

【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】令和4年5月23日(2022.5.23)

【国際公開番号】WO2019/226603

【公表番号】特表2021-524245(P2021-524245A)

【公表日】令和3年9月13日(2021.9.13)

【出願番号】特願2020-564923(P2020-564923)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/11(2006.01)

10

C 1 2 N 15/113(2010.01)

C 1 2 N 15/115(2010.01)

C 1 2 N 15/63(2006.01)

C 1 2 N 15/86(2006.01)

C 1 2 N 15/88(2006.01)

C 1 2 N 1/19(2006.01)

C 1 2 N 1/21(2006.01)

C 1 2 N 5/10(2006.01)

C 1 2 N 1/15(2006.01)

C 1 2 N 15/10(2006.01)

20

A 6 1 P 35/00(2006.01)

A 6 1 P 43/00(2006.01)

A 6 1 K 45/00(2006.01)

A 6 1 K 48/00(2006.01)

A 6 1 K 35/76(2015.01)

A 6 1 K 47/59(2017.01)

A 6 1 K 47/69(2017.01)

A 6 1 K 31/7105(2006.01)

A 6 1 K 9/127(2006.01)

【F I】

30

C 1 2 N 15/11 Z Z N A

C 1 2 N 15/113 Z

C 1 2 N 15/115 Z

C 1 2 N 15/63 Z

C 1 2 N 15/86 Z

C 1 2 N 15/88 Z

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 15/10

Z

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 43/00 1 2 1

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 35/76

A 6 1 K 47/59

A 6 1 K 47/69

A 6 1 K 31/7105

A 6 1 K 9/127

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和4年5月13日(2022.5.13)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0314

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0314】

本開示は以下の実施形態を含む。

10

実施形態1

2つ以上のプレマイクロRNA(プレmiRNA)に作動可能に連結されたtRNAを含むポリヌクレオチドであって、前記2つ以上のプレmiRNAの各々が、前記プレmiRNAに対して異種である挿入RNA分子に作動可能に連結されている、ポリヌクレオチド。

実施形態2

前記tRNAのステムループアンチコドンの全部または一部が、前記プレmiRNAで置き換えられている、実施形態1に記載のポリヌクレオチド。

実施形態3

前記挿入RNA分子が、

20

a)前記プレmiRNAの5'末端、

b)前記プレmiRNAの3'末端、

c)前記プレmiRNAのダイサーもしくはRNase切断部位の5'、または

d)前記プレmiRNAのダイサーもしくはRNase切断部位の3'

に挿入される、近接する、または作動可能に連結される、実施形態1または2に記載のポリヌクレオチド。

実施形態4

前記ポリヌクレオチドが、約275ヌクレオチド以上、例えば、約280ヌクレオチド以上、例えば、約290ヌクレオチド以上、かつ約400ヌクレオチドまでの長さである、実施形態1~3のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

30

実施形態5

前記tRNAが、セリン、ロイシン、グリシン、グルタメート、アスパルテート、グルタミン、アルギニン、システイン、リジン、メチオニン、アスパラギン、アラニン、ヒスチジン、イソロイシン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、チロシン、スレオニン、およびバリンからなる群から選択されるアミノ酸に由来するか、またはそれをコードするtRNAである、実施形態1~4のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態6

前記tRNAをコードするRNAが、表8に示される配列番号300~355に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する5'tRNA配列および3'tRNA配列を含む、実施形態1~5のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

40

実施形態7

前記tRNAが、哺乳動物tRNA、例えばヒトtRNAである、実施形態1~6のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態8

前記2つ以上のプレマイクロRNAが、ヒトプレmiRNA分子に由来する、実施形態1~7のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態9

