) とともに、リポフェクトアミン試薬 (Invitrogen) を用いて、CHO-K1細胞へ導入した。各核酸構築物を細胞へ導入するにあたり、フラグメント1には1 μgのpALHEX-Ex2 (Promega社製) を加え、すべてのサンプルのDNA量が4 μgとなるように調整した。

[0084] 導入反応後、48時間培養した細胞をトリプシン処理し、1mL PBSで洗浄した後、遠心分離により細胞を集めた。これを100 μLのTEG (25mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 50mM Glc, pH8.0) に懸濁し、200 μLの0.2N NaOH/1% SDSを加え、穏やかに攪拌した後、室温で5分間放置した。さらに150 μLの8M AcONH₄を加え、4°Cで15分間冷却した。遠心分離後、isoPrOH沈殿によって、上清からプラスミドDNAを回収した。プラスミドDNAは20 μLの水に溶解し、使用するまで-20°Cで保存した。

[0085] (7) 遺伝子修復効率の定量

回収したプラスミドDNAを、エレクトロポレーション法を用いて大腸菌DH-5 α 株に導入した。エレクトロポレーション法は、Gene Pulser II (Bio-Rad laboratories社製) を用いて、4°C、1.8kV、25 μF、200 Ω の条件で行った。プラスミドDNAを導入した大腸菌

DH-5 α 株は、1mLのSOC培地で1時間培養した後、50 μ g/mL Amp添加LB培地で希釈し、一晚培養した。このとき大腸菌DH-5 α 株の一部をとり、LB寒天培地に播き、コロニー数によってエレクトロポレーション効率を測定したが、大きな違いは観察されなかった。翌日、大腸菌DH-5 α 株を遠心分離によって回収し、100 μ LのTEGに際懸濁した。これに200 μ Lの0.2N NaOH/1% SDSを加え、穏やかに攪拌した後、さらに150 μ L Sol III (3M 酢酸カリウム、11.5% 酢酸)を加え、氷上に5分間放置した。遠心分離した上清をフェノール/クロロフォルム(1/1)で処理し、エタノール沈殿によりプラスミドDNAを回収した。これを20 μ Lの水に溶解し、このうち1~2 μ Lを大腸菌BL21 (DE3)株へエレクトロポレーション法を用いて導入した。このとき、大腸菌DH-5 α 株と同様の操作によって、大腸菌BL21(DE)株への形質転換を行った。形質転換後、1mLのSOC培地を加え、37°Cで1時間培養した後、50 μ Lをとり50 μ g/mL Amp及び10 μ M IPTGを含む1mLのLB培地を用いて、37°Cで3時間培養した。培養後、培地の一部を10-100倍希釈したものを75 μ g/mL ハイグロマイシンB添加LB寒天培地 (Hyg75:50 μ g/mL Amp、10 μ M IPTG)へ、100-1000希釈したものをハイグロマイシンBを含まないLB寒天培地 (Hyg0:50 μ g/mL Amp、10 μ M IPTG)へ、それぞれ等量ずつ播き、37°Cでインキュベートした。12-24時間後、Hyg0に生えたコロニー数をカウントした。また、36-48時間後にHyg75に生えたコロニーを、FLA2000G (FUJI PHOTO FILM社製)を用いて解析し、EGFPの蛍光 (Ex. 473nm, Em. 520nm)を発するコロニー数をカウントした。Hyg0のコロニー数を分母に、Hyg75のEGFP蛍光陽性コロニー数を分子として、遺伝子修復効率を算出した。

- [0086] なお、pTENHEXの構成を図2に示し、pTENHEXに含まれる変異型HygEGFP遺伝子の塩基配列及びそれにコードされるアミノ酸配列を配列番号13に示す。配列番号13に示す塩基配列のうち1~36番目の塩基からなる塩基配列は、pTENHEXに変異型HygEGFP遺伝子を導入する際に付加された塩基配列であり、変異型HygEGFP遺伝子の塩基配列は実際には37番目の塩基から始まる。正常型HygEGFP遺伝子のコドン34はtcaでありSerをコードしているが、変異型HygEGFP遺伝子のコドン34には終止変異(TGA)が導入されているため、HygEGFP遺伝子を正常に発現することができない。本実験においては、pTENHEXに含まれる変異型HygEGFP遺伝子のコドン34

