

【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20年5月15日(2008.5.15)

【公表番号】特表2003-529374(P2003-529374A)

【公表日】平成15年10月7日(2003.10.7)

【出願番号】特願2001-573036(P2001-573036)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

A 6 1 K 31/7105 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (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 31/7105

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 43/00 1 1 1

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 Q 1/68 Z

C 1 2 N 5/00 B

【手続補正書】

【提出日】平成20年3月26日(2008.3.26)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 mRNAに配列対応を有し、対応する該mRNAの切断を標的化することでRNA干渉を媒介する約21～約23ヌクレオチドの単離されたRNAであって、切断が単離されたRNAとの配列対応の領域で標的化され、mRNAが哺乳動物細胞性mRNAである、単離されたRNA。

【請求項 2】 末端 3' ヒドロキシル基を含有してなる請求項 1 記載の単離されたRNA。

。

【請求項 3】 化学合成されたRNA、または天然に存在するRNAのアナログである、請求項 1 記載の単離されたRNA。

【請求項 4】 1 つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換または変化を含む、請求項 3 記載の単離されたRNAのアナログ。

【請求項 5】 一つ以上のヌクレオチドが、天然には存在しないヌクレオチドを含む非標準ヌクレオチドである、請求項 4 記載の単離されたRNAのアナログ。

【請求項 6】 (a) 二本鎖RNAとRNA干渉を媒介する可溶性抽出物とを合わせる工程、それにより混合物を生じる；および

(b) 二本鎖RNAが約21～約23ヌクレオチド長のRNAにプロセスされる条件下で(a)の混合物を維持する工程

を含む、約21～約23ヌクレオチド長のRNAの作製方法。

【請求項 7】 可溶性抽出物が合胞体胞胚葉ショウジョウバエ胚に由来するものであ

る、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】 混合物から約21～約23ヌクレオチドのRNAを単離する工程をさらに含む、請求項 6 記載の方法。

【請求項 9】 mRNAが哺乳動物細胞性である、請求項 6 記載の方法により作製された約21～約23ヌクレオチドのRNA。

【請求項 10】 (a) 分解対象の遺伝子の配列に対応する二本鎖RNAとRNA干渉を媒介する可溶性抽出物とを合わせる工程、それにより混合物を生じる；および
(b) 二本鎖RNAが分解対象の遺伝子のmRNAのRNA干渉を媒介する約21～約23ヌクレオチドのRNAにプロセスされる条件下で(a)の混合物を維持する工程、それによりmRNAのRNA干渉を媒介する約21～約23ヌクレオチドのRNAを作製する、を含む、分解対象の遺伝子のmRNAのRNA干渉を媒介する約21～約23ヌクレオチド長のRNAの作製方法。

【請求項 11】 可溶性抽出物が合胞体胚葉ショウジョウバエ胚に由来するものである、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】 混合物から約21～約23ヌクレオチドのRNAを単離する工程をさらに含む、請求項 10 記載の方法。

【請求項 13】 分解対象の遺伝子のmRNAのRNA干渉を媒介する、請求項 12 記載の方法により作製された約21～約23ヌクレオチドの単離されたRNAであって、mRNAが哺乳動物細胞性である、単離されたRNA。

【請求項 14】 約21～約23ヌクレオチドのRNAを含む、細胞または生物において遺伝子のmRNAのRNA干渉を媒介する組成物であって、mRNAに配列対応を有し、細胞または生物において分解対象の遺伝子のmRNAを標的化し、RNAを導入された細胞または生物をmRNAの分解が生じる条件下で維持すると、それにより細胞または生物の遺伝子のmRNAのRNA干渉を媒介する、組成物。

【請求項 15】 RNAが化学合成されたRNAまたは天然に存在するRNAのアナログである、請求項 14 記載の組成物。

【請求項 16】 前記遺伝子が細胞性mRNAをコードする、請求項 14 記載の組成物。

【請求項 17】 約21～約23ヌクレオチドの単離されたRNAを含む、RNA干渉が生じる細胞または生物において遺伝子のmRNAのRNA干渉を媒介する組成物であって、単離されたRNAが、細胞または生物に導入されて遺伝子のmRNAの分解が生じる条件下で維持されると、それにより細胞または生物において遺伝子のmRNAのRNA干渉を媒介し、

(a) 遺伝子の配列に対応する二本鎖RNAとRNA干渉を媒介する可溶性抽出物とを合わせる工程、それにより混合物を生じる；

(b) 二本鎖RNAが約21～約23ヌクレオチドのRNAにプロセスされる条件下で(a)で作製された混合物を維持する工程、それにより約21～約23ヌクレオチドのRNAを作製する；および