前記2つ以上のプレmiRNAが、プレmiR-34a、プレmiR-124、プレmiR-1291、プレmiR-200b、プレmiR-200a、プレmiR-141、

50

プレmiR - 429、プレmiR - 133a、プレlet - 7c、プレmiR - 125a、プレmiR - 328、プレmiR - 126、プレmiR - 298、プレmiR - 148、プレmiR - 144、プレmiR - 1、プレmiR - 133、プレmiR - 888、プレmiR - 6775、プレmiR - 374、プレmiR - 92、プレmiR - 1180、プレmiR - 218、プレmiR - 7、プレmiR - 378、プレmiR - 17、プレmiR - 18a、プレmiR - 22、プレmiR - 122、プレmiR - 30b、プレmiR - 449、プレmiR - 506、プレmiR - 98、プレmiR - 4458、プレmiR - 206、プレmiR - 519、プレmiR - 93、プレmiR - 106、プレmiR - 373、およびプレmiR - 520からなる群から選択される、実施形態1～8のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

10

実施形態10

前記2つ以上のプレmiRNAが、同じプレmiRNA分子に由来する、実施形態1～9のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態11

前記2つ以上のプレmiRNAが、ヒトプレmiR - 34a分子に由来する、実施形態10に記載のポリヌクレオチド。

実施形態12

前記2つ以上のプレmiRNAが、異なるプレmiRNA分子に由来する、実施形態1～9のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態13

前記挿入RNAが、非コードRNA(ncRNA)、成熟マイクロRNA(miRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、短いヘアピン型RNA(shRNA)、Piwi結合RNA(piRNA)、核内低分子RNA(snRNA)、核小体低分子RNA(snoRNA)、ガイドRNA(gRNA)、アンチセンスRNA(asRNA)、低分子活性化RNA(sarRNA)、触媒RNA、リボスイッチ、RNAアダプターからなる群から選択される、実施形態1～12のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

20

実施形態14

前記挿入RNAが、少なくとも約18個のヌクレオチドかつ最大約200個までのヌクレオチドを有する、実施形態1～13のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態15

前記挿入RNAが、少なくとも約18個のヌクレオチドかつ最大約50個までのヌクレオチドを有する、実施形態14に記載のポリヌクレオチド。

30

実施形態16

前記挿入RNAが、少なくとも約20個のヌクレオチドかつ最大約25個までのヌクレオチドを有する、実施形態14に記載のポリヌクレオチド。

実施形態17

前記挿入RNAが、成熟miRNAである、実施形態1～16のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態18

前記挿入RNAが、let - 7c、miR - 298、miR - 216、miR - 34a、miR - 124、miR - 328、miR - 144、miR - 126、miR - 16、miR - 18、miR - 125a、miR - 195、miR - 199a、miR - 200、miR - 224、miR - 1291、miR - 429、miR - 148、miR - 144、miR - 1、miR - 133、miR - 888、miR - 6775、miR - 374、miR - 92、miR - 1180、miR - 218、miR - 7、miR - 378、miR - 17、miR - 18a、miR - 22、miR - 122、miR - 30b、miR - 449、miR - 506、miR - 98、miR - 4458、miR - 206、miR - 519、miR - 93、miR - 106、miR - 373、およびmiR - 520からなる群から選択される2つ以上の成熟miRNAを含む、実施形態1～17のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

40

50

実施形態 19

前記2つ以上のプレmiRNAにおける前記挿入RNAが同じである、実施形態1～18のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態 20

前記2つ以上のプレmiRNAにおける前記挿入RNAが異なる、実施形態1～18のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態 21

前記挿入RNAが、let-7c、miR-1291、miR-200、miR-92、miR-34aおよびmiR-124からなる群から選択される、実施形態1～20のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

10

実施形態 22

前記挿入RNAが、miR-1291、miR-34、miR-124、miR-200、およびmiR-216からなる群から選択される成熟miRNAである、実施形態1～20のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態 23

前記挿入RNAが、let-7c、miR-298、miR-216、miR-124、miR-328、miR-144、miR-126、miR-16、miR-18、miR-125a、miR-195、miR-199a、miR-200、およびmiR-224からなる群から選択される成熟miRNAである、実施形態1～20のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