が正常型 (tca) に修復されたことを、ハイグロマイシン耐性及びEGFPの蛍光発色という2種類の表現型によって確認した。

[0087] 2. 結果

図3は、フラグメント1単独 (図中「Tailed-Duplex 1」)、フラグメント1とフラグメント1にアニーリングしたフラグメント2からなる核酸構築物S1 (図中「Tailed-Duplex 2」)、フラグメント1とフラグメント1にアニーリングしたフラグメント3からなる核酸構築物S2 (図中「Tailed-Duplex 3」)、及びフラグメント1とフラグメント1にアニーリングしたフラグメント6からなる核酸構築物S5 (図中「Tailed-Duplex 6」)を用いた場合の、pTENHEXに含まれる変異型HygEGFP遺伝子の修復効率を示す。

[0088] 図3に示すように、核酸構築物S1、S2及びS5は、フラグメント1単独に対し、それぞれ1.3倍、1.8倍及び1.8倍高い修復効率を示した (核酸構築物S1の修復効率 2.6%、核酸構築物S2の修復効率 3.7%、核酸構築物S5の修復効率 3.7%)。また、核酸構築物S1の修復効率に対し、核酸構築物S2及びS5の修復効率は有意に高かった。

[0089] 図4は、フラグメント1単独 (図中「Looped-Duplex 1」)、フラグメント1とフラグメント1にアニーリングしたフラグメント4からなる核酸構築物S3 (図中「Looped-Duplex 4」)、及びフラグメント1とフラグメント1にアニーリングしたフラグメント5からなる核酸構築物S4 (図中「Looped-Duplex 5」)を用いた場合の、pTENHEXに含まれる変異型HygEGFP遺伝子の修復効率を示す。

[0090] 図4に示すように、核酸構築物S3及びS4は、フラグメント1単独に対し、それぞれ1.4倍及び1.9倍高い修復効率を示した (核酸構築物S3の修復効率 2.7%、核酸構築物S4の修復効率 3.7%)。また、核酸構築物S3の修復効率に対し、核酸構築物S4は有意ではないものの高い修復効率を示した。フラグメント4及び5がヘアピン構造を形成する核酸構築物S3及びS4が、より安定な35塩基対の二本鎖を形成する核酸構築物S1及びS2と同等の遺伝子修復効率を示したことから、末端のループ化によるDNA断片のエキソヌクレアーゼからの保護は非常に重要な意味を持つことが推測される。したがって、フラグメント2～5の代わりに、細胞内のヌクレアーゼに抵抗性を持ち、なおかつDNAと効率よくアニーリングできる2'-O-Me-RNA、PNA等の核酸アナログ

を用いることによって、遺伝子修復効率がさらに向上することが期待できる。

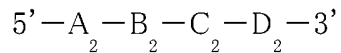
- [0091] なお、pTENHEXに対して、PCR産物を用いた従来のSFHR法により、変異型HygEGFP遺伝子を修復した結果、変換効率は0.16%であった。PCR産物は、プライマー1 (5'-gagatccccggagccg -3':配列番号14) 及びプライマー2 (5'-gaggtgccggacttcgg -3':配列番号15) とTaqポリメラーゼ (Tokyobo社製) を用いて増幅し、3'末端をBlunting High Kit (Tokyobo社製) により平滑末端化し、3.5% 低融点アガロース電気泳動により精製した。