(c) (b)で作製された約21～約23ヌクレオチドのRNAを単離する工程により作製される、組成物。

【請求項 18】 可溶性抽出物が、合胞体胚葉ショウジョウバエ胚に由来するものである、請求項 17 記載の組成物。

【請求項 19】 RNAがゲル電気泳動を用いて単離される、請求項 17 記載の組成物。

【請求項 20】 RNA干渉が生じる細胞または生物において遺伝子のmRNAのRNA干渉を媒介する組成物の調製のためのRNAの使用であって、該RNAが約21～約23ヌクレオチドであり、遺伝子のmRNAに配列対応を有し、遺伝子のmRNAのRNA干渉を媒介し、細胞または生物に導入される場合、それによりRNAを含む細胞または生物を生じ、RNAを含有する細胞または生物がRNA干渉の生じる条件下で維持され、それにより細胞または生物の遺伝子のmRNAのRNA干渉を媒介する、使用。

【請求項 21】 約21～約23ヌクレオチドのRNAが、RNA干渉を媒介する化学合成されたRNAまたはRNAのアナログである、請求項 20 記載の使用。

【請求項 2 2】 遺伝子が細胞性mRNAをコードするものである、請求項 2 0 記載の使用。

【請求項 2 3】 請求項 2 0 記載の使用により生じたノックダウン細胞または非ヒト生物。

【請求項 2 4】 細胞または生物が疾患を模倣するものである、請求項 2 3 記載のノックダウン細胞または非ヒト生物。

【請求項 2 5】 (a) 遺伝子のmRNAに配列対応を有し、分解対象の遺伝子のmRNAを標的化する約21～約23ヌクレオチドのRNAを細胞または非ヒト生物に導入する工程、それにより試験細胞または試験生物を作製する；

(b) 遺伝子のmRNAの分解が生じる条件下で試験細胞または試験生物を維持する工程、それにより遺伝子のmRNAが分解される試験細胞または試験生物を作製する；ならびに

(c) (b)において作製された試験細胞または試験生物の表現型を観察する工程、および任意に、観察された表現型と適切な対照細胞または対照生物の表現型とを比較する工程、それにより遺伝子の機能に関する情報を提供する、を含む、インサイチュにおいて見られるヒト細胞以外の細胞または非ヒト生物における遺伝子の機能の調査方法。

【請求項 2 6】 (a) で導入されるRNAが、化学合成されているか、またはRNA干渉を媒介するRNAのアナログである、請求項 2 5 記載の方法。

【請求項 2 7】 (a) 遺伝子の配列に対応する二本鎖RNAとRNA干渉を媒介する可溶性抽出物とを合わせる工程、それにより混合物を生じる；

(b) 二本鎖RNA が約21～約23ヌクレオチドのRNAにプロセスされる条件下で(a)で生じた混合物を維持する工程、それにより約21～約23ヌクレオチドのRNAが作製される；

(c) (b)で作製された約21～約23ヌクレオチドのRNAを単離する工程；

(d) 細胞または非ヒト生物に(c)で単離されたRNAを導入する工程、それにより試験細胞または試験生物を作製する；

(e) 遺伝子のmRNAの分解が生じる条件下で試験細胞または試験生物を維持する工程、それにより該遺伝子のmRNAが分解される試験細胞または試験生物を作製する；および

(f) (e)において作製される試験細胞または試験生物の表現型を観察する工程、および任意に、観察された表現型と適切な対照の表現型とを比較する工程、それにより遺伝子の機能に関する情報を提供する、を含む、インサイチュにおいて見られるヒト細胞以外の細胞または非ヒト生物における遺伝子の機能の調査方法。

【請求項 2 8】 RNAが末端3'ヒドロキシル基を含有してなるものである、請求項 2 7 記載の方法。

【請求項 2 9】 可溶性抽出物が合胞体胞胚葉ショウジョウバエ胚に由来するものである、請求項 2 7 記載の方法。

【請求項 3 0】 RNAがゲル電気泳動を用いて単離される、請求項 2 7 記載の方法。

【請求項 3 1】 dsRNAを約21～約23ヌクレオチドのRNAにプロセスするショウジョウバエ細胞の生化学成分および適切なキャリアを含有してなる組成物。

【請求項 3 2】 約21～約23ヌクレオチドのRNAにより分解対象の遺伝子のmRNAを標的化する細胞の生化学成分を含有してなる組成物。

【請求項 3 3】 タンパク質のmRNAを標的化する約21～約23ヌクレオチドの単離されたRNAを含む、個体におけるタンパク質の存在に関する疾患または状態を治療するための組成物であって、単離されたRNAがタンパク質に対応するmRNAに配列対応を有し、対応するmRNAの切断を標的化することでRNA干渉を媒介し、切断が単離されたRNAとの配列対応の領域内で標的化され、mRNAが哺乳動物細胞性mRNAである、組成物。

