

【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23年11月10日 (2011.11.10)

【公表番号】特表2010-539895(P2010-539895A)

【公表日】平成22年12月24日 (2010.12.24)

【年通号数】公開・登録公報2010-051

【出願番号】特願2010-525439(P2010-525439)

【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 1/15 (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 Q 1/68 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 31/12 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 37/06 (2006.01)

A 6 1 K 31/7105 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 35/12 (2006.01)

G 0 1 N 33/58 (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 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/00 1 0 1

C 1 2 Q 1/68 A

A 6 1 P 43/00 1 0 1

A 6 1 P 31/12

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 37/06

A 6 1 K 31/7105

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 35/12

G 0 1 N 33/58 Z

【手続補正書】

【提出日】平成23年9月21日 (2011.9.21)

【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】

標的核酸の発現を調節する方法であって、前記核酸を s n o R N A または修飾 s n o R N A と、前記 s n o R N A 若しくは修飾 s n o R N A および / またはその断片が標的核酸の一部とハイブリダイズすることができる条件下で接触させるステップを含み、前記 s n o R N A またはその断片の前記核酸の一部とのハイブリダイゼーションが前記標的核酸の発現および / または機能を調節する、方法。

【請求項 2】

前記標的核酸配列が R N A 配列である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 s n o R N A 分子が、いわゆるボックス C / D - s n o R N A またはボックス H / A C A - s n o R N A を含む細胞 s n o R N A に基づく、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記ボックス C / D s n o R N A が、L . c o l l o s o m a b 2 ( G e n B a n k アクセション番号 A F 3 3 1 6 5 6 )、L . c o l l o s o m a B 3 ( G e n B a n k アクセション番号 A Y 0 4 6 5 9 8 )、L . c o l l o s o m a B 4 ( G e n B a n k アクセション番号 A Y 0 4 6 5 9 8 )、L . c o l l o s o m a B 5 ( G e n B a n k アクセション番号 A Y 0 4 6 5 9 8 )、L . c o l l o s o m a T S 1 ( G e n B a n k アクセション番号 A F 3 3 1 6 5 6 )、L . c o l l o s o m a T S 2 ( G e n B a n k アクセション番号 A F 3 3 1 6 5 6 )、L . c o l l o s o m a g 2 ( G e n B a n k アクセション番号 A F 3 3 1 6 5 6 )、L . c o l l o s o m a s n o R N A - 2 ( G e n B a n k アクセション番号 A F 0 5 0 0 9 5 )、T . b r u c e i s n o R N A 9 2 ( G e n B a n k アクセション番号 Z 5 0 1 7 1、L . t a r e n t o l a e s n o R N A 9 2 ( G e n B a n k アクセション番号 A F 0 1 6 3 9 9 )、T . b r u c e i T B C 4 s n o R N A ( S E Q I D N O : 3 5 )、T . b r u c e i s n o 2 7 0 ( G e n B a n k アクセション番号 Z 5 0 1 7 1 ) およびヒト U 1 4 s n o R N A ( G e n B a n k アクセション番号 N R \_ 0 0 0 0 2 2 ) を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

ボックス C / D s n o R N A に一般的に見出される 1 つ以上の D / D ' ボックス核酸配列を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記少なくとも 1 つ以上の D および / または D ' ボックスが、例えば、5 ' - C U G A - 3 '、5 ' - A U G A - 3 '、5 ' - C C G A - 3 '、5 ' - C A G A - 3 '、5 ' - C U U A - 3 '、5 ' - U U G G - 3 ' および 5 ' - C A G C - 3 ' から選択される配列を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記修飾 s n o R N A 分子が、ボックス C 配列および / または、任意に、2 8 S r R N A 若しくは s n o R N A 修飾の他の生理学的標的と相補的な更なる領域を更に含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記 s n o R N A をコードする配列が、確立された s n o R N A プロセッシング経路に従ってイントロンからのプロセッシングを供与するために必要な構造要素を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 9】

前記ボックス C 配列が 5 ~ 9 ヌクレオチド長である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

標的 R N A 配列の一部と実質的に相補的な前記配列が、イントロン若しくはエクソン配列、またはイントロン - エクソン結合配列、または前記標的核酸の 5 ' 若しくは 3 ' 非翻訳領域内の領域若しくはその接合部における領域と実質的に相補的である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 1 1】

前記標的RNA配列の一部と実質的に相補的な前記核酸配列が、通常、15～45ヌクレオチド長である、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 1 2】

前記標的RNA配列が、mRNA, tRNA, miRNAまたはrRNA配列またはRNAウイルスゲノム配列またはこれらから生じる転写産物である、請求項2に記載の方法。

## 【請求項 1 3】

前記修飾snRNA分子が、標的核酸分子とハイブリダイズするように設計された2つ以上の配列を含む、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 1 4】

