

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成23年6月23日(2011.6.23)

【公表番号】特表2010-525826(P2010-525826A)

【公表日】平成22年7月29日(2010.7.29)

【年通号数】公開・登録公報2010-030

【出願番号】特願2010-506716(P2010-506716)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 31/713 (2006.01)

C 0 7 H 21/04 (2006.01)

A 6 1 K 9/10 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 15/00 G

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 31/713

C 0 7 H 21/04

A 6 1 K 9/10

A 6 1 P 35/00

【手続補正書】

【提出日】平成23年5月2日(2011.5.2)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 18 ~ 25 個のヌクレオチドのヌクレオチド配列からなるガイド鎖核酸分子 { 前記ガイド鎖ヌクレオチド配列は、シード領域ヌクレオチド配列及び非シード領域ヌクレオチド配列を含み、前記シード領域は、前記ガイド鎖のヌクレオチド位置 1 から 12 からなり、前記非シード領域は、前記ガイド鎖のヌクレオチド位置 13 から 3' 末端からなり、前記ガイド鎖の位置 1 は前記ガイド鎖の 5' 末端に相当し、前記シード領域は、天然のマイクロRNAのシード領域配列と同一である少なくとも 6 個のヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列をさらに含む }、及び

(i i) 18 ~ 25 個のヌクレオチドのヌクレオチド配列からなるパッセンジャー鎖核酸分子 { 前記パッセンジャー鎖は、ガイド鎖と基本的に相補的であるヌクレオチド配列を含み、前記パッセンジャー鎖核酸分子は、ガイド鎖のシード領域の正確な逆相補体と比較して、1 個のヌクレオチド配列の相違を有し、この 1 個のヌクレオチドの相違はパッセンジャー鎖のヌクレオチド位置 13 から 3' 末端内に位置する }

を含む、単離合成 2 本鎖マイクロRNA模倣物。

【請求項 2】

ガイド鎖が、

(a) 配列番号 3、配列番号 6、配列番号 9、及び配列番号 31 からなる群から選択さ

れるヌクレオチド配列と配列が同一である少なくとも6個のヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列を含むシード領域を含み、

(b) ガイド鎖配列が、miR34a(配列番号1)、miR34b(配列番号4)、miR34c(配列番号7)、及びmiR449(配列番号29)からなる群から選択される、

ことを特徴とする、請求項1に記載の単離合成2本鎖マイクロRNA模倣物。

【請求項3】

パッセンジャー鎖におけるヌクレオチドの相違がその3'末端の6個のヌクレオチド内に位置する、請求項1に記載の単離合成2本鎖マイクロRNA模倣物。

【請求項4】

合成2本鎖が、少なくとも1つの3'突出部をさらに含み、前記3'突出部が1~4個のヌクレオチドを含む、請求項1に記載の単離合成2本鎖マイクロRNA模倣物。

【請求項5】

2本鎖が、非ヌクレオチド部分をさらに含み、請求項1に記載の単離合成2本鎖マイクロRNA模倣物。

【請求項6】

ガイド鎖及びパッセンジャー鎖が核酸分解に対して安定化されている、請求項1に記載の単離合成2本鎖マイクロRNA模倣物。

【請求項7】

下記の少なくとも1つ：

(a) ガイド鎖の5'末端及び/又は3'末端において及びパッセンジャー鎖の3'末端において、少なくとも1個の化学修飾されたヌクレオチド又は非ヌクレオチド、又は

(b) パッセンジャー鎖及びガイド鎖の3'末端の第一のヌクレオチド間結合においてホスホロチオアート、又は

(c) パッセンジャー鎖及びガイド鎖の3'末端の第一のヌクレオチド間結合においてホスホロチオアート、又は

(d) ガイド鎖及びパッセンジャー鎖の5'末端の第一のヌクレオチド間結合においてホスホロチオアートを、及びガイド鎖及びパッセンジャー鎖の3'末端の第一のヌクレオチド間結合においてホスホロチオアート

をさらに含み、請求項1に記載の単離合成2本鎖マイクロRNA模倣物。

【請求項8】

2'-修飾ヌクレオチドをさらに含み、請求項1に記載の単離合成2本鎖マイクロRNA模倣物。

【請求項9】

2'-修飾ヌクレオチドが、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、及び2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)からなる群から選択される修飾を含む、請求項8に記載の単離合成2本鎖マイクロRNA模倣物。

