

【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30年6月28日(2018.6.28)

【公表番号】特表2017-524341(P2017-524341A)

【公表日】平成29年8月31日(2017.8.31)

【年通号数】公開・登録公報2017-033

【出願番号】特願2016-569679(P2016-569679)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 7/01 (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 P 19/34 (2006.01)

A 6 1 K 31/7105 (2006.01)

A 6 1 K 9/127 (2006.01)

A 6 1 K 9/51 (2006.01)

A 6 1 K 35/76 (2015.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/02 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/00 Z N A G

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 7/01

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10

C 1 2 P 19/34 A

A 6 1 K 31/7105

A 6 1 K 9/127

A 6 1 K 9/51

A 6 1 K 35/76

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 35/02

G 0 1 N 33/53 M

【手続補正書】

【提出日】平成30年5月16日(2018.5.16)

【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】

プレマイクロRNA(プレmiRNA)に機能的に連結されたtRNAを含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 2】

tRNAが、

- a) メチオニルtRNA;
- b) 哺乳動物tRNA;
- c) ヒトtRNA;および/または
- d) SEQ ID NO:1と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を有するtRNA、
である、請求項1記載のポリヌクレオチド。

【請求項3】

プレmiRNAが天然に得られたか、または人工的に得られた、請求項1~2のいずれか一項記載のポリヌクレオチド。

【請求項4】

プレmiRNAが、プレmiRNA-1291、プレmiRNA-34a、プレmiRNA-125b、プレmiRNA-124、プレmiRNA-27b、プレmiRNA-22、hsa-let-7a-1、hsa-let-7a-2、hsa-let-7a-3、hsa-let-7b、hsa-let-7c、hsa-let-7d、hsa-let-7e、hsa-let-7f-1、hsa-let-7f-2、hsa-let-7g、および hsa-let-7iより選択される、請求項1~3のいずれか一項記載のポリヌクレオチド。

【請求項5】

- (a) プレmiRNA-34aが、SEQ ID NO:2と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する核酸配列を含み、
- (b) プレmiRNA-1291が、SEQ ID NO:9と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する核酸配列を含み、
- (c) プレmiRNA-125-1が、SEQ ID NO:17と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する核酸配列を含み、
- (d) プレmiRNA-124が、SEQ ID NO:26と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する核酸配列を含み、
- (e) プレmiRNA-27bが、SEQ ID NO:29と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する核酸配列を含み、かつ/または

- (f) プレmiRNA-22が、SEQ ID NO:32と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する核酸配列を含む、
請求項4記載のポリヌクレオチド。

【請求項6】

tRNAのステム-ループアンチコドンの全てまたは一部がプレmiRNAと交換されている、請求項1~5のいずれか一項記載のポリヌクレオチド。

【請求項7】

tRNAおよび/またはプレmiRNAがさらに、1つまたは複数の挿入RNA分子に機能的に連結されている、請求項1~6のいずれか一項記載のポリヌクレオチド。

【請求項8】

挿入RNA分子が

- (a) プレmiRNAの5'末端;
- (b) プレmiRNAの3'末端;
- (c) プレmiRNAのダイサー切断部位の5'側;または
- (d) プレmiRNAのダイサー切断部位の3'側

に挿入されているか、接しているか、または機能的に連結されている、請求項7記載のポリヌクレオチド。

【請求項9】

挿入RNAが、少なくとも約18ヌクレオチドかつ最長で200ヌクレオチドを有する、請求項7~8のいずれか一項記載のポリヌクレオチド。

【請求項10】

挿入RNAが、ノンコーディングRNA(ncRNA)、成熟マイクロRNA(miRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、ショートヘアピンRNA(shRNA)、Piwi相互作用RNA(piRNA)、低分子核内RNA(snRNA)、低分子核小体RNA(snoRNA)、ガイドRNA(gRNA)、触媒RNA、リボスイッチ、およびRNAアプ