20

実施形態 24

さらに、前記tRNAおよび/またはプレmiRNAが、1つ以上のアダマー、低分子活性化RNA(saRNA)、または触媒RNAに作動可能に連結されている、実施形態1～23のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態 25

前記アダマー、saRNAまたは触媒RNAが、

- a) 前記プレmiRNAの5'末端、
- b) 前記プレmiRNAの3'末端、
- c) 前記プレmiRNAのダイサーもしくはRNase切断部位の5、または
- d) 前記プレmiRNAのダイサーもしくはRNase切断部位の3'

30

に挿入される、近接する、または作動可能に連結される、実施形態24に記載のポリヌクレオチド。

実施形態 26

前記アダマーが、セフェデックス、EpcAM、VEGF、fms関連チロシンキナーゼ1(FLT1)、テオフィリン、マラカイトグリーン、HCC-22-5、ケラチン23(KRT23)、アルファ2-HS糖タンパク質(AHSG)、フェリチン軽鎖(FTL)、MAGE-A1、MAGE-A3/4、NY-ESO-1、14-3-3、c-Myc、MDM2、NPM1、p16、p53、サイクリンB1、KIF20A、MUC1、CA19-9、DU-PAN-2、TAG-72、カドヘリン3(CDH3)/P-カドヘリン、Siso細胞で発現する受容体結合がん抗原(RCAS1)、およびSC6からなる群から選択される標的抗原に結合するものである、実施形態24～25のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

40

実施形態 27

前記アダマーが、配列番号356～359のうちの1つに対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を含む核酸配列を含む、実施形態24～26のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態 28

前記ポリヌクレオチドが、配列番号183～210、265～288および296～298のうちのいずれか1つに対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94

50

％、 95％、 96％、 97％、 98％、 99％または100％の配列同一性を含む、実施形態1～27のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態29

プレm i RNAに作動可能に連結されたtRNAを含むポリヌクレオチドであって、前記ポリヌクレオチドが、配列番号85～182および211～264のうちのいずれか1つに対して少なくとも約90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％、または100％の配列同一性を含む、ポリヌクレオチド。

実施形態30

挿入RNA分子を含むプレm i RNAに作動可能に連結されたヒトtRNAを含むポリヌクレオチドであって、例えば、前記挿入RNA分子が、前記プレm i RNAに対して異種であり、前記ポリヌクレオチドが、配列番号289～295のうちのいずれか1つに対して少なくとも約90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％または100％の配列同一性を含む、ポリヌクレオチド。

10

実施形態31

前記tRNAのステムループアンチコドンの全部または一部が、前記プレm i RNAで置き換えられている、実施形態30に記載のポリヌクレオチド。

実施形態32

前記ポリヌクレオチドが、約150ヌクレオチド以上、例えば、約160ヌクレオチド以上、例えば、約170ヌクレオチド以上、例えば、約180ヌクレオチド以上、かつ約230ヌクレオチドまでの長さである、実施形態30～31のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

20

実施形態33

前記tRNAが、セリン、ロイシン、グリシン、グルタメート、アスパルテート、グルタミン、アルギニン、システイン、リジン、メチオニン、アスパラギン、アラニン、ヒスチジン、イソロイシン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、チロシン、スレオニン、およびパリンからなる群から選択されるアミノ酸に由来するか、またはそれをコードするtRNAである、実施形態30～32のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド

実施形態34

前記tRNAをコードする前記RNAが、表8に提供される配列番号300～355に対して少なくとも約90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％または100％の配列同一性を有する5' tRNA配列および3' tRNA配列を含む、実施形態30～33のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

30

実施形態35

前記tRNAが、哺乳動物tRNA、例えばヒトtRNAである、実施形態30～34のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態36

前記挿入RNAが、非コードRNA(ncRNA)、成熟マイクロRNA(miRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、短いヘアピン型RNA(shRNA)、Piwi結合RNA(piRNA)、核内低分子RNA(snRNA)、核小体低分子RNA(snoRNA)、ガイドRNA(gRNA)、アンチセンスRNA(asRNA)、低分子活性化RNA(sarNA)、触媒RNA、リボスイッチ、およびRNAアプタマーからなる群から選択される、実施形態30～35のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