請求の範囲

- [1] 細胞内の二本鎖DNAに存在する標的領域のうちセンス鎖側領域又はアンチセンス鎖側領域の塩基配列において、1又は複数個の塩基が欠失、置換、挿入又は付加された塩基配列からなり、前記センス鎖側領域又は前記アンチセンス鎖側領域の塩基配列との相同性が90%以上である一本鎖DNAと、
- 前記一本鎖DNAの一部の塩基配列と相補的な塩基配列を含み、前記一本鎖DNAにアニーリングした一本鎖核酸とを有する核酸構築物。
- [2] 前記一本鎖DNAの塩基数が300～3000であり、前記一本鎖核酸の塩基数が15～100である請求項1記載の核酸構築物。
- [3] 前記一本鎖核酸が、前記一本鎖DNAのうち、前記センス鎖側領域又は前記アンチセンス鎖側領域に対して欠失、置換、挿入又は付加された前記塩基のいずれをも含まない部分の塩基配列と相補的な塩基配列を含み、前記一本鎖DNAのうち、前記センス鎖側領域又は前記アンチセンス鎖側領域に対して欠失、置換、挿入又は付加された前記塩基のいずれをも含まない部分にアニーリングした請求項1又は2記載の核酸構築物。
- [4] 前記一本鎖核酸が、前記一本鎖DNAのうち、前記センス鎖側領域又は前記アンチセンス鎖側領域に対して欠失、置換、挿入又は付加された前記塩基のいずれよりも5'側又は3'側に位置する部分にアニーリングした請求項3記載の核酸構築物。
- [5] 前記一本鎖核酸が、前記一本鎖DNAの5'末端側部分又は3'末端側部分の塩基配列と相補的な塩基配列を含み、前記一本鎖DNAの5'末端側部分又は3'末端側部分にアニーリングした請求項1～4のいずれかに記載の核酸構築物。
- [6] 前記一本鎖核酸が、次式(I)：
- $$5' - D_1 - C_1 - B_1 - A_1 - 3'$$
- [式中、 A_1 は、2個以上の任意の塩基からなる塩基配列を表し、 B_1 は、 A_1 で表される塩基配列と相補的な塩基配列を含まない、3個以上の任意の塩基からなる塩基配列を表し、 C_1 は、 A_1 で表される塩基配列と相補的な塩基配列を表し、 D_1 は、前記一本鎖DNAの5'末端側部分の塩基配列と相補的な塩基配列を表す。]
- で表される塩基配列からなり、 A_1 で表される塩基配列からなる部分が、 C_1 で表される

塩基配列からなる部分にアニーリングし、ヘアピン構造を形成している請求項5記載の核酸構築物。

- [7] 前記一本鎖核酸が、次式(II)：



[式中、 A_2 は、2個以上の任意の塩基からなる塩基配列を表し、 B_2 は、 A_2 で表される塩基配列と相補的な塩基配列を含まない、3個以上の任意の塩基からなる塩基配列を表し、 C_2 は、 A_2 で表される塩基配列と相補的な塩基配列を表し、 D_2 は、前記一本鎖DNAの3'末端側部分の塩基配列と相補的な塩基配列を表す。]

で表される塩基配列からなり、 A_2 で表される塩基配列からなる部分が、 C_2 で表される塩基配列からなる部分にアニーリングし、ヘアピン構造を形成している請求項5記載の核酸構築物。

- [8] 前記センス鎖側領域又は前記アンチセンス鎖側領域に対して欠失、置換、挿入又は付加された前記塩基のいずれもが、前記一本鎖DNAの5'末端側部分又は3'末端側部分に存在しない請求項5～7のいずれかに記載の核酸構築物。

- [9] 前記一本鎖DNAにアニーリングした複数の一本鎖核酸を有し、
前記複数の一本鎖核酸がそれぞれ前記一本鎖DNAの異なる部分の塩基配列と相補的な塩基配列を含む請求項1～8のいずれかに記載の核酸構築物。

- [10] 前記標的領域に疾患の原因となる異常塩基配列が含まれており、
前記一本鎖DNAが、前記標的領域のうちセンス鎖側領域又はアンチセンス鎖側領域の塩基配列において、前記異常塩基配列が正常塩基配列となるように、1又は複数の塩基が欠失、置換、挿入又は付加された塩基配列からなる請求項1～9のいずれかに記載の核酸構築物。

