

【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 18 年 1 月 5 日 (2006.1.5)

【公表番号】特表 2005-501557 (P2005-501557A)  
 【公表日】平成 17 年 1 月 20 日 (2005.1.20)  
 【年通号数】公開・登録公報 2005-003  
 【出願番号】特願 2003-525634 (P2003-525634)  
 【国際特許分類】

**C 1 2 N 15/09 (2006.01)**

**A 6 1 K 48/00 (2006.01)**

**C 1 2 Q 1/02 (2006.01)**

**C 1 2 N 5/10 (2006.01)**

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 48/00

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 N 5/00 B

【手続補正書】  
 【提出日】平成 17 年 8 月 9 日 (2005.8.9)  
 【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】

1 7 から 2 3 ヌクレオチドからなり、宿主細胞における特定の R N A 分子の 1 7 から 2 3 ヌクレオチドの R N A 配列に相補的な第一のポリヌクレオチド配列を含み、該第一の配列は第二の配列が R N A 配列の場合、ステムループ構造を形成することができる第二の配列と共有結合により連結しており、ここで該第一の配列は実質的に R N A 配列、またはそれに均等な一本鎖 D N A からなる、宿主細胞における該特定の R N A 分子の下方制御または分解に有用な単離ポリヌクレオチド。

【請求項 2】

該第一の配列に相補的であり、該第二の配列の遠位末端に共有結合により連結した第三の配列をさらに含む、請求項 1 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3】

該第二の配列が第二の配列内でステムループ構造を形成することができる、請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4】

該第一および第三の配列におけるすべてのヌクレオチドが塩基対形成する、請求項 2 または 3 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5】

該第二の配列が酵素によって切断され得る少なくとも 1 つのヌクレオチド配列を含む、請求項 1 から 4 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6】

少なくとも 2 つの酵素切断部位を有する、請求項 5 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7】

該酵素切断部位の少なくとも 1 つが該ステムループ構造のステム部分に位置する、請求

項 5 または 6 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 8】

少なくとも 1 つの酵素切断部位が該第一の配列と該第二の配列の間に挿入されている、請求項 5 から 7 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項 9】

該第一の配列に関連する発現産物の機能が未知である、請求項 1 から 8 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項 10】

該第一の配列が 1 9 から 2 1 ヌクレオチド長である、請求項 1 から 9 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項 11】

宿主細胞における RNA の下方制御または分解に有用な自己相補的一本鎖ポリヌクレオチドであって、1 7 から 2 3 ヌクレオチドからなり該宿主細胞の該 RNA 配列の 1 7 から 2 3 ヌクレオチドに相補的な第一のポリヌクレオチド配列、および、第二の配列が RNA 配列である場合、ステムループ構造を形成することができる第二のヌクレオチド配列によって共有結合により連結した第三のヌクレオチド配列を含み、それによって該第一の配列および該第三の配列におけるすべてのヌクレオチドが互いに塩基対を形成することができ、ここで該第二のヌクレオチド配列が、天然の RNA 配列由来であって、宿主細胞において特定の RNA 分子を機能的に標的としない配列を含むステムループ形成領域を含む、自己相補的一本鎖ポリヌクレオチド。

【請求項 12】

該第二の配列が mRNA 以外の天然の RNA 配列由来であって 4 から 3 0 ヌクレオチド長である、請求項 1 から 11 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項 13】

該第二の配列が 4 から 1 3 ヌクレオチドである、請求項 1 から 12 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項 14】

さらに RNA 配列またはそれに均等な一本鎖 DNA を含む第四のヌクレオチド配列を含み、該第四の配列は該第一または第三の配列の遊離末端に共有結合により連結しており、該 RNA 配列が宿主細胞において酵素によって切断され得、切断されると該第一または第三の配列の遊離末端となる、請求項 2 から 13 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項 15】

さらに RNA 配列またはそれと均等な一本鎖 DNA を含む第五のヌクレオチド配列を含み、該第五の配列が該第一または第三の配列の遊離末端に共有結合により連結しており、該 RNA 配列が宿主細胞において酵素によって切断され得、切断されると該第一または第三の配列の遊離末端となる、請求項 14 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 16】

