

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02012/165653

発行日 平成27年2月23日 (2015. 2. 23)

(43) 国際公開日 平成24年12月6日 (2012. 12. 6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A G	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 6 3
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C O 7 6
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 4
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	4 C O 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 34 頁) 最終頁に続く

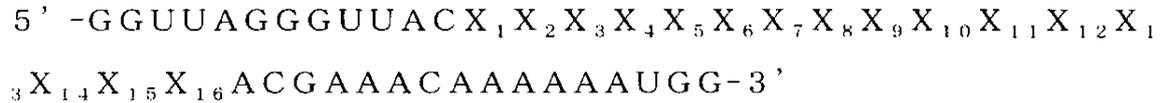
出願番号 特願2013-518196 (P2013-518196)	(71) 出願人 304027349 国立大学法人豊橋技術科学大学 愛知県豊橋市天伯町雲雀ヶ丘 1-1
(21) 国際出願番号 PCT/JP2012/064491	
(22) 国際出願日 平成24年5月30日 (2012. 5. 30)	
(31) 優先権主張番号 特願2011-120806 (P2011-120806)	(74) 代理人 100140109 弁理士 小野 新次郎
(32) 優先日 平成23年5月30日 (2011. 5. 30)	(74) 代理人 100075270 弁理士 小林 泰
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100101373 弁理士 竹内 茂雄
	(74) 代理人 100118902 弁理士 山本 修
	(74) 代理人 100107386 弁理士 泉谷 玲子
	(74) 代理人 100162455 弁理士 辻本 典子
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改良されたオリゴヌクレオチドおよびそのオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物

(57) 【要約】

本発明の課題は、簡便に製造できると共にヌクレアーゼ耐性を備える天然型の直鎖状 RNA 分子を提供することである。

本発明は下記の一般式 1



(一般式 1 において X₁ から X₁₆ はそれぞれ独立にアデニン、シトシン、グアニン、ウラシルのうちのいずれかの塩基を表す)

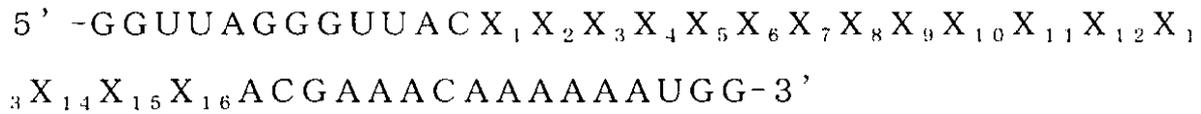
に示される塩基配列、あるいはこの配列中において 1 から複数個の塩基の変異を有する塩基配列を含み、ヌクレアーゼ耐性能を有することを特徴とする RNA 分子を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記、一般式 1

【化 1】



(一般式 1 において X_1 から X_{16} はそれぞれ独立にアデニン、シトシン、グアニン、ウ
 ラシルのうちのいずれかの塩基を表す)

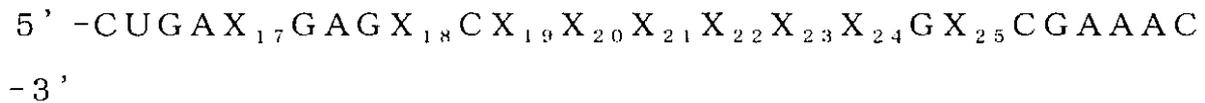
10

に示される塩基配列、あるいはこの配列中において 1 から複数個の塩基の変異を有する塩
 基配列を含み、ヌクレアーゼ耐性能を有することを特徴とする RNA 分子。

【請求項 2】

下記、一般式 2

【化 2】



(一般式 2 において X_{17} から X_{25} はそれぞれ独立にアデニン、シトシン、グアニン、
 ウラシルのうちのいずれかの塩基を表す)

20

で示されるハンマーヘッドリボザイムの共通配列を有することを特徴とする請求項 1 に記
 載の RNA 分子。

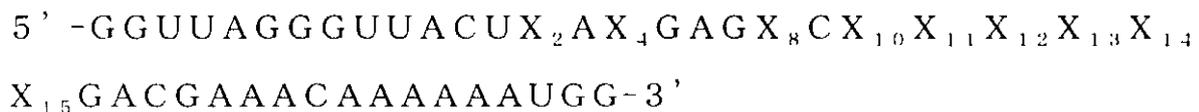
【請求項 3】

ヒトテロメラーゼの RNA 鋳型領域にハイブリダイズする塩基配列を有することを特徴
 とする請求項 1 または請求項 2 に記載の RNA 分子。

【請求項 4】

下記、一般式 3

【化 3】



30

(一般式 3 において X_2 、 X_4 、 X_8 、 X_{10} から X_{15} はそれぞれ独立にアデニン、シ
 トシン、グアニン、ウラシルのうちのいずれかの塩基を表す)

に示される塩基配列、あるいはこの配列中において 1 から複数個の塩基の変異を有する塩
 基配列を含み、ヌクレアーゼ耐性能を有することを特徴とする請求項 1 から 3 のいずれか
 1 項に記載の RNA 分子。

【請求項 5】

下記、一般式 4

【化 4】



40

(一般式 4 において X_2 、 X_{12} 、 X_{13} はそれぞれ独立にアデニン、シトシン、グアニ
 ン、ウラシルのうちのいずれかの塩基を表す)

に示される塩基配列、あるいはこの配列中において 1 から複数個の塩基の変異を有する塩
 基配列を含み、ヌクレアーゼ耐性能を有することを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれか
 1 項に記載の RNA 分子。