【請求項 3 4】 約21～約23ヌクレオチドの単離されたRNAが、化学合成されるRNAであるか、または天然に存在するRNAのアナログである、請求項 3 3 記載の組成物。

【請求項 3 5】 アナログが1つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換または変化を含む、請求項 3 4 記載の組成物。

【請求項 3 6】 1 つ以上のヌクレオチドが、天然には存在しないヌクレオチドを含む非標準ヌクレオチドである、請求項 3 5 記載の組成物。

【請求項 3 7】 単離されたRNAが単離された二本鎖RNAである、請求項 3 3 記載の組成物。

【請求項 3 8】 (a) 遺伝子のmRNAに配列対応を有し、分解対象の遺伝子のmRNAを標的化する約21～約23ヌクレオチドのRNAを細胞または生物に導入する工程；
(b) mRNAの分解が生じる条件下で(a)の細胞または生物を維持する工程、
(c) (b)の細胞または生物に薬剤を導入する工程；および
(d) 該薬剤が細胞または生物において効果を有するかどうかを決定する工程、ここで該薬剤が細胞または生物において効果を有さない場合、該薬剤が遺伝子産物または遺伝子産物を含む生物学的経路において作用する
を含む、薬剤が遺伝子産物に作用するかどうかを評価する方法。

【請求項 3 9】 約21～約23ヌクレオチドのRNAが、化学合成されているか、またはRNA干渉を媒介するRNAのアナログである、請求項 3 8 記載の方法。

【請求項 4 0】 (a) 遺伝子のmRNAに配列対応を有し、分解対象の遺伝子のmRNAを標的化する約21～約23ヌクレオチドのRNAを細胞または生物に導入する工程；
(b) mRNAの分解が生じる条件下で(a)の細胞または生物を維持する工程、それにより該遺伝子の発現の減少を生じる；および
(c) 細胞または生物において遺伝子の減少した発現の効果を決定する工程、ここで減少した発現が効果を有する場合、遺伝子産物が薬物発見の標的である
を含む、遺伝子産物が薬物発見に適した標的であるかどうかを評価する方法。

【請求項 4 1】 約21～約23ヌクレオチドのRNAが、合成RNAまたはRNA干渉を媒介するRNAのアナログである、請求項 4 0 記載の方法。

【請求項 4 2】 RNA干渉を媒介する内因性21～23ヌクレオチドRNA分子の配列決定により同定される遺伝子。

【請求項 4 3】 mRNAに配列対応を有し、対応するmRNAの切断を標的化することによりRNA干渉を媒介する約21～約23ヌクレオチドのRNAおよび適切なキャリアを含有してなる医薬組成物であって、切断がRNAとの配列対応の領域内で標的化され、mRNAが哺乳動物細胞性mRNAである、医薬組成物。

【請求項 4 4】 遺伝子がノックダウンされるべき細胞に、該遺伝子に対応するmRNAを標的化する約21～約23ヌクレオチドのRNAを導入する工程および得られた細胞をRNAiが生じる条件下で維持する工程を含み、該遺伝子のmRNAの分解を生じ、それによりノックダウン細胞を作製する、ノックダウン細胞の作製方法。

【請求項 4 5】 約21～約23ヌクレオチドのRNAが、RNA干渉を媒介する合成RNAまたはRNAのアナログである、請求項 4 4 記載の方法。

【請求項 4 6】 約21～約23ヌクレオチド長であり、分解対象の遺伝子の配列に対応する二本鎖RNA、該遺伝子に対応する標識mRNAおよびRNA干渉を媒介する可溶性抽出物を含む工程、それにより混合物を生じる；mRNAが分解される条件下で混合物を維持する工程および効率的に切断されるmRNA中の部位を同定する工程を含む、RNAiプロセスにより効率的に切断されるmRNA内の標的部位を同定する方法。