前記標的核酸分子とハイブリダイズするように設計された2つ以上の配列が、同じ標的核酸分子の異なる部分または異なる標的核酸分子を標的とすることができる、請求項13に記載の方法。

## 【請求項 1 5】

標的核酸の発現の調節に用いる修飾snRNA配列であって、前記標的核酸の一部とハイブリダイズし、且つ前記標的核酸の発現を調節するための、前記標的配列の一部と実質的に相補的な核酸配列を含む、修飾snRNA配列。

## 【請求項 1 6】

前記標的核酸配列がRNA配列である、請求項15に記載の修飾snRNA配列。

## 【請求項 1 7】

前記snRNA分子が、いわゆるボックスC/D-snRNAまたはボックスH/AACA-snRNAを含む細胞snRNAに基づく、請求項15または16に記載の修飾snRNA配列。

## 【請求項 1 8】

前記ボックスC/D snRNAが、L. collusoma b2 (GenBankアクセッション番号AF331656)、L. collusoma B3 (GenBankアクセッション番号AY046598)、L. collusoma B4 (GenBankアクセッション番号AY046598)、L. collusoma B5 (GenBankアクセッション番号AY046598)、L. collusoma TS1 (GenBankアクセッション番号AF331656)、L. collusoma TS2 (GenBankアクセッション番号AF331656)、L. collusoma g2 (GenBankアクセッション番号AF331656)、L. collusoma snRNA-2 (GenBankアクセッション番号AF050095)、T. brucei snRNA 92 (GenBankアクセッション番号Z50171)、L. tarentolae snRNA 92 (GenBankアクセッション番号AF016399)、T. brucei TBC4 snRNA (SEQ ID NO: 35)、T. brucei sno 270 (GenBankアクセッション番号Z50171)およびヒトU14 snRNA (GenBankアクセッション番号NR\_000022)を含む、請求項17に記載の修飾snRNA。

## 【請求項 1 9】

ボックスC/D snRNAに一般的に見出される1つ以上のD/D'ボックス核酸配列を含む、請求項15～18のいずれか1項に記載の修飾snRNA。

## 【請求項 2 0】

前記少なくとも1つ以上のDおよび/またはD'ボックスが、例えば、5'-CUGA-3'、5'-AUGA-3'、5'-CCGA-3'、5'-CAGA-3'、5'-CUUA-3'、5'-UUGG-3'および5'-CAGC-3'から選択される配列を含む、請求項19に記載の修飾snRNA。

## 【請求項 2 1】

前記修飾snRNA分子が、ボックスC配列および/または、任意に、28S rR

NA 若しくは snoRNA 修飾の他の生理学的標的と相補的な更なる領域を更に含む、請求項 15 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の修飾 snoRNA。

【請求項 22】

前記 snoRNA をコードする配列が、確立された snoRNA プロセッシング経路に従ってイントロンからのプロセッシングを供与するために必要な構造要素を含む、請求項 17 に記載の修飾 snoRNA。

【請求項 23】

前記ボックス C 配列が 5 ~ 9 ヌクレオチド長である、請求項 21 に記載の修飾 snoRNA。

【請求項 24】

標的 RNA 配列の一部と実質的に相補的な前記配列が、イントロン若しくはエクソン配列、またはイントロン - エクソン結合配列、または前記標的核酸の 5' 若しくは 3' 非翻訳領域内の領域若しくはその接合部における領域と実質的に相補的である、請求項 15 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の修飾 snoRNA。

【請求項 25】

前記標的 RNA 配列の一部と実質的に相補的な前記核酸配列が、通常、15 ~ 45 ヌクレオチド長である、請求項 15 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の修飾 snoRNA。

【請求項 26】

前記標的 RNA 配列が、mRNA, tRNA, miRNA または rRNA 配列または RNA ウイルスゲノム配列またはそれから生じる転写産物である、請求項 16 に記載の修飾 snoRNA。

【請求項 27】

前記修飾 snoRNA 分子が、標的核酸分子とハイブリダイズするように設計された 2 つ以上の配列を含む、請求項 15 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の修飾 snoRNA。

【請求項 28】

前記標的核酸分子とハイブリダイズするように設計された 2 つ以上の配列が、同じ標的核酸分子の異なる部分または異なる標的核酸分子を標的とすることができる、請求項 27 に記載の修飾 snoRNA。

【請求項 29】

請求項 15 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つの修飾 snoRNA 分子を発現することができる、プラスミドおよびウイルスベクターを含む核酸構築物。

【請求項 30】

修飾 snoRNA をコードすることができるイントロンの核酸の領域に隣接するエクソンの核酸の少なくとも 2 つの領域を含む、請求項 29 に記載の核酸構築物。

【請求項 31】

前記核酸構築物が、1 つ以上の snoRNA をコードすることができる配列を含む 2 つ以上のイントロン配列に隣接する多数のエクソン配列を含む、請求項 29 または 30 に記載の核酸構築物。