50

【請求項 6】

5'側末端の配列がGG、G、AまたはGGGであることを特徴とする請求項1から5のいずれか1項に記載のRNA分子。

【請求項 7】

一般式1の塩基配列のうち39以上の塩基を備える直鎖状のRNA分子であることを特徴とする請求項1から6のいずれか1項に記載のRNA分子。

【請求項 8】

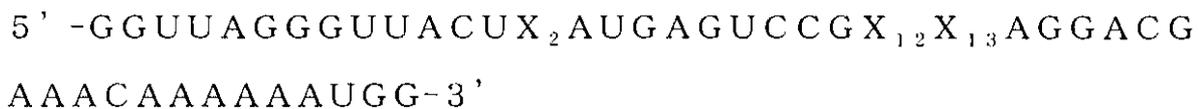
ヌクレオチドの糖部位の少なくとも一部がハロゲンあるいはアルコキシ基により置換されている、リン酸骨格構造の少なくとも一部が、蛍光物質、ポリエチレングリコールのいずれかにて修飾されている、またはいずれかの原子が放射標識されていることを特徴とする請求項1から7のいずれか1項に記載のRNA分子。

10

【請求項 9】

下記、一般式5

【化 5】



(一般式5において X_2 はアデニンまたはグアニンのいずれかの塩基を表し、 X_{1_2} はウラシルまたはアデニンのいずれかの塩基を表し、 X_{1_3} はグアニンまたはアデニンのいずれかの塩基を表す)

20

に示される塩基配列を含み、ヌクレアーゼ耐性能を有することを特徴とする請求項1から8のいずれか1項に記載のRNA分子。

【請求項 10】

下記、式6

【化 6】



30

に示される塩基配列、または、

下記、式7

【化 7】



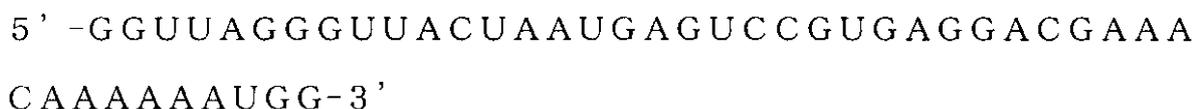
に示される塩基配列を含み、ヌクレアーゼ耐性能を有することを特徴とする請求項1から9のいずれか1項に記載のRNA分子。

【請求項 11】

40

下記、式8

【化 8】



に示される塩基配列を含み、ヌクレアーゼ耐性能を有することを特徴とする請求項1あるいは請求項3から9のいずれか1項に記載のRNA分子。

【請求項 12】

請求項1から11のいずれか1項に記載のRNAの塩基配列と同一のまたは相補的な塩

50

基配列を有するDNA配列を含むことを特徴とするDNA分子。

【請求項13】

請求項2記載のRNA分子を有効成分として含むことを特徴とする癌治療用の医薬組成物。

【請求項14】

請求項3記載のRNA分子を含むことを特徴とする癌細胞に特異性を有するドラッグデリバリーの補助剤。

【請求項15】

請求項3記載のRNA分子を含むことを特徴とする癌細胞の検出剤。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本出願は、2011年5月30日に出願された日本国特許出願2011-120806に基づく優先権を主張する。

【0002】

本発明は、オリゴヌクレオチドに関し、特に、簡便に製造できると共にヌクレアーゼ耐性を備える天然型の直鎖状RNA分子及びそのDNAであるオリゴヌクレオチドに関するものである。また本発明は該RNA分子を含む医薬組成物にも関するものである。

【背景技術】

【0003】

20

染色体テロメア

テロメラーゼはRNA成分を含むリボ核タンパク質複合体であり、テロメア配列の鋳型となるRNAと逆転写酵素、その他の制御サブユニットから構成される複合体である。RNA構成要素はTERC (Telomere RNA Component)、逆転写酵素はTERT (Telomere Reverse Transcriptase) と呼ばれる。ヒトのテロメラーゼは、TERT、TERC、ジスケリン、TEP1などのサブユニットによって構成されており、それらは異なる染色体上の遺伝子座にコードされている。TERT翻訳産物は、非翻訳RNAであるTERCと一緒に折りたたまれる。TERTは一本鎖テロメア反復配列を付加できるように染色体の周囲を覆う二股の構造をとる。TERTとテロメアの鋳型を含むTERCは隣接している。ヒトTERCの塩基配列は既知でありNIBC Reference Sequence: NR_001566.1として開示されている(配列番号1)。

30

【0004】

ここで、染色体のテロメアは、細胞分裂の度に短縮していき、短縮が限界に達すると細胞死を引き起こすことが知られている。ところが、多くの癌細胞ではテロメラーゼと呼ばれるテロメア合成酵素が活性化しており、このテロメラーゼによるテロメアの修復作用によってテロメアの短縮が通常通りに生じず、癌細胞の無制限な増殖を引き起こしていると言われている。よってテロメラーゼを阻害することにより癌細胞の増殖を抑制できることが考えられる。

【0005】

40

テロメラーゼ活性を阻害するための従来技術

テロメラーゼの活性を阻害する方法として、特許文献1にはテロメラーゼを阻害するための改変オリゴヌクレオチドが開示されている。特許文献1に開示された化合物は脂質部分とオリゴヌクレオチド部分を含み、該オリゴヌクレオチド部分はヒトテロメラーゼRNA成分の特定の領域内の配列に相補的であるために、該化合物は細胞内でテロメラーゼを阻害することができる。

【0006】

また特許文献2には、テロメラーゼのRNA成分に対する阻害性ポリヌクレオチドを利用することにより、テロメラーゼのRNA成分を検出および阻害するための方法が開示されている。特許文献2においてはそのような阻害性ポリヌクレオチドとして、テロメラー

50

ゼのRNA成分に対するアンチセンス配列を含むポリヌクレオチドが具体的に開示されている。また特許文献2には、テロメラーゼRNA成分の配列中にリボザイム標的配列が存在することに基づいて、テロメラーゼのRNA成分を切断するリボザイムを採用することも提案されている。しかしながら特許文献2には、リボザイムを具体的に設計したことは開示されていない。

【0007】

特許文献3はヒトテロメラーゼの触媒サブユニットのmRNA（ヒトテロメラーゼ酵素逆転写酵素：hTERT）を標的とするリボザイムが開示するものであり、該文献にはそのようなリボザイムの配列が具体的に開示されている。