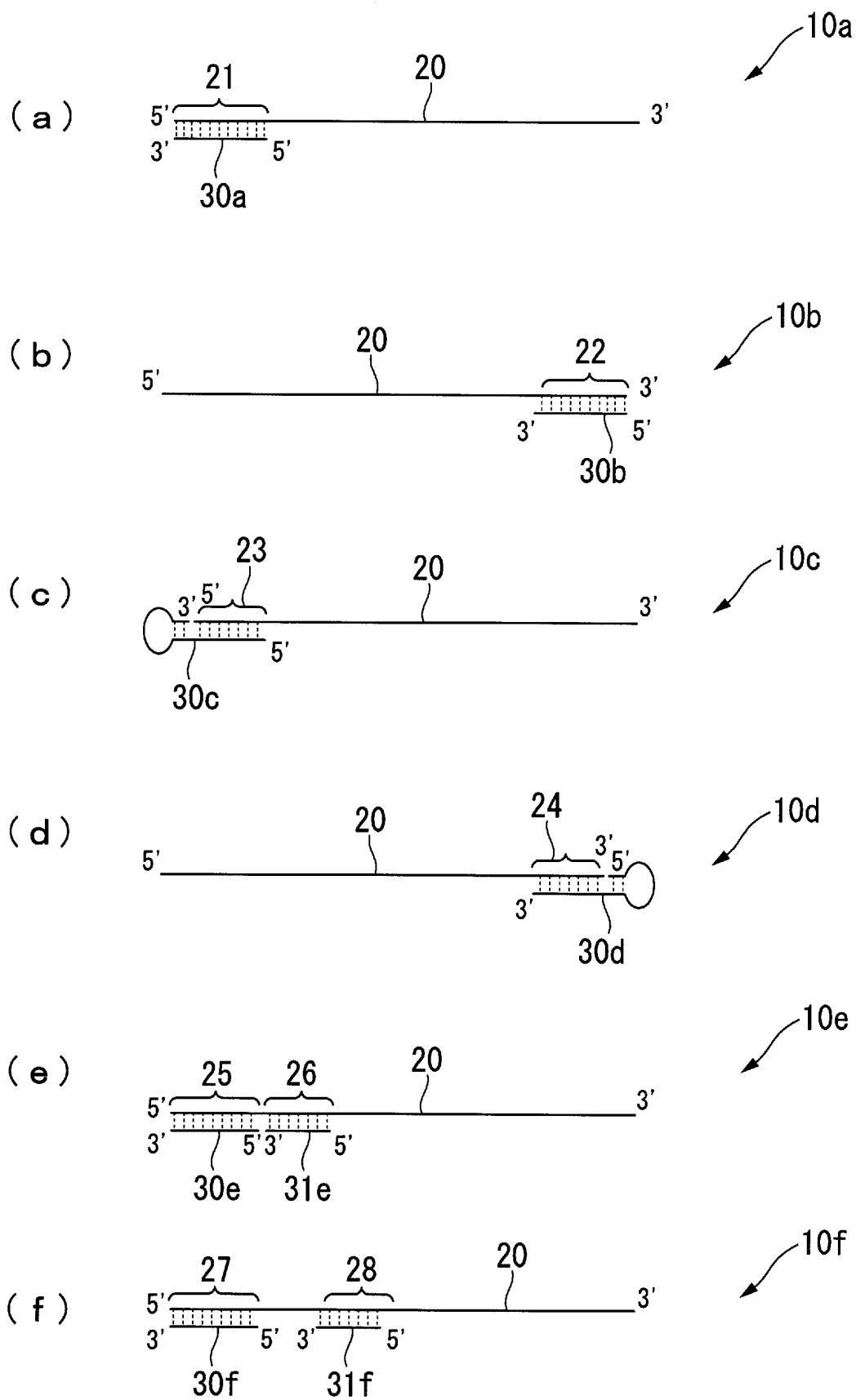
- [11] 細胞内の二本鎖DNAに存在する標的領域に含まれる異常塩基配列が原因となる疾患の治療剤であって、
請求項10記載の核酸構築物を含む治療剤。