タマーからなる群より選択される、請求項7~9のいずれか一項記載のポリヌクレオチド。

【請求項 1 1】

挿入RNAが、miR-21、miR-22、miR-27b、miR-33、miR-34a、miR-122、miR-124-1、miR-125-1、miR-1291、およびlet-7aからなる群より選択される成熟miRNAである、請求項7~10のいずれか一項記載のポリヌクレオチド。

【請求項 1 2】

挿入RNAが標的ポリペプチドの発現を阻止するか、低減するか、または阻害する、請求項7~11のいずれか一項記載のポリヌクレオチド。

【請求項 1 3】

請求項1~12のいずれか一項記載のポリヌクレオチドを含む、発現カセット。

【請求項 1 4】

請求項1~12のいずれか一項記載のポリヌクレオチドまたは請求項13記載の発現カセットを含む、リボソーム、ポリマー、またはナノ粒子。

【請求項 1 5】

請求項1~12のいずれか一項記載のポリヌクレオチドまたは請求項13記載の発現カセットを含む、ウイルスベクター。

【請求項 1 6】

請求項1~12のいずれか一項記載のポリヌクレオチド、または請求項13記載の発現カセット、または請求項14記載のリボソーム、ポリマー、もしくはナノ粒子、または請求項15記載の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 1 7】

原核細胞または真核細胞である、請求項16記載の宿主細胞。

【請求項 1 8】

細菌細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞、または植物細胞より選択される、請求項16~17のいずれか一項記載の宿主細胞。

【請求項 1 9】

宿主細胞の集団において、請求項1~12のいずれか一項記載のtRNA/プレマイクロRNAポリヌクレオチド、請求項13記載の発現カセット、または請求項15記載のウイルスベクターを発現させる工程を含む、tRNA/プレマイクロRNAハイブリッド分子を生成する方法。

【請求項 2 0】

少なくとも1mgのtRNA/プレマイクロRNAハイブリッド分子が、宿主細胞の集団を含む1リットル培養物から生成される、請求項19記載の方法。

【請求項 2 1】

宿主細胞が細菌細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞、または植物細胞より選択される、請求項19~20のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 2】

少なくとも1mgのtRNA/プレマイクロRNAハイブリッド分子が約24時間の期間にわたって大腸菌(E.coli)宿主細胞の1リットル培養物から生成される、請求項19~21のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 3】

少なくとも1mgのtRNA/プレマイクロRNAハイブリッド分子が酵母宿主細胞の1リットル培養物から生成される、請求項19~21のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 4】

生成されたtRNA/プレマイクロRNA分子が全RNAの少なくとも約5%を構成する、請求項19~23のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 5】

宿主細胞の集団において、請求項1~12のいずれか一項記載のtRNA/プレマイクロRNAポリヌクレオチド、請求項13記載の発現カセット、または請求項15記載のウイルスベクターからRNA分子を発現させる工程を含む、RNA分子を生成する方法。

【請求項 2 6】

少なくとも1mgのRNA分子が、宿主細胞の集団を含む1リットル培養物から生成される、請求項25記載の方法。

【請求項 27】

宿主細胞が細菌細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞、または植物細胞より選択される、請求項25～26のいずれか一項記載の方法。

【請求項 28】

少なくとも1mgのRNA分子が大腸菌宿主細胞の1リットル培養物から約24時間の期間にわたって生成される、請求項26～27のいずれか一項記載の方法。

【請求項 29】

少なくとも1mgのRNA分子が酵母宿主細胞の1リットル培養物から生成される、請求項26～27のいずれか一項記載の方法。

【請求項 30】

請求項1～12のいずれか一項記載のポリヌクレオチド、請求項13記載の発現カセット、請求項14記載のリボソームもしくはナノ粒子、または請求項15記載のウイルスベクターを含む、その必要がある対象において標的ポリヌクレオチドの発現を阻止するか、低減するか、または阻害するための薬学的組成物。