【0008】

RNA分子利用の問題点

一般的に天然型ヌクレオチドによって合成されたRNA分子は、ヌクレアーゼであるRNA分解酵素による分解を受けてしまう。そのために、RNA分子を医療へ応用するには、該RNA分子がRNA分解酵素による分解を受けることを回避することが要求される。RNA分解酵素による分解を回避する一般的な方法として、RNA分解酵素による分解を受けない人工核酸を代替利用すること、あるいはRNA分子の末端に化学修飾を施すことが行われている。更には特許文献1に関連して述べたように、RNAの末端にリンカーを介して脂質を結合した化合物が提案されている。

【0009】

また、通常のRNA分子は一本鎖の直鎖状であるが、このRNA分子の末端部分を連結した環状型にすることで、エキソ型RNA分解酵素による分解を回避し、細胞内での該RNA配列の安定性を向上させる技術が開発されている（非特許文献1参照）。

【0010】

リボザイム

一方、特許文献3に記載されているように、RNA分子を医療へ応用するアプローチの1つとしてリボザイムを用いる試みが行われている。リボザイムとはタンパク質同様に触媒能力を有するRNA分子の総称である。ハンマーヘッド型リボザイムは、その二次構造が金槌型をしていることから命名されたリボザイムの一種である。該ハンマーヘッド型リボザイムは、NUX（N=A、C、G又はUであり、X=A、C、又はUの何れかである。）配列を持つあらゆるRNA配列を認識し、該NUX配列のXの3'側のホスホジエステル結合を切断することが知られている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】特表2007-504830号公報

【特許文献2】特表2001-507229号公報

【特許文献3】特表2002-536967号公報

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】In vitro and in vivo production and purification of circular RNA aptamer, So Umekage & Yo Kikuchi; J. Biotechnol. 13, 265-272 (15 January 2008)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本発明の課題は癌の治療などを目的として、テロメラーゼを阻害するための新たな手段を提供することである。

【0014】

特許文献1および非特許文献1に示した従来技術は、いずれも化学的な修飾や、反応に

10

20

30

40

50

よる環状化を行わなくてはならず、RNA分解酵素に対する耐性の向上したRNA分子を製造しようとするれば、その製造工程を煩雑化してしまうという問題点があった。

【0015】

更に、人工核酸など非天然型構造を導入しようとするれば、高度な合成技術が必要とされ、汎用的な生産が困難となりかねない上、得られるRNA分子のコストを上昇させてしまうという問題点があった。このため、汎用的に低コストで利用し得るヌクレアーゼ耐性に優れたRNA分子を提供することが困難となっていた。

【0016】

また、化学的修飾を行った場合や人工核酸などの非天然型のRNA分子は、場合によっては、天然型のRNA分子に比べて標的とする分子に対する結合能力を低下させかねず、ヌクレアーゼ耐性の向上と目的とする機能発現との両立が困難になるという問題点があった。

10

【0017】

一方特許文献3には、テロメラーゼの阻害剤として使用できる天然型RNA分子のリボザイムが開示されている。しかしながら、特許文献3においては、*in vivo* 或いはそれと類似の環境（例えばRNA分解酵素と共存する環境）下で触媒活性を示すか、ヌクレアーゼ耐性を備えるかについては検討されていない。

【0018】

RNA分子を分子標的薬やドラッグデリバリーシステム用素材に用いる場合には、生体内で使用されるためヌクレアーゼに対する十分な耐性が要求されるが、これまで述べてきたように、天然型RNA分子では未だ必要な耐性を実現できないという問題点を残している。

20

【0019】

本発明は、上述した問題点を解決するためになされたものである。具体的には、本発明は簡便に製造できると共にヌクレアーゼ耐性を備えるRNA分子を提供することを目的としている。ヌクレアーゼ耐性を備えるRNA分子がテロメラーゼ活性を阻害するリボザイムとして機能するならば、そのようなRNA分子は癌の治療に利用できると考えられる。

【課題を解決するための手段】

【0020】

本発明者らは、上記課題の解決のために鋭意研究に努めた結果、簡便に製造できると共にヌクレアーゼ耐性を備える天然型の直鎖状RNA分子及びそのDNAであるオリゴヌクレオチド、該RNA分子を含む癌治療用の医薬組成物、癌細胞の検出剤、および癌細胞に特異性を有するドラッグデリバリーの補助剤を得た。

30

【0021】

本発明は、好ましくは以下に記載するような態様により行われるが、これに限定されるものではない。

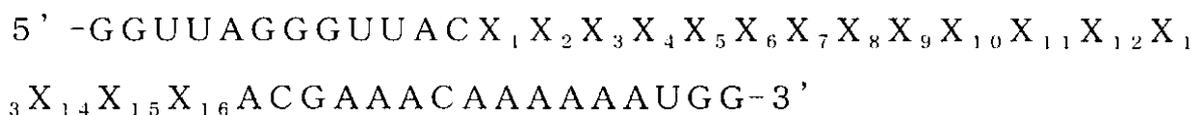
【0022】

[態様1]

下記、一般式1

【化1】

40



(一般式1において X_1 から X_{16} はそれぞれ独立にアデニン、シトシン、グアニン、ウラシルのうちのいずれかの塩基を表す)

に示される塩基配列、あるいはこの配列中において1から複数個の塩基の変異を有する塩基配列を含み、ヌクレアーゼ耐性を有することを特徴とするRNA分子。

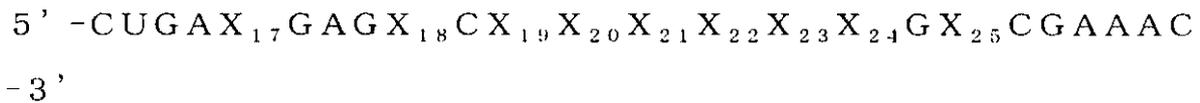
【0023】

[態様2]