- [12] 生物個体を構成していない細胞内又はヒト以外の生物個体を構成している細胞内の二本鎖DNAに存在する標的領域の塩基配列に変異を導入する方法であって、
前記細胞内に請求項1～10のいずれかに記載の核酸構築物を導入する工程を含

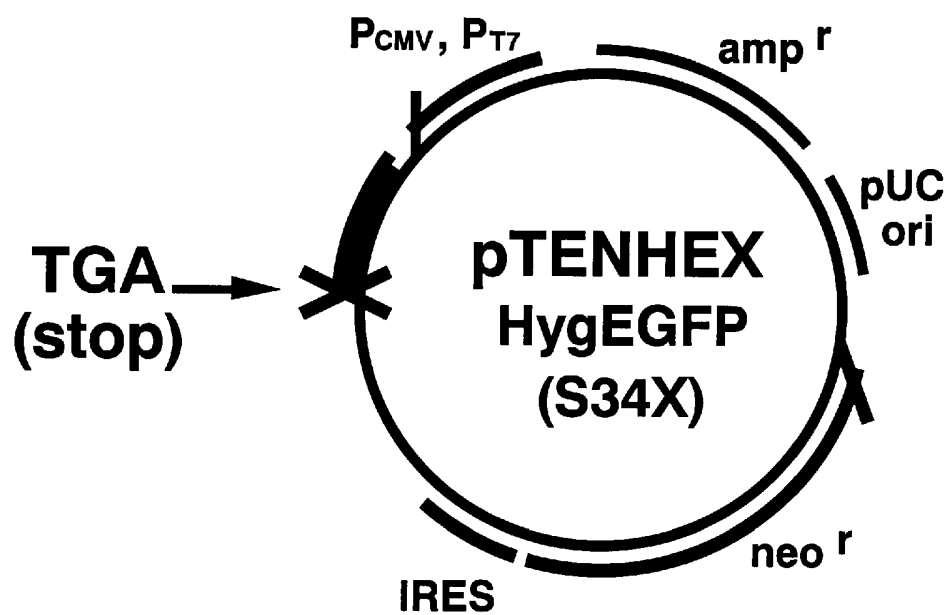
む方法。

- [13] 請求項1～10のいずれかに記載の核酸構築物が導入された細胞。
- [14] 請求項13記載の細胞を保有するヒト以外の生物個体。

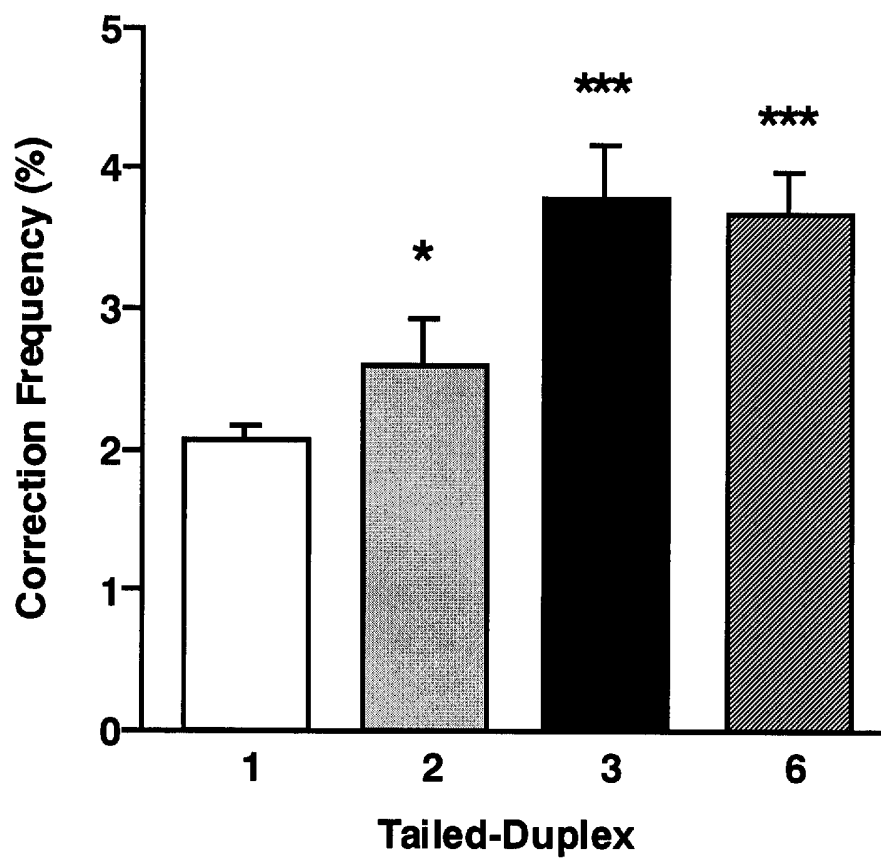
[図1]