【請求項 31】

請求項1～12のいずれか一項記載のポリヌクレオチド、請求項13記載の発現カセット、請求項14記載のリボソームもしくはナノ粒子、または請求項15記載のウイルスベクターを含む、その必要がある対象において癌の成長、増殖、および/または進行を阻止する、軽減する、低減する、および/または阻害するための薬学的組成物。

【請求項 32】

癌が、乳癌、リンパ腫、結腸直腸癌、肝細胞癌、膵臓癌、前立腺癌、および肺癌からなる群より選択される、請求項31記載の薬学的組成物。

【請求項 33】

請求項1～12のいずれか一項記載のポリヌクレオチド、請求項13記載の発現カセット、請求項14記載のリボソームもしくはナノ粒子、または請求項15記載のウイルスベクターから発現した挿入RNAを結合させることができる条件下で、標的分子を含有すると疑われる試料を接触させる工程であって、該挿入RNAと該試料中の標的分子との結合が該標的分子の存在を特定する工程を含む、試料中の標的分子の存在を特定する方法。

【請求項 34】

請求項1～12のいずれか一項記載のポリヌクレオチド、請求項13記載の発現カセット、請求項14記載のリボソームもしくはナノ粒子、または請求項15記載のウイルスベクターを備える、キット。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0040

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0040】

「癌関連抗原」または「腫瘍関連抗原」または「腫瘍特異的マーカー」または「腫瘍マーカー」という用語は同義で、正常細胞と比較して癌細胞の表面に優先的に発現しており、薬理学的薬剤を癌細胞に優先的に標的化するのに有用な分子(典型的にはタンパク質、炭水化物、または脂質)を指す。多くの場合、癌関連抗原は、正常細胞と比較して癌細胞において過剰発現している、例えば、正常細胞と比較して1倍過剰発現している、2倍過剰発現している、3倍過剰発現している、またはそれより多く過剰発現している細胞表面分子である。多くの場合、癌関連抗原は、癌細胞において不適切に合成された細胞表面分子、例えば、正常細胞において発現した分子と比較して欠失、付加、または変異を含有する分子である。多くの場合、癌関連抗原は癌細胞の細胞表面でしか発現せず、正常細胞の表面には合成も発現していない。例示された細胞表面腫瘍マーカーには、乳癌の場合はタン

パク質c-erbB-2およびヒト上皮増殖因子受容体(HER)、前立腺癌の場合はPSMA、乳癌、卵巣癌、および結腸直腸癌を含む非常に多くの癌では炭水化物ムチンが含まれる。

[本発明1001]

プレマイクロRNA(プレmiRNA)またはショートヘアピンRNA(shRNA)に機能的に連結されたtRNAを含む、ポリヌクレオチド。

[本発明1002]

tRNAがメチオニルtRNAである、本発明1001のポリヌクレオチド。

[本発明1003]

tRNAが、SEQ ID NO:1と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を有する、本発明1002のポリヌクレオチド。

[本発明1004]

プレmiRNAが天然に得られたか、または人工的に得られた、本発明1001~1003のいずれかのポリヌクレオチド。

[本発明1005]

プレmiRNAが、プレmiRNA-1291、プレmiRNA-34a、プレmiRNA-125b、プレmiRNA-124、プレmiRNA-27b、およびプレmiRNA-22より選択される、本発明1001~1004のいずれかのポリヌクレオチド。

[本発明1006]

(a) プレmiRNA-1291が、miRBaseアクセッション番号MI0006353と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を含み、

(b) プレmiRNA-34aが、miRBaseアクセッション番号MI0000268と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を含み、

(c) プレmiRNA-125b-1が、miRBaseアクセッション番号MI0000446と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を含み、

(d) プレmiRNA-124が、miRBaseアクセッション番号MI0000443と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を含み、