50

下記、一般式 2

【化 2】



(一般式 2 において X_{17} から X_{25} はそれぞれ独立にアデニン、シトシン、グアニン、ウラシルのうちのいずれかの塩基を表す)

で示されるハンマーヘッドリボザイムの共通配列を有することを特徴とする態様 1 に記載の RNA 分子。

10

【0024】

[態様 3]

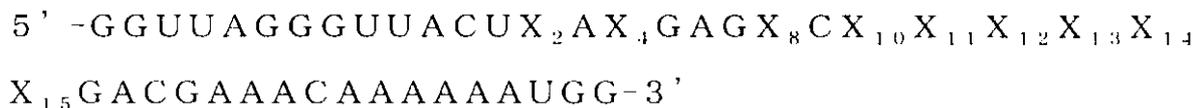
ヒトテロメラーゼ RNA の鋳型領域にハイブリダイズする塩基配列を有することを特徴とする態様 1 または態様 2 に記載の RNA 分子。

【0025】

[態様 4]

下記、一般式 3

【化 3】



20

(一般式 3 において X_2 、 X_4 、 X_8 、 X_{10} から X_{15} はそれぞれ独立にアデニン、シトシン、グアニン、ウラシルのうちのいずれかの塩基を表す)

に示される塩基配列、あるいはこの配列中において 1 から複数個の塩基の変異を有する塩基配列を含み、ヌクレアーゼ耐性能を有することを特徴とする態様 1 から 3 のいずれか 1 に記載の RNA 分子。

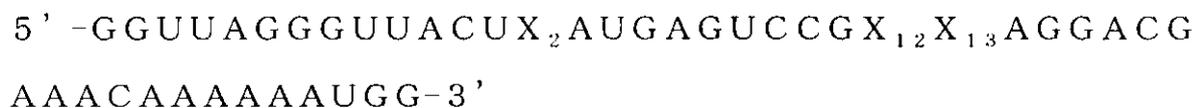
【0026】

[態様 5]

下記、一般式 4

30

【化 4】



(一般式 4 において X_2 、 X_{12} 、 X_{13} はそれぞれ独立にアデニン、シトシン、グアニン、ウラシルのうちのいずれかの塩基を表す)

に示される塩基配列、あるいはこの配列中において 1 から複数個の塩基の変異を有する塩基配列を含み、ヌクレアーゼ耐性能を有することを特徴とする態様 1 から 4 のいずれかの 1 に記載の RNA 分子。

40

【0027】

[態様 6]

5' 側末端の配列が GG、G、A または GGG であることを特徴とする態様 1 から 5 のいずれか 1 に記載の RNA 分子。

【0028】

[態様 7]

一般式 1 の塩基配列のうち 39 以上の塩基を備える直鎖状の RNA 分子であることを特徴とする態様 1 から 6 のいずれか 1 に記載の RNA 分子。

【0029】

[態様 8]

50

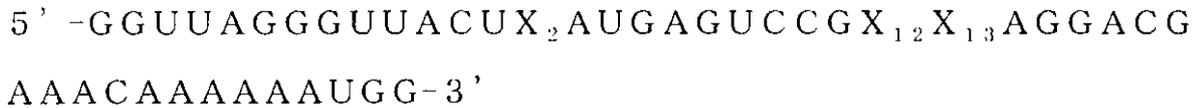
ヌクレオチドの糖部位の少なくとも一部がハロゲンあるいはアルコキシ基により置換されている、リン酸骨格構造の少なくとも一部が、蛍光物質、ポリエチレングリコール、ピオチン、チオール基のいずれかにて修飾されている、またはいずれかの原子が放射標識されていることを特徴とする態様 1 から 7 のいずれか 1 に記載の RNA 分子。

【 0 0 3 0 】

[態様 9]

下記、一般式 5

【化 5】



10

(一般式 5 において X_2 はアデニンまたはグアニンのいずれかの塩基を表し、 X_{12} はウラシルまたはアデニンのいずれかの塩基を表し、 X_{13} はグアニンまたはアデニンのいずれかの塩基を表す)

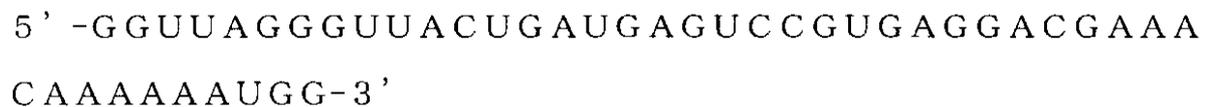
に示される塩基配列を含み、ヌクレアーゼ耐性能を有することを特徴とする態様 1 から 8 のいずれか 1 に記載の RNA 分子。

【 0 0 3 1 】

[態様 1 0]

下記、式 6

【化 6】

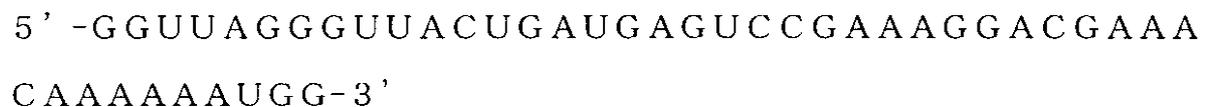


20

に示される塩基配列、または、

下記、式 7

【化 7】



30

に示される塩基配列を含み、ヌクレアーゼ耐性能を有することを特徴とする態様 1 から 9 のいずれか 1 に記載の RNA 分子。

【 0 0 3 2 】

[態様 1 1]

下記、式 8

【化 8】



40

に示される塩基配列を含み、ヌクレアーゼ耐性能を有することを特徴とする態様 1 あるいは態様 3 から 9 のいずれか 1 に記載の RNA 分子。

【 0 0 3 3 】

[態様 1 2]

態様 1 から 1 1 のいずれか 1 に記載の RNA の塩基配列と同一のまたは相補的な塩基配列を有する DNA 配列を含むことを特徴とする DNA 分子。

[態様 1 3]