【請求項 4 7】 請求項 4 6 記載の方法を実施することによりmRNA内に同定される標的部位にわたる、RNAiを効率的に媒介する21～23ヌクレオチドRNAを同定する方法であって、標的部位にわたる21～23ヌクレオチドRNAを同定する工程をさらに含む、方法。

【請求項 4 8】 ゲル電気泳動を用いて単離された請求項 1 3 記載のRNA。

【請求項 4 9】 非変性法を用いて単離された請求項 1 3 記載のRNA。

【請求項 5 0】 非変性カラムクロマトグラフィーを用いて単離された請求項 1 3 記載のRNA。

【請求項 5 1】 RNAが組換えDNA法により細胞または生物に導入される、請求項 1 4 または 2 0 記載の組成物。

【請求項 5 2】 RNAが該RNAをコードするDNAとして細胞または生物に導入される、

請求項 5 1 記載の組成物。

【請求項 5 3】 DNAにコードされるRNAが約21～約23ヌクレオチド長のRNAセグメントにプロセスされる、請求項 5 2 記載の組成物。

【請求項 5 4】 RNAが組換えDNA法により細胞または生物に導入される、請求項 2 5 記載の方法。

【請求項 5 5】 RNAが該RNAをコードするDNAとして細胞または生物に導入される、請求項 5 4 記載の方法。

【請求項 5 6】 DNAにコードされるRNAが約21～約23ヌクレオチド長のRNAセグメントにプロセスされる、請求項 5 5 記載の方法。

【請求項 5 7】 RNAが組換えDNA法により個体に投与される、請求項 5 6 記載の方法。

【請求項 5 8】 RNAが該RNAをコードするDNAとして個体に投与される、請求項 5 7 記載の方法。

【請求項 5 9】 DNAにコードされるRNAが約21～約23ヌクレオチド長のRNAセグメントにプロセスされる、請求項 5 8 記載の方法。

【請求項 6 0】 RNAが組換えDNA法により細胞または生物に導入される、請求項 3 8 または 4 0 記載の方法。

【請求項 6 1】 RNAが該RNAをコードするDNAとして細胞または生物に導入される、請求項 6 0 記載の方法。

【請求項 6 2】 DNAにコードされるRNAが約21～約23ヌクレオチド長のRNAセグメントにプロセスされる、請求項 6 1 記載の方法。

【請求項 6 3】 RNAが組換えDNA法により細胞に導入される、請求項 4 4 記載の方法。

【請求項 6 4】 RNAが該RNAをコードするDNAとして細胞に導入される、請求項 6 3 記載の方法。

【請求項 6 5】 DNAにコードされるRNAが約21～約23ヌクレオチドのRNAセグメントにプロセスされる、請求項 6 4 記載の方法。

【請求項 6 6】 RNAセグメントが対応するmRNAの切断を標的化することによりRNA干渉を媒介する医薬組成物の製造のための、mRNAに配列対応を有し、真核細胞中で約21～約23ヌクレオチド長のRNAセグメントにプロセスされるRNAをコードするDNAを含む単離されたDNAの使用であって、切断がRNAとの配列対応の領域内で標的化され、mRNAが哺乳動物細胞性mRNAである、使用。

【請求項 6 7】 RNAが二本鎖である、請求項 6 6 記載の使用。

【請求項 6 8】 哺乳動物細胞性mRNAである遺伝子のmRNAのRNA干渉を媒介する医薬組成物の製造のための、mRNAに配列対応を有し、真核細胞中で約21～約23ヌクレオチド長のRNAセグメントにプロセスされるRNAをコードするDNAを含有する単離されたDNAの使用。

【請求項 6 9】 哺乳動物細胞性mRNAである分解対象のタンパク質のmRNAを標的化する医薬組成物の製造のための、mRNAに配列対応を有し、真核細胞中で約21～約23ヌクレオチド長のRNAセグメントにプロセスされるRNAをコードするDNAを含有する単離されたDNAの使用。

【請求項 7 0】 対応するmRNAの切断を標的化することでRNA干渉を媒介するための、mRNAに配列対応を有し、共有結合しない二本の別々のRNA鎖の形状である21～23ヌクレオチドの単離された二本鎖RNAであって、切断が単離されたRNAとの配列対応の領域内で標的化され、mRNAが哺乳動物細胞性mRNAである、単離された二本鎖RNA。