(e) プレmiRNA-27bが、miRBaseアクセッション番号MI0000440と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を含み、かつ/または

(f) プレmiRNA-22が、miRBaseアクセッション番号MI0000078と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を含む、

本発明1005のポリヌクレオチド。

[本発明1007]

(a) プレmiRNA-34aが、SEQ ID NO:2と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を含み、

(b) プレmiRNA-1291が、SEQ ID NO:9と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を含み、

(c) プレmiRNA-125-1が、SEQ ID NO:17と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を含み、

(d) プレmiRNA-124が、SEQ ID NO:26と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を含み、

(e) プレmiRNA-27bが、SEQ ID NO:29と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を含み、かつ/または

(f) プレmiRNA-22が、SEQ ID NO:32と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を含む、

本発明1005~1006のいずれかのポリヌクレオチド。

[本発明1008]

プレmiRNA-1291、プレmiRNA-34a、プレmiRNA-125b、プレmiRNA-124、プレmiRNA-27b、およびプレmiRNA-22からなる群より選択されるプレmiRNAまたはその変異体もしくは変種に機能的に連結されたメチオニルtRNAを含む、本発明1001~1007のいずれかのポリヌクレオチド。

[本発明1009]

(a) プレミRNA-34aに機能的に連結されたメチオニルtRNAが、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:39、およびSEQ ID NO:40からなる群より選択されるポリヌクレオチドと少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を有し、

(b) プレミRNA-1291に機能的に連結されたメチオニルtRNAが、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、およびSEQ ID NO:16からなる群より選択されるポリヌクレオチドと少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を有し、

(c) プレミRNA-125に機能的に連結されたメチオニルtRNAが、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、およびSEQ ID NO:25からなる群より選択されるポリヌクレオチドと少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を有し、

(d) プレミRNA-124に機能的に連結されたメチオニルtRNAが、SEQ ID NO:27 およびSEQ ID NO:28からなる群より選択されるポリヌクレオチドと少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を有し、

(e) プレミRNA-27bに機能的に連結されたメチオニルtRNAが、SEQ ID NO:30 およびSEQ ID NO:31からなる群より選択されるポリヌクレオチドと少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を有し、かつ/または

(f) プレミRNA-155に機能的に連結されたメチオニルtRNAが、SEQ ID NO:33およびSEQ ID NO:34からなる群より選択されるポリヌクレオチドと少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を有する、

本発明1008のポリヌクレオチド。

[本発明1010]

tRNAのステム-ループアンチコドンの全てまたは一部がプレミRNAと交換されている、本発明1001～1009のいずれかのポリヌクレオチド。

[本発明1011]

ショートヘアピンRNA(shRNA)に機能的に連結されたtRNAが、SEQ ID NO:41-45からなる群より選択されるポリヌクレオチドと少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を含む、本発明1001～1003のいずれかのポリヌクレオチド。

[本発明1012]

tRNAおよび/またはプレミRNAもしくはshRNAがさらに、1つまたは複数の挿入RNA分子に機能的に連結されている、本発明1001～1011のいずれかのポリヌクレオチド。

[本発明1013]

挿入RNA分子が

(a) プレミRNAの5'末端；

(b) プレミRNAの3'末端；

(c) プレミRNAのダイサー切断部位の5'側；または

(d) プレミRNAのダイサー切断部位の3'側

に挿入されているか、接しているか、または機能的に連結されている、本発明1012のポリヌクレオチド。

[本発明1014]

挿入RNAが、少なくとも約18ヌクレオチドかつ最長で200ヌクレオチドを有する、本発明1012～1013のいずれかのポリヌクレオチド。

[本発明1015]

挿入RNAが、少なくとも約18ヌクレオチドかつ最長で50ヌクレオチドを有する、本発明1014のポリヌクレオチド。

[本発明1016]