40

実施形態37

前記挿入RNAが、少なくとも約18個のヌクレオチドかつ最大約200個までのヌクレオチドを有する、実施形態30～36のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態38

前記挿入RNAが、少なくとも約18個のヌクレオチドかつ最大約50個までのヌクレオチドを有する、実施形態37に記載のポリヌクレオチド。

実施形態39

50

前記挿入RNAが、少なくとも約20個のヌクレオチドかつ最大約25個までのヌクレオチドを有する、実施形態37に記載のポリヌクレオチド。

実施形態40

前記挿入RNAが、成熟miRNAである、実施形態30～39のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態41

前記挿入RNAが、let-7c、miR-298、miR-216、miR-34a、miR-124、miR-328、miR-144、miR-126、miR-16、miR-18、miR-125a、miR-195、miR-199a、miR-200、miR-224、miR-1291、miR-429、miR-148、miR-144、miR-1、miR-133、miR-888、miR-6775、miR-374、miR-92、miR-1180、miR-218、miR-7、miR-378、miR-17、miR-18a、miR-22、miR-122、miR-30b、miR-449、miR-506、miR-98、miR-4458、miR-206、miR-519、miR-93、miR-106、miR-373、およびmiR-520からなる群から選択される成熟miRNAである、実施形態30～40のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

10

実施形態42

さらに、前記tRNAおよび/またはプレmiRNAが、アプタマー、低分子活性化RNA(saRNA)、または触媒RNAに作動可能に連結されている、実施形態30～41のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

20

実施形態43

前記アプタマー、saRNAまたは触媒RNAが、
a) 前記プレmiRNAの5'末端、
b) 前記プレmiRNAの3'末端、
c) 前記プレmiRNAのダイサーもしくはRNase切断部位の5'、または
d) 前記プレmiRNAのダイサーもしくはRNase切断部位の3'
に挿入される、近接する、または作動可能に連結される、実施形態42に記載のポリヌクレオチド。

実施形態44

前記アプタマーが、セフェデックス、EpCAM、VEGF、fms関連チロシンキナーゼ1(FLT1)、テオフィリン、マラカイトグリーン、HCC-22-5、ケラチン23(KRT23)、アルファ2-HS糖タンパク質(AHSG)、フェリチン軽鎖(FTL)、MAGE-A1、MAGE-A3/4、NY-ESO-1、14-3-3、c-Myc、MDM2、NPM1、p16、p53、サイクリンB1、KIF20A、MUC1、CA19-9、DU-PAN-2、TAG-72、カドヘリン3(CDH3)/P-カドヘリン、Siso細胞で発現する受容体結合がん抗原(RCAS1)、およびSC6からなる群から選択される標的抗原に結合するものである、実施形態30～43のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

30

実施形態45

前記アプタマーが、配列番号356～359のうちの一つに対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を含む核酸配列を含む、実施形態30～44のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

40

実施形態46

配列番号85～298に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を含む、実施形態1～45のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態47

前記プレmiRNAが、天然由来または人工由来である、実施形態1～46のいずれか

50

一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態 4 8

前記ポリヌクレオチドが、哺乳動物に対して実質的に非免疫原性である、実施形態 1 ~ 4 7 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態 4 9

実施形態 1 ~ 4 8 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む発現カセット。

実施形態 5 0

実施形態 1 ~ 4 8 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは実施形態 4 9 に記載の発現カセットを含む、リポソームまたはナノ粒子。

実施形態 5 1

実施形態 1 ~ 4 8 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは実施形態 4 9 に記載の発現カセットを含む、ウイルスベクター。

実施形態 5 2

前記リポソームが、ポリエチレンイミン (P E I) と複合体を形成した実施形態 1 ~ 4 8 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む内部コアと、外部脂質二重層とを含む、実施形態 5 0 に記載のリポソームまたはナノ粒子。