【請求項10】

合成2本鎖マイクロRNA模倣物を形成させるために単離パッセンジャー鎖核酸分子と単離ガイド鎖核酸分子をアニーリングさせることを含む、合成2本鎖マイクロRNA模倣物を作製する方法であって、

(i) 単離ガイド鎖核酸分子は、18~25個のヌクレオチドのヌクレオチド配列からなり、前記ガイド鎖ヌクレオチド配列は、シード領域ヌクレオチド配列及び非シード領域ヌクレオチド配列を含み、前記シード領域は、前記ガイド鎖のヌクレオチド位置1から12からなり、前記非シード領域は前記ガイド鎖のヌクレオチド位置13から3'末端からなり、前記ガイド鎖の位置1は、前記ガイド鎖の5'末端に相当し、前記シード領域は、

天然のマイクロRNAのシード領域配列と同一である少なくとも6個のヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列をさらに含み；並びに

(ii) 単離パッセンジャー鎖核酸分子は、18～25個のヌクレオチドのヌクレオチド配列からなり、前記パッセンジャー鎖は、ガイド鎖と基本的に相補的であるヌクレオチド配列を含み、前記パッセンジャー鎖核酸分子は、ガイド鎖のシード領域の正確な逆相補配列と比較して、1個のヌクレオチド配列の相違を有し、この1個のヌクレオチドの相違は、パッセンジャー鎖のヌクレオチド位置13から3'末端内に位置する、

前記方法。

【請求項11】

ガイド鎖が、

(a) 配列番号3、配列番号6、配列番号9、及び配列番号31からなる群から選択されるヌクレオチド配列と配列が同一である少なくとも6個のヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列を含むシード領域を含み、

(b) ガイド鎖配列が、miR34a(配列番号1)、miR34b(配列番号4)、miR34c(配列番号7)、及びmiR449(配列番号29)からなる群から選択される、

ことを特徴とする、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

パッセンジャー鎖におけるヌクレオチドの相違が、その3'末端の6個のヌクレオチド内に位置する、請求項10に記載の方法。

【請求項13】

2本鎖が少なくとも1つの3'突出部をさらに含み、前記3'突出部が1～4個のヌクレオチドを含む、請求項10に記載の方法。

【請求項14】

18～25個のヌクレオチドのガイド鎖ヌクレオチド配列を含み、前記ガイド鎖ヌクレオチド配列は、シード領域ヌクレオチド配列及び非シード領域ヌクレオチド配列を含み、前記シード領域は基本的に前記ガイド鎖のヌクレオチド位置1から12からなり、前記非シード領域は基本的に前記ガイド鎖のヌクレオチド位置13から3'末端からなり、前記ガイド鎖の位置1は前記ガイド鎖の5'末端に相当し、前記シード領域は配列番号3、配列番号6、配列番号9及び配列番号31からなる群から選択されるヌクレオチド配列と配列が同一である少なくとも6個のヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列をさらに含み；並びに

配列番号1、配列番号2及び配列番号3からなる群から選択されるヌクレオチド配列と比較して、少なくとも1個のヌクレオチド配列の相違を有する、単離核酸分子。

【請求項15】

細胞株A549の第一の試料への単離核酸分子の導入の結果、前記単離核酸分子に曝露されない細胞株A549細胞の第二の試料中の少なくとも2つの遺伝子の測定レベルと比較して、前記少なくとも2つの遺伝子の測定レベルが検出可能に低下し、前記少なくとも2つの遺伝子は、配列番号1、配列番号4又は配列番号7を含むsiRNAが前記A549細胞に導入される場合にA549細胞において下方制御される一連の遺伝子から選択される、請求項14に記載の単離核酸分子。

【請求項16】

前記2以上の遺伝子が、表5から選択される、請求項15に記載の単離核酸分子。

【請求項17】

前記ガイド鎖配列が、miR34a-mm18,19(配列番号15)、miR34b-mm18,19(配列番号20)、及びmiR34c-mm18,19(配列番号25)からなる群から選択される、請求項14に記載の単離核酸分子。

【請求項18】

前記ガイド鎖の相補体であるパッセンジャー鎖をさらに含む、請求項14に記載の単離核酸分子。

【請求項 19】

非ヌクレオチド部分をさらに含む、請求項 14 に記載の単離核酸分子。

【請求項 20】

ガイド鎖及びパッセンジャー鎖が核酸分解に対して安定化されている、請求項 18 に記載の単離核酸分子。

【請求項 21】

下記の少なくとも 1 つ：

(a) ガイド鎖の 5' 末端及び/又は 3' 末端及びパッセンジャー鎖の 3' 末端において少なくとも 1 個の化学修飾されたヌクレオチド又は非ヌクレオチド、又は