挿入RNAが、ノンコーディングRNA(ncRNA)、成熟マイクロRNA(miRNA)、低分子干渉RNA(s

iRNA)、ショートヘアピンRNA(shRNA)、Piwi相互作用RNA(piRNA)、低分子核内RNA(snRNA)、低分子核小体RNA(snoRNA)、ガイドRNA(gRNA)、触媒RNA、リボスイッチ、およびRNAアプタマーからなる群より選択される、本発明1012～1015のいずれかのポリヌクレオチド。

[本発明1017]

挿入RNAがノンコーディングRNAである、本発明1012～1016のいずれかのポリヌクレオチド。

[本発明1018]

ノンコーディングRNAがHOX antisense intergenic RNA(HOTAIR)である、本発明1017のポリヌクレオチド。

[本発明1019]

挿入RNAが、miR-21、miR-22、miR-27b、miR-33、miR-34a、miR-122、miR-124-1、miR-125-1、miR-1291、およびlet-7aからなる群より選択される成熟miRNAである、本発明1012～1017のいずれかのポリヌクレオチド。

[本発明1020]

挿入RNAが標的ポリペプチドの発現を阻止するか、低減するか、または阻害する、本発明1012～1019のいずれかのポリヌクレオチド。

[本発明1021]

挿入RNAが、標的分子または標的ポリペプチドに結合するアプタマーである、本発明1012～1015のいずれかのポリヌクレオチド。

[本発明1022]

標的ポリペプチドが、蛍光タンパク質、サイトカイン、増殖因子、ホルモン、酵素、イオンチャンネル、キナーゼ、核受容体、Gタンパク質共役受容体、エピジェネティックレギュレーター、転写因子からなる群より選択される、本発明1020～1021のいずれかのポリヌクレオチド。

[本発明1023]

蛍光タンパク質が、青紫色蛍光タンパク質、青色蛍光タンパク質(BFP)、シアン蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク質(GFP)、黄色蛍光タンパク質(YFP)、オレンジ色蛍光タンパク質(OFPP)、赤色蛍光タンパク質(RFP)、およびサファイア型タンパク質からなる群より選択される、本発明1022のポリヌクレオチド。

[本発明1024]

サイトカインが、IL-1 α 、IL-1 β 、TNF α 、IFN γ 、IFN α 、IFN β 、TGF β 1、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-17、IL-18、IL-22、IL-23、およびMIFからなる群より選択される、本発明1022のポリヌクレオチド。

[本発明1025]

核受容体がペルオキシソーム増殖剤活性化受容体(PPAR α またはPPAR γ)である、本発明1022のポリヌクレオチド。

[本発明1026]

増殖因子が血管内皮増殖因子(VEGF)である、本発明1022のポリヌクレオチド。

[本発明1027]

キナーゼが上皮増殖因子受容体(EGFR)である、本発明1022のポリヌクレオチド。

[本発明1028]

SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6；SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13；SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16；SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21；SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25；SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28；SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、およびSEQ ID NO:40からなる群より選択されるポリヌクレオチドと少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を有する、本発明1001～1027のいずれかのポリヌクレオチド。

[本発明1029]

本発明1001～1028のいずれかのポリヌクレオチドを含む、発現カセット。

[本発明1030]

本発明1001～1027のいずれかのポリヌクレオチドまたは本発明1029の発現カセットを含む、リポソーム、ポリマー、またはナノ粒子。

[本発明1031]

本発明1001～1028のいずれかのポリヌクレオチドまたは本発明1029の発現カセットを含む、ウイルスベクター。

[本発明1032]

本発明1001～1028のいずれかのポリヌクレオチド、または本発明1029の発現カセット、または本発明1030のリポソーム、ポリマー、もしくはナノ粒子、または本発明1031の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。

[本発明1033]

原核細胞または真核細胞である、本発明1032の宿主細胞。

[本発明1034]

細菌細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞、または植物細胞より選択される、本発明1032～1033のいずれかの宿主細胞。

[本発明1035]