実施形態 5 3

前記内部コアが、例えば約 1 0 , 0 0 0 ダルトンの分子量を有する、リポソーム分岐ポリエチレンイミン (P E I) ポリプレックス (L P P) を含む、実施形態 5 0 ~ 5 2 のいずれか一項に記載のリポソームまたはナノ粒子。

実施形態 5 4

前記外部脂質二重層が、1 , 2 - ジ - O - オクタデセニル - 3 - トリメチルアンモニウムプロパン (D O T M A)、コレステロールおよび 1 , 2 - ジミリスチル - s n - グリセロール、メトキシポリエチレングリコール (D M G - P E G 2 0 0 0) の混合物を含む、実施形態 5 0 ~ 5 3 のいずれか一項に記載のリポソームまたはナノ粒子。

実施形態 5 5

実施形態 1 ~ 4 8 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは実施形態 4 9 に記載の発現カセットまたは実施形態 5 0 ~ 5 4 のいずれか一項に記載のリポソームもしくはナノ粒子でトランスフェクトまたは形質転換された、宿主細胞。

実施形態 5 6

前記宿主細胞が、原核細胞または真核細胞である、実施形態 5 5 に記載の宿主細胞。

実施形態 5 7

前記宿主細胞が、細菌細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞または植物細胞から選択される、実施形態 5 5 または 5 6 に記載の宿主細胞。

実施形態 5 8

必要とする対象において、がんの成長、増殖、および/または進行を予防、緩和、低減、逆転および/または阻害する方法であって、実施形態 1 ~ 4 8 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは実施形態 4 9 に記載の発現カセットまたは実施形態 5 0 ~ 5 4 のいずれか一項に記載のリポソーム、ナノ粒子もしくはウイルスベクターを前記対象に投与することを含む、方法。

実施形態 5 9

前記がんが、乳がん、リンパ腫、結腸直腸がん、肝細胞がん、膵臓がん、前立腺がん、および肺がんからなる群から選択される、実施形態 5 8 に記載の方法。

実施形態 6 0

前記ポリヌクレオチドが、l e t - 7 c、m i R - 2 9 8、m i R - 2 1 6、m i R - 3 4 a、m i R - 1 2 4、m i R - 3 2 8、m i R - 1 4 4、m i R - 1 2 6、m i R - 1 6、m i R - 1 8、m i R - 1 2 5 a、m i R - 1 9 5、m i R - 1 9 9 a、m i R - 2 0 0、m i R - 2 2 4、m i R - 1 2 9 1、m i R - 4 2 9、m i R - 1 4 8、m i R - 1 4 4、m i R - 1、m i R - 1 3 3、m i R - 8 8 8、m i R - 6 7 7 5、m i R - 3 7 4、m i R - 9 2、m i R - 1 1 8 0、m i R - 2 1 8、m i R - 7、m i R - 3 7

10

20

30

40

50

8、miR-17、miR-18a、miR-22、miR-122、miR-30b、miR-449、miR-506、miR-98、miR-4458、miR-206、miR-519、miR-93、miR-106、miR-373、およびmiR-520からなる群から選択される1つ以上の成熟miRNAを含む、実施形態58または59に記載の方法。

実施形態61

前記がんが、肺がんであり、前記ポリヌクレオチドが、miR-34aおよびmiR-124からなる群から選択される1つ以上の成熟miRNAを含む、実施形態58～60のいずれか一項に記載の方法。

実施形態62

前記がんが、膵臓がんであり、前記ポリヌクレオチドが、miR-1291、miR-34、miR-124、miR-200、およびmiR-216からなる群から選択される1つ以上の成熟miRNAを含む、実施形態58～60のいずれか一項に記載の方法。