該第四の配列がベクターへの方向性のクローニングを可能にするように機能する、請求項 14 または 15 に記載の DNA 配列。

【請求項 17】

請求項 1 から 16 記載のポリヌクレオチドおよび該第一の配列の上流に位置するプロモーター配列を含む、宿主細胞をトランスフェクトするのに有用なベクター。

【請求項 18】

該プロモーターがマイクロ RNA プロモーターである、請求項 17 に記載のベクター。

【請求項 19】

該プロモーターが let - 7 プロモーターである、請求項 18 に記載のベクター。

【請求項 20】

該プロモーターが RNA ポリメラーゼ III によって認識されるプロモーターである、請求項 17 から 19 のいずれかに記載のベクター。

【請求項 21】

該プロモーターが 5 S rRNA、tRNA、VA RNA、Alu RNA、H1、またはU6核内低分子RNAからなる群から選択される、請求項20記載のベクター。

【請求項22】

該ポリヌクレオチドがアデノウイルスゲノム配列に共有結合により連結したDNAからなる、請求項17から21のいずれかに記載のベクター。

【請求項23】

宿主細胞に存在する少なくとも1つのRNA配列の量を低下させる方法であって、請求項1から16のいずれかに記載のポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドをコードするベクターで該細胞をトランスフェクトすることを含み、ここで該第一の配列が該RNA配列に相補的である方法。

【請求項24】

ステムループ構造を形成するポリヌクレオチド配列によって共有結合により連結した相補的配列を含む自己相補的一本鎖ポリヌクレオチドの調製方法であって、実質的に少なくとも2つの相補的塩基対を形成できるヌクレオチド配列を含むことによりステムループ構造を形成し、3'OH末端を有する第二のポリヌクレオチド配列に共有結合によって連結した第一のポリヌクレオチド配列からなる一本鎖ポリヌクレオチドを、該第一の配列がそれに対する相補的配列の合成のために3'OH末端から開始する鋳型として働く条件下で処理することを含む自己相補的一本鎖ポリヌクレオチドの調製方法。

【請求項25】

請求項1から13のいずれかに記載のポリヌクレオチドの配列を含むベクターの調製方法であって、該ポリヌクレオチドがDNA配列であり、さらに該第一の配列の遊離末端に連結した第四の配列を含んでおり、該ポリヌクレオチドを変性し、二本鎖ポリヌクレオチドに変換し、そして宿主細胞をトランスフェクトすることができ該ポリヌクレオチドを転写することができるベクターヘライゼーションする方法。

【請求項26】

天然のポリヌクレオチド配列の機能を決定する方法であって、請求項17から22のいずれかに記載のベクターで宿主細胞をトランスフェクトすること、ここで該ベクターは該天然のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド配列を含むものである、および、細胞表現型の変化を検出することを含む方法。

【請求項27】

請求項1から16のいずれかに記載の発現可能なポリヌクレオチド配列および該配列に作動可能に連結したプロモーター配列を含むベクターのライブラリー。

【請求項28】

該ベクターがウイルスベクターである、請求項27に記載のライブラリー。

【請求項29】

該ベクターが、AAV、レンチウイルスまたはレトロウイルスからなる群から選択される請求項28に記載のライブラリー。

【請求項30】

該ベクターがアデノウイルスベクターである、請求項28に記載のライブラリー。

【請求項31】

該アデノウイルスベクターが複製欠損のものである、請求項30に記載のライブラリー。

【請求項32】

請求項1から16のいずれかに記載のポリヌクレオチドまたは請求項17から22のいずれかに記載のベクターによって安定にトランスフェクトされた細胞。

【請求項33】

該細胞がPER.C6細胞である請求項32記載の細胞。

【請求項34】

以下の工程を含む毒性タンパク質をコードするウイルスベクターの産生方法：

(a) 該毒性タンパク質をコードするmRNA配列に含まれる特有の配列に相補的な第一

の配列を有する請求項 1 から 16 のいずれかに記載のポリヌクレオチド配列を細胞に導入する工程、

(b) 該ウイルスベクターを該細胞に導入する工程、

(c) 該細胞をポリヌクレオチド配列の発現および該ウイルスベクターの複製を可能とする条件下で培養する工程、および、

(d) 該ウイルスベクターを回収する工程。

【請求項 35】

該細胞が該ポリヌクレオチドで安定にトランスフェクトされたウイルスパッケージング細胞である、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

対象における特定の RNA または RNA から翻訳されるタンパク質の量を低下させる方法であって、請求項 17 から 22 のいずれかに記載のベクターを、トランスフェクトされた細胞における特定の RNA の量を低下させるのに有効な量で投与する工程、該対象における細胞をトランスフェクトする工程を含む方法。