(b) 少なくとも 1 つの 3' - 突出部、ここで前記 3' - 突出部は 1 ~ 4 個のヌクレオチドを含む、又は

(c) 少なくとも 1 つの 2 ヌクレオチド 3' - 突出部、又は

(d) パッセンジャー鎖及びガイド鎖の 3' 末端の第一のヌクレオチド間結合においてホスホロチオアート、又は

(e) ガイド鎖及びパッセンジャー鎖の 5' 末端の第一のヌクレオチド間結合においてホスホロチオアートを、及び、ガイド鎖及びパッセンジャー鎖の 3' 末端の第一のヌクレオチド間結合においてホスホロチオアートを

をさらに含む、請求項 18 に記載の単離核酸分子。

【請求項 22】

パッセンジャー鎖及びガイド鎖の 5' 末端の第一のヌクレオチド間結合においてホスホロチオアートをさらに含む、請求項 19 に記載の単離核酸分子。

【請求項 23】

2' - 修飾ヌクレオチドをさらに含む、請求項 18 に記載の単離核酸分子。

【請求項 24】

2' - 修飾ヌクレオチドが、2' - デオキシ、2' - デオキシ - 2' - フルオロ、2' - O - メチル、2' - O - メトキシエチル (2' - O - MOE)、2' - O - アミノプロピル (2' - O - AP)、2' - O - ジメチルアミノエチル (2' - O - DMAOE)、2' - O - ジメチルアミノプロピル (2' - O - DMAP)、2' - O - ジメチルアミノエチルオキシエチル (2' - O - DMAEOE)、及び 2' - O - N - メチルアセトアミド (2' - O - NMA) からなる群から選択される修飾を含む、請求項 23 に記載の単離核酸分子。

【請求項 25】

少なくとも 1 つの合成 2 本鎖マイクロ RNA 模倣物及び送達物質を含む組成物であって、
合成 2 本鎖マイクロ RNA 模倣物は、

(i) 18 ~ 25 個のヌクレオチドのヌクレオチド配列からなるガイド鎖核酸分子 { 前記ガイド鎖ヌクレオチド配列は、シード領域ヌクレオチド配列及び非シード領域ヌクレオチド配列を含み、前記シード領域は、前記ガイド鎖のヌクレオチド位置 1 から 12 からなり、前記非シード領域は、前記ガイド鎖のヌクレオチド位置 13 から 3' 末端からなり、前記ガイド鎖の位置 1 は前記ガイド鎖の 5' 末端に相当し、前記シード領域は、天然のマイクロ RNA のシード領域と配列が同一である少なくとも 6 個のヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列をさらに含む }、及び

(ii) 18 ~ 25 個のヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むパッセンジャー鎖核酸分子 { 前記パッセンジャー鎖は、ガイド鎖と基本的に相補的であるヌクレオチド配列を含み、前記パッセンジャー鎖核酸分子は、ガイド鎖のシード領域の正確な逆相補体配列と比較して、1 個のヌクレオチド配列の相違を有し、1 個のヌクレオチドの相違は、前記パッセンジャー鎖のヌクレオチド位置 13 から 3' 末端内に位置する }

を含む、組成物。

【請求項 26】

ガイド鎖が、

(a) 配列番号 3、配列番号 6、配列番号 9 及び配列番号 3 1 からなる群から選択されるヌクレオチド配列と配列が同一である少なくとも 6 個のヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列を含むシード領域を含み、

(b) ガイド鎖配列が、m i R 3 4 a (配列番号 1)、m i R 3 4 b (配列番号 4)、m i R 3 4 c (配列番号 7) 及び m i R 4 4 9 (配列番号 2 9) からなる群から選択される、

ことを特徴とする、請求項 2 5 に記載の組成物。

【請求項 2 7】

パッセンジャー鎖におけるヌクレオチドの相違が、その 3 ' 末端の 6 個のヌクレオチド内に位置する、請求項 2 5 に記載の組成物。

【請求項 2 8】

送達物質が脂質ナノ粒子を含む、請求項 2 5 に記載の組成物。