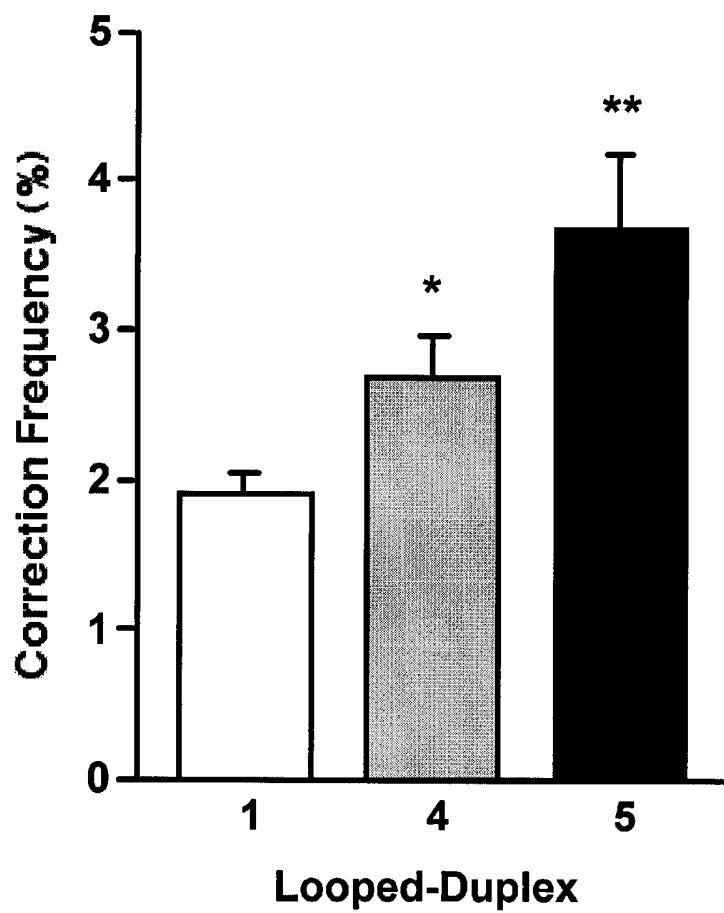
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/022890

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01), **A61K31/711**(2006.01), **A61K48/00**(2006.01), **A61P43/00**(2006.01), **C12N1/15**(2006.01), **C12N1/19**(2006.01), **C12N1/21**(2006.01), **C12N5/10**(2006.01)