実施形態63

前記がんが、肝細胞がんであり、前記ポリヌクレオチドが、let-7c、miR-298、miR-216、miR-124、miR-328、miR-144、miR-126、miR-16、miR-18、miR-125a、miR-195、miR-199a、miR-200、およびmiR-224からなる群から選択される1つ以上の成熟miRNAを含む、実施形態58～60のいずれか一項に記載の方法。

実施形態64

前記ポリヌクレオチド、リポソームまたはナノ粒子が、静脈内、動脈内、腹腔内、腹腔内、肺内、肝内、皮下または腫瘍内から選択される経路を介して投与される、実施形態58～63のいずれか一項に記載の方法。

実施形態65

前記ポリヌクレオチド、リポソームまたはナノ粒子の治療レジメンが、複数回、例えば、毎日、毎週、隔週、毎月、例えば所定のまたは所望のエンドポイントに達するまで、投与される、実施形態58～64のいずれか一項に記載の方法。

実施形態66

前記対象が、がんの症状を示している、例えば、1つ以上の腫瘍を有している、実施形態58～65のいずれか一項に記載の方法。

実施形態67

前記対象が、寛解状態にあり、腫瘍を再発症するリスクがある、実施形態58～65のいずれか一項に記載の方法。

実施形態68

1つ以上の化学療法剤または抗がん剤の同時投与をさらに含む、実施形態58～67のいずれか一項に記載の方法。

実施形態69

前記対象が、投与前に1つ以上のmiRNAの過剰発現または過少発現について試験される、実施形態58～68のいずれか一項に記載の方法。

実施形態70

配列番号85～298に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する1つ以上のハイブリッドtRNA/プレmiRNA分子を前記対象に投与することを含む、実施形態58～69のいずれか一項に記載の方法。

実施形態71

実施形態1～48のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは実施形態49に記載の発現カセット、実施形態50～54のいずれか一項に記載のリポソーム、ナノ粒子もしくはウイルスベクター、および/または実施形態55～57のいずれか一項に記載の宿主細胞を含む、キット。

本明細書に記載の実施例および実施形態は、例示のみを目的としており、それに照らして

10

20

30

40

50

種々の改変または変更が当業者に提案され、本出願の趣旨および範囲ならびに添付の特許請求の範囲に含まれるべきであることが理解されよう。本明細書で引用したすべての刊行物、特許、および特許出願は、あらゆる目的で、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【**手続補正 2**】

【**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**】

10

【**請求項 1**】

2つ以上のプレマイクロRNA (プレmiRNA) に作動可能に連結された tRNA を含むポリヌクレオチドであって、前記2つ以上のプレmiRNA の各々が、前記プレmiRNA に対して異種である挿入RNA 分子に作動可能に連結されている、ポリヌクレオチド。

【**請求項 2**】

前記 tRNA のステムループアンチコドンの全部または一部が、前記プレmiRNA で置き換えられている、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【**請求項 3**】

前記挿入RNA 分子が、

20

a) 前記プレmiRNA の 5' 末端、

b) 前記プレmiRNA の 3' 末端、

c) 前記プレmiRNA のダイサーもしくは RNase 切断部位の 5'、または

d) 前記プレmiRNA のダイサーもしくは RNase 切断部位の 3'

に挿入される、近接する、または作動可能に連結される、請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチド。

【**請求項 4**】

前記ポリヌクレオチドが、275ヌクレオチドから400ヌクレオチドまでの長さである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【**請求項 5**】

30

前記2つ以上のプレmiRNA が、プレmiR - 34a、プレmiR - 124、プレmiR - 1291、プレmiR - 200b、プレmiR - 200a、プレmiR - 141、プレmiR - 429、プレmiR - 133a、プレlet - 7c、プレmiR - 125a、プレmiR - 328、プレmiR - 126、プレmiR - 298、プレmiR - 148、プレmiR - 144、プレmiR - 1、プレmiR - 133、プレmiR - 888、プレmiR - 6775、プレmiR - 374、プレmiR - 92、プレmiR - 1180、プレmiR - 218、プレmiR - 7、プレmiR - 378、プレmiR - 17、プレmiR - 18a、プレmiR - 22、プレmiR - 122、プレmiR - 30b、プレmiR - 449、プレmiR - 506、プレmiR - 98、プレmiR - 4458、プレmiR - 206、プレmiR - 519、プレmiR - 93、プレmiR - 106、プレmiR -