態様 2 記載の RNA 分子を有効成分として含むことを特徴とする癌治療用の医薬組成物

50

。

[態様 1 4]

態様 3 記載の RNA 分子を含むことを特徴とする癌細胞に特異性を有するドラッグデリバリーの補助剤。

[態様 1 5]

態様 3 記載の RNA 分子を含むことを特徴とする癌細胞の検出剤。

【 発明の 効果 】

【 0 0 3 4 】

本発明の RNA 分子はヌクレアーゼに対する耐性を備えているので、ヌクレアーゼが存在する生体内でも使用することができるという点で有利である。このため、例えば、静脈注射によって本発明の RNA 分子を全身投与した場合であっても、当該 RNA 分子が直ちに分解されるといったことがなく、薬剤の体内輸送を実現し得る。

10

【 0 0 3 5 】

その上、例えば、本発明の RNA 分子がリボザイムの機能を発現するように設計された場合には、RNA 分解酵素による分解速度が顕著に抑制されることから、長時間にわたって触媒活性を持続させることができる。

【 0 0 3 6 】

また本発明の RNA 分子は天然型の RNA 分子であるので、煩雑な化学合成を行うことなく、鋳型となる塩基配列から転写によって製造することができる。故に汎用的な手法で簡便かつ低コストで製造することができるという効果がある。

20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 7 】

【 図 1 】 図 1 はヒトテロメラーゼに対応する RNA の塩基配列を示した図である。なお図 1 は、Chenら Secondary structure of Vertebrate Telomerase RNA, Cell, Volume 100, Issue 5, 3 March 2000, Pages 503 - 514 の内、Fig. 2 (一部) を転載したものである。図 1 の赤字の G, A, U, C は 100% 保存領域を示す。緑色はユニバーサルコパリエーションにサポートされている部分である。青色はグループ特異的コパリエーションにサポートされている部分である。- はワトソン-クリック塩基対を示す (配列の 90% 超)。黒丸は G/U 塩基対を示す。白丸は非カノニカル塩基対を示す。星印は非ユニバーサル塩基対を示す。

30

【 図 2 】 図 2 は実施例 1 と比較例 1 の RNA 分子の血清中での安定性を示した図である。レーン C は血清のみのサンプルである。レーン 1 は凝集 RNA のみのサンプルである。レーン 2 は凝集 RNA に血清を加えて 1 分間反応させたサンプルである。レーン 3 は凝集 RNA に血清を加えて 10 分間反応させたサンプルである。レーン 4 は凝集 RNA に血清を加えて 30 分間反応させたサンプルである。レーン 5 は凝集 RNA に血清を加えて 60 分間反応させたサンプルである。レーン 6 は環状 RNA のみのサンプルである。レーン 7 は環状 RNA に血清を加えて 1 分間反応させたサンプルである。レーン 8 は環状 RNA に血清を加えて 60 分間反応させたサンプルである。

【 図 3 】 図 3 は実施例 1 の RNA 分子のリボザイム活性を示した図である。図 3 において FITC 標識基質は 30 nM であり、実施例 1 の RNA 分子の 0.8 μM、1.6 μM、3.2 μM を用いて、37 °C にて 10 分間反応を行った。レーン 1 は基質 RNA のみのサンプルである。レーン 2 は基質 RNA に実施例 1 の RNA 分子 (3.2 μM) を加えたサンプルである。レーン 3 は基質 RNA に実施例 1 の RNA 分子 (1.6 μM) を加えたサンプルである。レーン 4 は基質 RNA に実施例 1 の RNA 分子 (0.8 μM) を加えたサンプルである。レーン 5 は基質 RNA に実施例 1 の RNA 分子 (3.2 μM) と EDTA を加えたサンプルである。

40

【 図 4 】 図 4 は比較例 2 の RNA 分子の血清中での安定性を示した図である。図 4 においてヒト血清は 25% であり、比較例 2 の RNA 分子は 0.2 μg / レーンである。レーン 1 は比較例 2 の RNA 分子のみのサンプルである。レーン 2 は比較例 2 の RNA 分子にヒ

50

ト血清を加えて1分間反応させたサンプルである。レーン3は比較例2のRNA分子にヒト血清を加えて10分間反応させたサンプルである。レーン4は比較例2のRNA分子にヒト血清を加えて30分間反応させたサンプルである。レーン5は比較例2のRNA分子にヒト血清を加えて60分間反応させたサンプルである。

【発明を実施するための形態】

【0038】

以下、本発明を詳細に説明する。

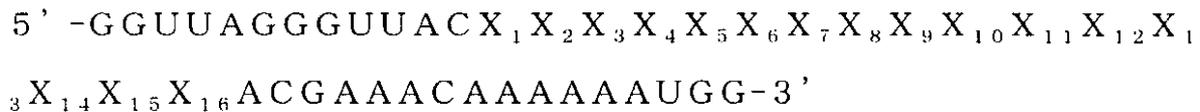
【0039】

本発明のRNA分子

既に述べたように本発明は、下記の一般式9（配列番号2）に示される塩基配列、あるいはこの配列中において1から複数個の塩基の変異を有する塩基配列を含み、ヌクレアーゼ耐性を有することを特徴とするRNA分子である。ヌクレアーゼ耐性を有する本発明のRNA分子は、該RNAの2分子以上が凝集した構造を有することができるが、本発明のRNA分子はそのような構造を有するものに限定されるものではない。

【0040】

【化9】



尚、本明細書において特に断らない限り、A、C、GおよびUは、アデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルの各塩基を示し、 X_1 から X_{16} はそれぞれ独立にアデニン、シトシン、グアニン、ウラシルのうちのいずれかの塩基を表す。

【0041】

本発明のオリゴヌクレオチドは、天然型のヌクレオチドで形成されたものである。当該RNA分子は、RNA分解酵素などのヌクレアーゼに対する耐性を備えており、RNA分解酵素存在下においても、通常の天然型RNAのように直ちに分解されるといったことがなく、長時間にわたって安定である。