【請求項 32】

前記構築物が、単一の構築物として形成され、標的細胞内における転写と同時に、エクソン配列に対応する mRNA の生成およびイントロン配列のスプライシングアウトおよびその後の修飾 snoRNA の生成をもたらす、請求項 31 に記載の核酸構築物。

【請求項 33】

2 つ以上の snoRNA 配列を生成するために 2 つ以上のイントロン配列が用いられ、各 snoRNA が同じまたは異なる標的 RNA 分子を標的とするように設計された、請求項 29 ~ 32 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 34】

前記核酸構築物が形質転換され、またはトランスフェクトされた細胞の同定を容易にするための選択マーカー遺伝子を更に含む、請求項 29 ~ 33 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

**【請求項 35】**

少なくとも1つのプロモーター、例えば、構成的または制御可能なプロモーターを含む、請求項29～34のいずれか1項に記載の核酸構築物。

**【請求項 36】**

宿主細胞のゲノムへの部位特異的組込みを容易にするように設計された部位特異的組換え部位を更に含む、請求項29～35のいずれか1項に記載の核酸構築物。

**【請求項 37】**

請求項29～36のいずれか1項に記載の核酸構築物で形質転換され、またはトランスフェクトされる宿主細胞。

**【請求項 38】**

前記細胞が、真核細胞、特に哺乳動物細胞（例えば、HeLa細胞、Cos細胞）、酵母細胞（例えば、AH109, HHY10, KDY80）昆虫細胞（例えば、Sf9）、トリパノソーマ細胞（例えば、L.collosoma, L.major, T.bruc ei 29-13）、細菌細胞（例えば、JM109, RP437, MM509, SW10）または植物細胞から選択される、請求項37に記載の宿主細胞。

**【請求項 39】**

修飾snRNA分子を生成するのに用いる核酸ベクター構築物であって、5'から3'方向に、

i) 転写を制御するためのプロモーター配列と、

ii) 第一のエクソン配列と、

iii) 第一のイントロンスプライシング配列と、

iv) 請求項15～28のいずれか1項に記載の修飾snRNAをコードする核酸配列のクローニングを促進するためのクローニング部位または配列と、

v) 第二のイントロンスプライシング配列と、

vi) 第二のエクソン配列と

を含む、核酸ベクター構築物。

**【請求項 40】**

5'から3'方向に、

vii) 第三の、または更なるイントロンスプライシング配列と、

viii) 請求項15～28のいずれか1項に記載の修飾snRNAをコードする核酸配列のクローニングを促進するための第二の、または更なるクローニング部位または配列と、

ix) 第四の、または更なるイントロンスプライシング配列と、

x) 第三の、または更なるエクソン配列と

を更に含む、請求項39に記載の核酸ベクター構築物。

**【請求項 41】**

標的RNAまたは前記1つ以上のsnRNAによって調節されるタンパク質を機能的に置換するためにタンパク質、RNA、標識タンパク質、変異タンパク質などをコードする発現可能なコード配列を更に含む、請求項39または40に記載の核酸ベクター構築物。

**【請求項 42】**

前記snRNA核酸および、標的RNA若しくは前記1つ以上のsnRNAによって調節されるタンパク質を機能的に置換するためにタンパク質、RNA、標識タンパク質、変異タンパク質などをコードする発現可能なコード配列が、同じプロモーターの制御下にあり、単一の転写物として発現される、請求項41に記載の核酸ベクター構築物。

**【請求項 43】**

標的核酸の発現を調節し、特に下方制御することが望ましい患者における疾患または病状を処置するのに用いる、snRNA、修飾snRNA、snRNA若しくは修飾snRNAをコードする核酸構築物、またはsnRNA若しくは修飾snRNAを発現することができる細胞。

## 【請求項 4 4】

s n o R N A、修飾 s n o R N A、s n o R N A 若しくは修飾 s n o R N A をコードする核酸構築物、または s n o R N A 若しくは修飾 s n o R N A を発現することができる細胞、および医薬的に許容可能な担体を含む、医薬組成物。

## 【請求項 4 5】

請求項 1 5 ~ 4 2 のいずれか 1 項に記載の修飾 s n o R N A、s n o R N A 若しくは修飾 s n o R N A をコードする核酸構築物、または s n o R N A 若しくは修飾 s n o R N A を発現することができる細胞を含む、請求項 4 3 または 4 4 に記載の生成物または組成物。

## 【請求項 4 6】

変異表現型を評価し、または薬物スクリーニング戦略を支援し、または標的を検証し、既存の未標識細胞型からの競合なしに標識形態のタンパク質を分析するための、または他の適用若しくは研究用途のための、請求項 4 1 または 4 2 に記載のベクターの使用。