

【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6月8日(2006.6.8)

【公表番号】特表2004-526422(P2004-526422A)

【公表日】平成16年9月2日(2004.9.2)

【年通号数】公開・登録公報2004-034

【出願番号】特願2002-546670(P2002-546670)

【国際特許分類】

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

**A 0 1 H 5/00 (2006.01)**

**A 0 1 K 67/027 (2006.01)**

**A 6 1 K 31/7105 (2006.01)**

**A 6 1 K 45/00 (2006.01)**

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

**A 6 1 P 31/12 (2006.01)**

**A 6 1 P 35/00 (2006.01)**

**A 6 1 P 37/02 (2006.01)**

**C 1 2 P 21/02 (2006.01)**

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

**C 1 2 Q 1/68 (2006.01)**

**G 0 1 N 33/15 (2006.01)**

**G 0 1 N 33/50 (2006.01)**

**G 0 1 N 33/68 (2006.01)**

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

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 0 1 H 5/00 A

A 0 1 K 67/027

A 6 1 K 31/7105

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 31/12

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 37/02

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 Q 1/68 Z

G 0 1 N 33/15 Z

G 0 1 N 33/50 P

G 0 1 N 33/50 Z

G 0 1 N 33/68

C 1 2 N 5/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成18年4月13日(2006.4.13)

【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】

単離された二本鎖 RNA 分子であって、各 RNA 鎖が 19 ~ 25 塩基長を有し、少なくとも 1 つの鎖が 1 ~ 5 塩基からなる 3' 突出部を有するものであり、該 RNA 分子は標的特異的な核酸改変が可能なものである、上記 RNA 分子。

## 【請求項 2】

標的特異的 RNA 干渉および / または DNA メチル化が可能である、請求項 1 に記載の RNA 分子。

## 【請求項 3】

各鎖が、19 ~ 23、特に 20 ~ 22 塩基長を有する、請求項 1 または 2 に記載の RNA 分子。

## 【請求項 4】

3' 突出部が 1 ~ 3 塩基からなる、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の RNA 分子。

## 【請求項 5】

3' 突出部が分解に対して安定化されている、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の RNA 分子。

## 【請求項 6】

少なくとも 1 つの修飾されたヌクレオチド類似体を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の RNA 分子。

## 【請求項 7】

修飾ヌクレオチド類似体が、糖または骨格鎖修飾リボヌクレオチドから選択される、請求項 6 に記載の RNA 分子。

## 【請求項 8】

ヌクレオチド類似体が、糖修飾リボヌクレオチドであり、2' - OH 基は、H、OR、R、ハロ、SH、SR<sup>1</sup>、NH<sub>2</sub>、NHR、NR<sub>2</sub> または CN から選択される基で置換され、R は、C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキル、アルケニルまたはアルキニルであり、ハロは、F、Cl、Br または I である、請求項 6 または 7 に記載の RNA 分子。

## 【請求項 9】

ヌクレオチド類似体が、ホスホチオエート基を含む骨格鎖修飾リボヌクレオチドである、請求項 6 または 7 に記載の RNA 分子。

## 【請求項 10】

予め決定した mRNA 標的分子に対して、少なくとも 50 % の同一性を有する配列を有する、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の RNA 分子。

## 【請求項 11】

同一性が少なくとも 70 % である、請求項 10 に記載の RNA 分子。

## 【請求項 12】

下記のステップを含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の二本鎖 RNA 分子の作製方法：

(a) 各々が 19 ~ 25 塩基長を有する 2 本の RNA 鎖を合成するステップであって、この RNA 鎖は二本鎖 RNA 分子を形成することができるものである、上記ステップ、

(b) 二本鎖 RNA 分子が形成される条件下で合成 RNA 鎖を結合させるステップであって、得られる二本鎖 RNA 分子は標的特異的な核酸改変が可能なものである、上記ステップ。

## 【請求項 13】

RNA 鎖が化学的に合成される、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 14】

RNA 鎖が酵素により合成される、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 15】

下記のステップを含む、細胞または生物において標的特異的な核酸改変を媒介する方法

:

- (a) 標的特異的な核酸改変が起こりうる条件下で、上記細胞または生物を請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の二本鎖 RNA 分子と接触させるステップ、  
(b) 上記二本鎖 RNA と実質的に対応する配列部分を有する標的核酸に対する、上記二本鎖 RNA により引き起こされる標的特異的な核酸改変を媒介するステップ。

【請求項 16】

核酸改変が RNA 干渉および / または DNA メチル化である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

接触ステップが、二本鎖 RNA 分子を標的細胞に導入し、そこで標的特異的な核酸改変を起こさせるステップを含む、請求項 15 および 16 に記載の方法。

【請求項 18】

導入ステップが、キャリア媒介による送達または注射を含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

細胞または生物における遺伝子の機能を決定するための、請求項 15 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法の使用。

【請求項 20】

細胞または生物における遺伝子の機能を調節するための、請求項 15 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法の使用。

【請求項 21】

遺伝子が病理的状态と関連する、請求項 19 または 20 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 22】