【0042】

本明細書において「ヌクレアーゼ耐性を有する」とは、リボヌクレアーゼによる分解が通常のRNA分子と比べて遅いことを意味する。具体的には、例えば、常温常圧下25%ヒト血清水溶液中において30分浸漬した場合にRNA分子の分解が10%以下であることを意味する。なおヌクレアーゼ耐性を有さない通常のRNA分子は、同じ条件下で90%以上分解される。

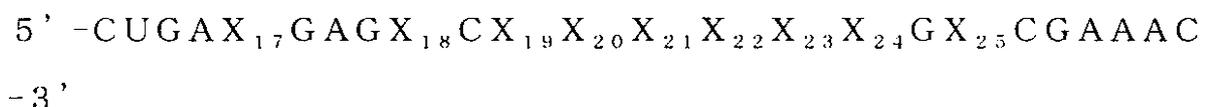
【0043】

2. ハンマーヘッドリボザイムの共通配列を有することについて

ハンマーヘッドリボザイムは既に述べたようにハンマーヘッド型のリボザイムであって、そのリボザイム活性により特定のRNA配列を切断する活性を有する。ハンマーヘッドリボザイムは下記の一般式10（配列番号3）で示される共通配列を含むことが知られており、本発明のRNA分子は、その様なハンマーヘッドリボザイムの共通配列を有することが好ましい。

【0044】

【化10】



一般式10において、 X_{17} から X_{25} はそれぞれ独立にアデニン、シトシン、グアニン、ウラシルのうちのいずれかの塩基を表す。

【0045】

10

20

30

40

50

本発明のRNA分子のうち配列番号3に示すハンマーヘッドリボザイムの共通配列を有するものは、ヒトテロメラーゼRNAにハイブリダイズし、その触媒作用によってヒトテロメラーゼRNAを切断分解することができる。よって後に述べるように、ハンマーヘッドリボザイムの共通配列を有する本発明のRNA分子はテロメラーゼを分解することができるので、下記において詳しく述べるように抗癌剤として有用な医薬組成物となり得る。下記の実施例1(配列番号7)と実施例2(配列番号8)にて作製したRNA分子はハンマーヘッドリボザイムの共通配列を有し、リボザイム活性を示すことが実際に示された。

【0046】

3. ヒトテロメラーゼのRNA鑄型領域にハイブリダイズする塩基配列を有することについて

本発明のRNA分子は、ヒトテロメラーゼのRNA鑄型領域にハイブリダイズする塩基配列を有することが好ましい。ヒトおよびマウスからのテロメラーゼのRNA成分は、単離され、そして配列決定されている(例えば、Fengら、Science 269:1236-41(1995);米国特許第5,583,016号;およびBlascoら、Science 69:1267-1270(1995)参照)。ヒトテロメラーゼのRNA鑄型領域をコードするヒトゲノムDNAは、クローン化され、配列決定され、そして寄託されている。具体的には「28-1」と称されるクローンは、ヒトテロメラーゼのRNA鑄型領域の遺伝子配列を含有する約15kbの挿入物を含んでいる。当該クローンは、ブダベスト条約に従って、アメリカンタイプカルチャーコレクションに寄託され、そして受託番号ATCC75925号を与えられている。図1はヒトテロメラーゼの塩基配列を示した図である。図1に示されるようにヒトTERCではヒトテロメラーゼのRNA鑄型領域の配列は3'-UCCCAAUUC-5'(配列番号10)であり、これを元にTERTはテロメアの3'側へ塩基を付加する。

【0047】

本発明のRNA分子は、その有する塩基配列の一部が、図1に示したヒトテロメラーゼRNA鑄型領域の塩基配列(3'-UCCCAAUUC-5';配列番号10)にハイブリダイズするものであれば良い。なお配列番号2において5'末端から2番目から11番目の塩基配列はGUUAGGUUA(配列番号11)であるが、この配列は上記のヒトテロメラーゼRNA鑄型領域の塩基配列にハイブリダイズする。後に詳細に述べるように、ヒトテロメラーゼのRNA鑄型領域の配列にハイブリダイズする塩基配列を有する本発明のRNA分子は、癌細胞等の検出剤、あるいは、テロメラーゼが発現している癌細胞を標的としたドラッグデリバリーの補助剤として有用である。

【0048】

本明細書においてハイブリダイズするとは、相補的な塩基配列(UならばAもしくはGと、CならばGと)の塩基対間で水素結合することであり、他の互いに異なる分子の存在下であっても、標的分子に対し接触および会合し得る能力をいう。ここで相補的な塩基配列と「特異的」に結合するとは、ストリンジェントな条件下で特定のポリヌクレオチドが、それと相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチドとハイブリダイズすることを言う。

【0049】

ハイブリダイゼーションの条件については当業者が適宜選択をすることができるが、ストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件の例として、以下のような条件を挙げることができる。ハイブリダイゼーションバッファーの組成は、例えば、6×SSC、0.1重量%N-ラウロイルサルコシン、0.02重量%のSDS、2重量%の核酸ハイブリダイゼーション用ブロッキング試薬及び50%フォルムアミドから成る。核酸ハイブリダイゼーション用ブロッキング試薬としては、一例として、0.1Mマレイン酸と0.15M塩化ナトリウムからなる緩衝液(pH7.5)に市販の核酸ハイブリダイゼーション用ブロッキング試薬を10%になるように溶解したものを使用することができる。20×SSCは、3M塩化ナトリウム、0.3Mクエン酸溶液であり、SSCは、より好ましくは、4~7×SSC、更に好ましくは5~6×SSCの濃度で使用する。