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09(2006.01), **A61K31/711**(2006.01), **A61K48/00**(2006.01), **A61P43/00**(2006.01), **C12N1/15**(2006.01), **C12N1/19**(2006.01), **C12N1/21**(2006.01), **C12N5/10**(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>Y</u> <u>A</u>	Hiroyuki TSUCHIYA et al., "Phagemid Plasmid kara Chosei shita DNA Danpen ni yoru Idenshi Shufuku Koritsu no Kojo", Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan Program · Koen Yoshishu, 25 November, 2004 (25.11.04), Vol.27th, page 884, 3PA-367	<u>1-5, 8-14</u> 6, 7
<u>Y</u> <u>A</u>	MAZIN, A.V. et al., Tailed duplex DNA is the preferred substrate for Rad51 protein-mediated homologous pairing., EMBO.J. (2000), Vol.19, No.5, pages 1148 to 1156	<u>1-5, 8-14</u> 6, 7
A	LIANG, L. et al., Optimizing the delivery systems of chimeric RNA·DNA oligonucleotides. Beyond general oligonucleotide transfer., Eur.J.Biochem. (2002), Vol.269, pages 5753 to 5758	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent 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

24 February, 2006 (24.02.06)

Date of mailing of the international search report

07 March, 2006 (07.03.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/022890

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>P, Y</u> P, A	Hiroyuki TSUCHIYA et al., "Ipponsa DNA Danpen ni yoru Idenshi Shufuku Koritsu ni Eikyo o Ataeru Inshi.", Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan Koen Yoshishu, 25 November, 2005 (25.11.05), Vol.28th, page 755, 3P-1146	<u>1-5, 8-14</u> 6, 7
<u>P, Y</u> P, A	TSUCHIYA, H. et al., Increased SFHR gene correction efficiency with sense single-stranded DNA., J. Gene Med. (2005 Apr), Vol.7, No.4, pages 486 to 493	<u>1-5, 8-14</u> 6, 7
<u>P, Y</u> P, A	WO 2005/075657 A1 (Japan Science and Technology Agency), 18 August, 2005 (18.08.05), (Family: none)	<u>1-5, 8-14</u> 6, 7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01), A61K31/711(2006.01), A61K48/00(2006.01), A61P43/00(2006.01),
C12N1/15(2006.01), C12N1/19(2006.01), C12N1/21(2006.01), C12N5/10(2006.01)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01), A61K31/711(2006.01), A61K48/00(2006.01), A61P43/00(2006.01),
C12N1/15(2006.01), C12N1/19(2006.01), C12N1/21(2006.01), C12N5/10(2006.01)

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2006年
日本国実用新案登録公報	1996-2006年
日本国登録実用新案公報	1994-2006年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>Y</u> A	土谷博之, 外3名, フェージミド/プラスミドから調製した DNA 断片による遺伝子修復効率の向上., 日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 (2004. 11. 25), Vol.27th, p. 884, 3PA-367	<u>1-5, 8-14</u> 6, 7
<u>Y</u> A	MAZIN, A. V. et al., Tailed duplex DNA is the preferred substrate for Rad51 protein-mediated homologous pairing., EMBO J. (2000), Vol. 19, No. 5, p. 1148-1156	<u>1-5, 8-14</u> 6, 7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24.02.2006

国際調査報告の発送日

07.03.2006

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 晴絵

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4N

3335

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	LIANG, L. et al., Optimizing the delivery systems of chimeric RNA-DNA oligonucleotides. Beyond general oligonucleotide transfer., Eur. J. Biochem. (2002), Vol.269, p.5753-5758	1-14
<u>P Y</u> P A	土谷博之, 外 2 名, 一本鎖 DNA 断片による遺伝子修復効率に影響を与える因子., 日本分子生物学会年会講演要旨集 (2005.11.25), Vol.28th, p.755, 3P-1146	<u>1-5, 8-14</u> 6, 7
<u>P Y</u> P A	TSUCHIYA, H. et al., Increased SFHR gene correction efficiency with sense single-stranded DNA., J. Gene Med. (2005 Apr), Vol.7, No.4, p.486-493	<u>1-5, 8-14</u> 6, 7
<u>P Y</u> P A	WO 2005/075657 A1 (独立行政法人科学技術振興機構) 2005.08.18 (ファミリーなし)	<u>1-5, 8-14</u> 6, 7