遺伝子が病原体関連遺伝子である、請求項 21 に記載の使用。

【請求項 23】

遺伝子がウイルス遺伝子である、請求項 22 に記載の使用。

【請求項 24】

遺伝子が腫瘍関連遺伝子である、請求項 21 に記載の使用。

【請求項 25】

遺伝子が自己免疫疾患関連遺伝子である、請求項 21 に記載の使用。

【請求項 26】

有効物質としての請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つの二本鎖 RNA 分子と、薬学的キャリアを含む、医薬組成物。

【請求項 27】

診断用途に用いる請求項 26 に記載の組成物。

【請求項 28】

治療用途に用いる請求項 26 に記載の組成物。

【請求項 29】

請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の RNA 分子でトランスフェクトされた真核細胞又はヒト以外の真核生物。

【請求項 30】

標的遺伝子特異的ノックアウト表現型を示す真核細胞またはヒト以外の真核生物であって、この細胞または生物が、内因性標的遺伝子の発現を阻害しうる少なくとも 1 つの二本鎖 RNA 分子、または少なくとも 1 つの内因性標的遺伝子の発現を阻害しうる少なくとも 1 つの二本鎖 RNA 分子をコードする DNA でトランスフェクトされているものであり、該二本鎖 RNA 分子は、各 RNA 鎖が 19 ~ 25 塩基長を有し、少なくとも 1 つの鎖が 1 ~ 5 塩基からなる 3' 突出部を有するものである、該上記細胞または生物。

【請求項 31】

哺乳動物細胞である、請求項 29 または 30 に記載の細胞または生物。

【請求項 32】

ヒト細胞である、請求項 3 1 に記載の細胞または生物。

【請求項 3 3】

標的タンパク質、または該標的タンパク質の変異体もしくは突然変異形態をコードする少なくとも 1 つの外因性標的核酸でさらにトランスフェクトされた、請求項 2 9 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の細胞または生物であって、この外因性標的核酸は、二本鎖 R N A 分子による該外因性標的核酸の発現の阻害が、内因性標的遺伝子の発現より実質的に低いという点で、該内因性標的遺伝子とは核酸レベルで異なるものである、上記細胞または生物。

【請求項 3 4】

外因性標的核酸が、検出可能なペプチドまたはポリペプチドをコードするさらに別の核酸配列と融合される、請求項 3 3 に記載の細胞または生物。

【請求項 3 5】

分析手法のための、請求項 2 9 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の細胞または生物の使用。

【請求項 3 6】

遺伝子発現プロファイルを分析するための、請求項 3 5 に記載の使用。

【請求項 3 7】

プロテオーム分析のための、請求項 3 5 に記載の使用。

【請求項 3 8】

外因性標的核酸によってコードされる標識タンパク質の変異体または突然変異形態の分析が実施される、請求項 3 5 ~ 3 7 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 3 9】

標的タンパク質の機能ドメインを同定するための、請求項 3 8 に記載の使用。

【請求項 4 0】

下記のものから選択される少なくとも 2 つの細胞または生物の比較を実施する、請求項 3 5 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の使用：

( i ) 標的遺伝子阻害を含まない対照細胞または対照生物、

( i i ) 標的遺伝子阻害を含む細胞または生物、および

( i i i ) 標的遺伝子阻害と、外因性標的核酸による標的遺伝子の相補を含む細胞または生物。

【請求項 4 1】

分析が、機能および / または表現型の分析を含む、請求項 3 5 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 4 2】

調製手法のための、請求項 2 9 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の細胞または生物の使用。

【請求項 4 3】

真核細胞からタンパク質またはタンパク質複合体を単離するための、請求項 4 2 に記載の使用。

【請求項 4 4】

場合によっては核酸を含んでもよい高分子量タンパク質複合体を単離するための、請求項 4 3 に記載の使用。

【請求項 4 5】

薬理学的物質を同定および / または特性決定する手法における、請求項 3 5 ~ 4 4 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 4 6】

下記の ( a ) ~ ( c ) を含む、少なくとも 1 つの標的タンパク質に作用する薬理学的物質の同定および / または特性決定システム：

( a ) 少なくとも 1 つの標的タンパク質をコードする少なくとも 1 つの標的遺伝子を発現することができる、真核細胞またはヒト以外の真核生物、

( b ) 上記少なくとも 1 つの内因性標的遺伝子の発現を阻害することができる、少なくとも 1 つの二本鎖 R N A 分子であって、該二本鎖 R N A 分子は、各 R N A 鎖が 1 9 ~ 2 5 塩

基長を有し、少なくとも 1 つの鎖は 1 ～ 5 塩基からなる 3' 突出部を有するものである、上記 R N A 分子、および

( c ) 薬理学的特性を同定および / または特性決定しようとする、試験物質または試験物質のコレクション。

【請求項 4 7】

さらに下記の ( d ) を含む、請求項 4 6 に記載のシステム：

( d ) 上記標的タンパク質または該標的タンパク質の変異体もしくは突然変異形態をコードする少なくとも 1 つの外因性標的核酸であって、この外因性標的核酸は、二本鎖 R N A 分子による発現の阻害が、上記内因性標的遺伝子の発現より実質的に低いという点で、該内因性標的遺伝子とは核酸レベルで異なるものである、上記外因性標的核酸。