【0050】

10

20

30

40

50

ハイブリダイゼーションの温度は、35～60、より好ましくは35～50、更に好ましくは37～45の範囲であり、数時間から一晚のインキュベーションを行った後、洗浄バッファーで洗浄する。洗浄の温度は、好ましくは室温、より好ましくはハイブリダイゼーション時の温度である。洗浄バッファーの組成は4×SSC+0.1重量%SDS溶液、より好ましくは5～6×SSC+0.1重量%SDS溶液である。

【0051】

本発明のRNA分子は、5'側末端の配列がGG、G、AまたはGGGであることが好ましい。本発明のRNA分子のうち、GG、G、AまたはGGGの配列を備えたものは、当該RNA分子を鋳型として二本鎖DNAを合成した場合、二本鎖DNAにGG、G、AまたはGGGの配列が組み込まれる。故に、その二本鎖DNAを用いT7RNAポリメラーゼによる転写反応で本発明のRNA分子を生成することができ、*in vitro*の反応で、容易に、目的のRNA分子を得ることができる。T7ポリメラーゼによる酵素反応は、反応生成物であるRNA分子を高効率で生産できると共に、一般的に広く普及しているRNAの製造手法である。故に、本RNA分子を製造する場合には従来製造技術を利用して行うことができ、製造者は、容易に本RNA分子を製造することができる。

10

【0052】

更に本発明のRNA分子を得るために、天然型オリゴヌクレオチドの公知の核酸合成法を適用することもできる。例えば、本技術分野で汎用されている核酸合成法として、例えばホスホロアミダイト法、CEM法(特許公開2008-174524、WO2006/022323)を適用することができる。

20

【0053】

また本発明のRNA分子は、配列番号2の塩基配列のうち39以上の塩基を備える直鎖状のRNA分子であることが好ましい。当該塩基配列が38塩基以下では、ヌクレアーゼ耐性を保持することが困難となる。下記の比較例2にて38塩基で構成されるRNA分子について検討を行ったところ、ヌクレアーゼ耐性を有していなかった。

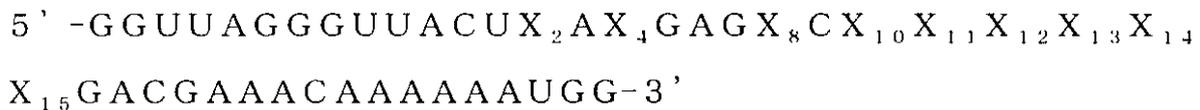
【0054】

本発明において好適なRNA分子は、下記の一般式11(配列番号4)に示される塩基配列、あるいはこの配列中において1から複数個の塩基の変異を有する塩基配列を含み、ヌクレアーゼ耐性を有することを特徴とするRNA分子である。本明細書において「複数個」とは2、3、4、5個などの2以上の整数を意味するものであり、部位特異的変異誘発法により変異をさせることができる程度の数である。また本明細書において塩基の「変異を有する」とは、塩基の欠失、置換、付加による変異を含む意味である。

30

【0055】

【化11】



一般式11においてX₂、X₄、X₈、X₁₀からX₁₅はそれぞれ独立にアデニン、シトシン、グアニン、ウラシルのうちのいずれかの塩基を表す。

40

【0056】

配列番号4において5'末端における12個の塩基配列と3'末端における16個の塩基配列は保存されており、よってヌクレアーゼ耐性を有する。また配列番号4の配列においてX₂がGである場合には、該配列において5'末端から数えて12番目から35番目に相当するハンマーヘッドリボザイムの共通配列(配列番号3)が維持されており、そのリボザイム活性によりテロメラーゼを分解することができる。また配列番号4の配列において5'末端から2番目から11番目の塩基配列はGUUAGGGUUA(配列番号11)であるので、この配列は上記のヒトテロメラーゼRNA鋳型領域の塩基配列とハイブリダイズする。

【0057】

50

更に本発明において好適なRNA分子は、下記の一般式12（配列番号5）に示される塩基配列、あるいはこの配列中において1から複数個の塩基の変異を有する塩基配列を含み、ヌクレアーゼ耐性能を有することを特徴とするRNA分子である。

【0058】

【化12】

5' -GGUUAGGGUUACUX₂AUGAGUCCGX_{1,2}X_{1,3}AGGACG
AAACAAAAAUGG-3'

一般式12においてX₂、X_{1,2}、X_{1,3}はそれぞれ独立にアデニン、シトシン、グアニン、ウラシルのうちのいずれかの塩基を表す。

10

【0059】

更に本発明において好適なRNA分子は、下記の一般式13（配列番号6）に示される塩基配列を含み、ヌクレアーゼ耐性能を有することを特徴とするRNA分子である。

【0060】

【化13】

5' -GGUUAGGGUUACUX₂AUGAGUCCGX_{1,2}X_{1,3}AGGACG
AAACAAAAAUGG-3'

20

一般式13においてX₂はアデニンまたはグアニンのいずれかの塩基を表し、X_{1,2}はウラシルまたはアデニンのいずれかの塩基を表し、X_{1,3}はグアニンまたはアデニンのいずれかの塩基を表す。

【0061】

更に本発明において特に好適なRNA分子は、下記の式14（配列番号7）

【0062】

【化14】

5' -GGUUAGGGUUACUGAUGAGUCCGUGAGGACGAAA
CAAAAAAUGG-3'

30

に示される塩基配列有するものである。

【0063】

更に本発明において特に好適なRNA分子は、下記の式15（配列番号8）

【0064】

【化15】

5' -GGUUAGGGUUACUGAUGAGUCCGAAAGGACGAAA
CAAAAAAUGG-3'

40

に示される塩基配列を有するものである。

【0065】

更に本発明において特に好適なRNA分子は、下記の式16（配列番号9）

【0066】

【化16】

5' -GGUUAGGGUUACUAAUGAGUCCGUGAGGACGAAA
CAAAAAAUGG-3'