宿主細胞の集団において、本発明1001～1028のいずれかのtRNA/プレマイクロRNAもしくはtRNA/shRNAポリヌクレオチド、本発明1029の発現カセット、または本発明1031のウイルスベクターを発現させる工程を含む、tRNA/プレマイクロRNAまたはtRNA/shRNAハイブリッド分子を生成する方法。

[本発明1036]

少なくとも1mgのtRNA/プレマイクロRNAまたはtRNA/shRNAハイブリッド分子が、宿主細胞の集団を含む1リットル培養物から生成される、本発明1035の方法。

[本発明1037]

宿主細胞が細菌細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞、または植物細胞より選択される、本発明1035～1036のいずれかの方法。

[本発明1038]

少なくとも1mgのtRNA/プレマイクロRNAまたはtRNA/shRNAハイブリッド分子が約24時間の期間にわたって大腸菌(E.coli)宿主細胞の1リットル培養物から生成される、本発明1035～1037のいずれかの方法。

[本発明1039]

少なくとも1mgのtRNA/プレマイクロRNAまたはtRNA/shRNAハイブリッド分子が酵母宿主細胞の1リットル培養物から生成される、本発明1035～1037のいずれかの方法。

[本発明1040]

生成されたtRNA/プレマイクロRNA分子が全RNAの少なくとも約5%を構成する、本発明1035～1039のいずれかの方法。

[本発明1041]

宿主細胞の集団において、本発明1001～1028のいずれかのtRNA/プレマイクロRNAもしくはtRNA/shRNAポリヌクレオチド、本発明1029の発現カセット、または本発明1031のウイルスベクターからRNA分子を発現させる工程を含む、RNA分子を生成する方法。

[本発明1042]

少なくとも1mgのRNA分子が、宿主細胞の集団を含む1リットル培養物から生成される、本発明1041の方法。

[本発明1043]

宿主細胞が細菌細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞、または植物細胞より選択される、本発明1041～1042のいずれかの方法。

[本発明1044]

少なくとも1mgのRNA分子が大腸菌宿主細胞の1リットル培養物から約24時間の期間にわたって生成される、本発明1041～1043のいずれかの方法。

[本発明1045]

少なくとも1mgのRNA分子が酵母宿主細胞の1リットル培養物から生成される、本発明1041～1043のいずれかの方法。

[本発明1046]

本発明1012～1028のいずれかのポリヌクレオチド、本発明1029の発現カセット、本発明1030のリボソームもしくはナノ粒子、または本発明1031のウイルスベクターをその必要がある対象に投与する工程を含む、該対象において標的ポリヌクレオチドの発現を阻止するか、低減するか、または阻害する方法。

[本発明1047]

本発明1012～1028のいずれかのポリヌクレオチド、本発明1029の発現カセット、本発明1030のリボソームもしくはナノ粒子、または本発明1031のウイルスベクターをその必要がある対象に投与する工程を含む、該対象において癌の成長、増殖、および/または進行を阻止する、軽減する、低減する、および/または阻害する方法。

[本発明1048]

癌が、乳癌、リンパ腫、結腸直腸癌、肝細胞癌、膵臓癌、前立腺癌、および肺癌からなる群より選択される、本発明1047の方法。

[本発明1049]

本発明1012～1028のいずれかのポリヌクレオチド、本発明1029の発現カセット、本発明1030のリボソームもしくはナノ粒子、または本発明1031のウイルスベクターから発現した挿入RNAを結合させることができる条件下で、標的分子を含有すると疑われる試料を接触させる工程であって、該挿入RNAと該試料中の標的分子との結合が該標的分子の存在を特定する工程を含む、試料中の標的分子の存在を特定する方法。

[本発明1050]

本発明1001～1028のいずれかのポリヌクレオチド、本発明1029の発現カセット、本発明1030のリボソームもしくはナノ粒子、または本発明1031のウイルスベクターを備える、キット。