40

前記2つ以上のプレmiRNA が、同じプレmiRNA 分子に由来し、任意で

前記同じプレmiRNA 分子に由来する前記2つ以上のプレmiRNA が、ヒトプレmiR - 34a 分子に由来する、

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【**請求項 6**】

前記挿入RNA が、非コードRNA (ncRNA)、成熟マイクロRNA (miRNA)、低分子干渉RNA (siRNA)、短いヘアピン型RNA (shRNA)、Piwi 結合RNA (piRNA)、核内低分子RNA (snRNA)、核小体低分子RNA (snoRNA)、ガイドRNA (gRNA)、アンチセンスRNA (asRNA)、低分子活

50

性化RNA (saRNA)、触媒RNA、リボスイッチ、RNAアプタマーからなる群から選択される、請求項1～5のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項7】

前記挿入RNAが、成熟miRNAである、請求項1～6のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項8】

前記挿入RNAが、let-7c、miR-298、miR-216、miR-34a、miR-124、miR-328、miR-144、miR-126、miR-16、miR-18、miR-125a、miR-195、miR-199a、miR-200、miR-224、miR-1291、miR-429、miR-148、miR-144、miR-1、miR-133、miR-888、miR-6775、miR-374、miR-92、miR-1180、miR-218、miR-7、miR-378、miR-17、miR-18a、miR-22、miR-122、miR-30b、miR-449、miR-506、miR-98、miR-4458、miR-206、miR-519、miR-93、miR-106、miR-373、およびmiR-520からなる群から選択される2つ以上の成熟miRNAを含む、請求項1～7のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項9】

前記挿入RNAが、miR-1291、miR-34、miR-124、miR-200、およびmiR-216からなる群から選択される成熟miRNAである、請求項1～8のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項10】

さらに、前記tRNAおよび/またはプレmiRNAが、1つ以上のアプタマー、低分子活性化RNA (saRNA)、または触媒RNAに作動可能に連結されている、請求項1～9のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項11】

請求項1～10のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む発現カセット。

【請求項12】

請求項1～10のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは請求項11に記載の発現カセットを含む、リボソーム、ナノ粒子、またはウイルスベクター。

【請求項13】

請求項1～10のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは請求項11に記載の発現カセットまたは請求項12に記載のリボソーム、ナノ粒子もしくはウイルスベクターでトランスフェクトまたは形質転換された、宿主細胞。

【請求項14】

必要とする対象において、がんの成長、増殖、および/または進行を予防、緩和、低減、逆転および/または阻害する方法であって、請求項1に記載のポリヌクレオチドを前記対象に投与することを含み、任意で、

前記がんが、乳がん、リンパ腫、結腸直腸がん、肝細胞がん、膵臓がん、前立腺がん、および肺がんからなる群から選択される、方法。

【請求項15】

前記ポリヌクレオチドが、let-7c、miR-298、miR-216、miR-34a、miR-124、miR-328、miR-144、miR-126、miR-16、miR-18、miR-125a、miR-195、miR-199a、miR-200、miR-224、miR-1291、miR-429、miR-148、miR-144、miR-1、miR-133、miR-888、miR-6775、miR-374、miR-92、miR-1180、miR-218、miR-7、miR-378、miR-17、miR-18a、miR-22、miR-122、miR-30b、miR-449、miR-506、miR-98、miR-4458、miR-206、m

i R - 5 1 9、m i R - 9 3、m i R - 1 0 6、m i R - 3 7 3、および m i R - 5 2 0
からなる群から選択される1つ以上の成熟 m i R N A を含む、請求項 1 4 に記載の方法。

10

20

30

40

50