【請求項 7 1】 末端3'ヒドロキシル基を含有してなる、請求項 7 0 記載の単離された二本鎖RNA。

【請求項 7 2】 対応するmRNAの切断を標的化することでRNA干渉を媒介するための、mRNAに配列対応を有し、共有結合しない二本の別々のRNA鎖の形状の化学合成されたRNAである21～23ヌクレオチドの単離された二本鎖RNAであって、切断が単離されたRNAとの配列対応の領域内で標的化され、mRNAが哺乳動物細胞性mRNAである、単離された二本鎖RNA

°

【請求項 7 3】 対応するmRNAの切断を標的化することでRNA干渉を媒介するための、mRNAに配列対応を有し、共有結合しない二本の別々のRNA鎖の形状である21～23ヌクレオチドの単離された二本鎖RNAおよび適切なキャリアを含有する組成物であって、切断が単離されたRNAとの配列対応の領域内で標的化され、mRNAが哺乳動物細胞性mRNAである、組成物。

【請求項 7 4】 対応するmRNAの切断を標的化することでRNA干渉を媒介するための、mRNAに配列対応を有し、共有結合しない二本の別々のRNA鎖の形状である21～23ヌクレオチドの単離された二本鎖RNAであって、単離されたRNAが21～23ヌクレオチドのフラグメントに切断された二本鎖RNAから得られ、mRNAの切断が単離されたRNAとの配列対応の領域内で標的化され、mRNAが哺乳動物細胞性mRNAである、単離された二本鎖RNA。

【請求項 7 5】 末端3'ヒドロキシル基を含有してなる、請求項 7 4 記載の単離されたRNA。

【請求項 7 6】 対応するmRNAの切断を標的化することでRNA干渉を媒介するための、mRNAに配列対応を有し、共有結合しない二本の別々のRNA鎖の形状の化学合成されたRNAである21～23ヌクレオチドの単離された二本鎖RNAであって、単離されたRNAが21～23ヌクレオチドのフラグメントに切断された二本鎖RNAから得られ、mRNAの切断が単離されたRNAとの配列対応の領域内で標的化され、mRNAが哺乳動物細胞性mRNAである、単離された二本鎖RNA。

【請求項 7 7】 キャリアを含み、かつ対応するmRNAのRNA干渉を媒介するための、mRNAに配列対応を有し、共有結合しない二本の別々のRNA鎖の形状である21～23ヌクレオチドの単離された二本鎖RNAを含む組成物であって、単離されたRNAが21～23ヌクレオチドのフラグメントに切断された二本鎖RNAから得られ、mRNAが哺乳動物細胞性mRNAである、組成物。

【請求項 7 8】 mRNAに完全に相補的である、請求項 7 0 ～ 7 7 いずれか記載の単離されたRNA。

【請求項 7 9】 対応するmRNAの切断を標的化することでRNA干渉を媒介するための、mRNAに十分な配列対応を有し、共有結合しない二本の別々のRNA鎖の形状である21～23ヌクレオチドの単離された二本鎖RNAであって、切断が単離されたRNAとの配列対応の領域内で標的化され、mRNAが哺乳動物細胞性mRNAであり、単離されたRNAの1つ以上のヌクレオチドが天然には存在しないヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドまたは非標準ヌクレオチドである、二本鎖RNA。

【請求項 8 0】 対応するmRNAの切断を標的化することでRNA干渉を媒介するための、mRNAに十分な配列対応を有し、共有結合しない二本の別々のRNA鎖の形状である21～23ヌクレオチドの単離された二本鎖RNAであって、単離されたRNAが21～23ヌクレオチドのフラグメントに切断された二本鎖RNAから得られ、mRNAの切断が単離されたRNAとの配列対応の領域内で標的化され、mRNAが哺乳動物細胞性mRNAであり、単離されたRNAの1つ以上のヌクレオチドが天然には存在しないヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドまたは非標準ヌクレオチドである、単離された二本鎖RNA。

【請求項 8 1】 21～23ヌクレオチド長である、請求項 7 0 ～ 7 7、7 9 または 8 0 のいずれか記載の単離されたRNA。

【請求項 8 2】 ヒトRNAである、請求項 7 9 または 8 0 記載の単離されたRNA。

【請求項 8 3】 mRNAがヒトmRNAである、請求項 7 0 ～ 7 2、7 5 または 7 9 ～ 8 2 のいずれか記載の単離されたRNA。

【請求項 8 4】 末端3'ヒドロキシル基を含有してなる、請求項 7 9 または 8 0 記載の単離されたRNA。

【請求項 8 5】 許容され得るキャリアを含み、かつ請求項 7 9 または 8 0 記載の単離されたRNAを含有してなる組成物。