に示される塩基配列を有するものである。これらのRNA分子については下記の実施例1

50

乃至実施例3において、ヌクレアーゼ耐性を有することが実際に示されている。

【0067】

RNA分解酵素耐性を有するためには、本発明のRNA分子は、配列番号2で示されるRNA分子と80%以上の同一性を備えることが好ましく、85%以上の同一性を備えることがより好ましく、90%の同一性を備えることが更に好ましく、95%の同一性を備えることが更に好ましく、99%の同一性を備えることが特に好ましい。

【0068】

2つのヌクレオチド配列の同一性%は、視覚的検査と数学的計算により決定可能であるか、またはより好ましくは、この比較はコンピュータ・プログラムを使用して配列情報を比較することによってなされる。代表的な、好ましいコンピュータ・プログラムは、遺伝学コンピュータ・グループ(GCG; ウィスコンシン州マディソン)のウィスコンシン・パッケージ、バージョン10.0プログラム「GAP」である(Devereux, et al., 1984, Nucl. Acids Res., 12:387)。ここで、「GAP」プログラムの好ましいデフォルトパラメータには:(1)ヌクレオチドについての(同一物について1、及び非同物について0の値を含む)一元(unary)比較マトリックスのGCG実行と、Schwartz及びDayhoff監修「ポリペプチドの配列および構造のアトラス(Atlas of Polypeptide Sequence and Structure)」国立バイオ医学研究財団、353-358頁、1979により記載されるような、GribnikovおよびBurgess, Nucl. Acids Res., 14:6745, 1986の加重アミノ酸比較マトリックス; 又は他の比較可能な比較マトリックス; (2)アミノ酸の各ギャップについて30のペナルティと各ギャップ中の各記号について追加の1のペナルティ; 又はヌクレオチド配列の各ギャップについて50のペナルティと各ギャップ中の各記号について追加の3のペナルティ; (3)エンドギャップへのノーペナルティ; 及び(4)長いギャップへは最大ペナルティなし、が含まれる。当業者により使用される他の配列比較プログラムでは、例えば、米国国立医学ライブラリーのウェブサイト:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bls.html>により使用が利用可能なBLASTNプログラム、バージョン2.2.7、またはUW-BLAST2.0アルゴリズムが使用可能である。UW-BLAST2.0についての標準的なデフォルトパラメータの設定は、以下のインターネットサイト:<http://blast.wustl.edu>に記載されている。さらに、BLASTアルゴリズムは、BLOSUM62アミノ酸スコア付けマトリックスを使用し、使用可能である選択パラメータは以下の通りである:(A)低い組成複雑性を有するクエリ配列のセグメント(WoottonおよびFederhenのSEGプログラム(Computers and Chemistry, 1993)により決定される; WoottonおよびFederhen, 1996「配列データベースにおける組成編重領域の解析(Analysis of compositionally biased regions in sequence databases)」Methods Enzymol., 266:544-71も参照されたい)、又は、短周期性の内部リピートからなるセグメント(ClaverieおよびStates(Computers and Chemistry, 1993)のXNUプログラムにより決定される)をマスクするためのフィルターを含むこと、及び(B)データベース配列に対する適合を報告するための統計学的有意性の閾値、またはE-スコア(KarlinおよびAltschul, 1990)の統計学的モデルにしたがって、単に偶然により見出される適合の期待確率; ある適合に起因する統計学的有意差がE-スコア閾値より大きい場合、この適合は報告されない); 好ましいE-スコア閾値の数値は0.5であるか、または好ましさが増える順に、0.25、0.1、0.05、0.01、0.001、0.0001、 $1e-5$ 、 $1e-10$ 、 $1e-15$ 、 $1e-20$ 、 $1e-25$ 、 $1e-30$ 、 $1e-40$ 、 $1e-50$ 、 $1e-75$ 、または $1e-100$ である。

【0069】

4. 本発明のRNA分子と同一あるいは相補的なDNA分子について

10

20

30

40

50

本発明は、上記した本発明のRNA分子におけるRNA配列と同一のまたは相補的な塩基配列を有するDNA配列を含むDNA分子も含む。なおここで「相補的」とは、2つのポリヌクレオチドの間の適合性をいい、第1のポリヌクレオチド中の塩基配列が第2のポリヌクレオチド中の塩基配列の結合パートナーである場合には、第1のポリヌクレオチドは第2のポリヌクレオチドに対して相補的である。ここでいう結合パートナーとは具体例には、アデニン(A)とウラシル(U) (あるいはチミン(T))、グアニン(G)とシトシン(C)の組み合わせである。またここで「同一の塩基配列」とは、RNA分子の塩基であるウラシルとDNAの塩基であるチミンの差を包含するものである。

【0070】

このようなDNA分子から、上記において述べた本発明のRNA分子を得ることができる。当該DNA分子は、直鎖状二本鎖DNAあるいは環状プラスミドDNAのいずれであっても良い。更には上記DNA配列の上流にプロモーターの配列を供えたものであっても良い。プロモーター配列としては、上記RNA配列を備えたRNA分子を本DNA分子から転写するために設計されたものであれば特に限定されないが、好ましくは、T7 RNAポリメラーゼによって認識される配列(T7プロモーター配列)やSP6 RNAポリメラーゼによって認識される配列(SP6プロモーター配列)が用いられる。

【0071】

5. 本発明のRNA分子の置換・修飾について

本発明のRNA分子は、置換又は分子修飾されていてもよく、例えば本発明のRNA分子のヌクレオチドの糖部位の少なくとも一部がハロゲンあるいはアルコキシ基により置換されているもの、本発明のRNA分子のリン酸骨格構造の少なくとも一部が、蛍光物質、ポリエチレングリコールのいずれかにて修飾されているもの、または本発明のRNA分子を構成するいずれかの原子が放射標識されているものでもよい。本発明において糖部位が置換されている態様の例として、ヌクレオチドの糖部位(リボース等)の2'位の水酸基(-OH)が、フッ素(この場合2'-deoxy-2-fluoro)や-OCH₃等に置換されているものを挙げることができるが、それらに限定されるものではない。また本発明において該RNA分子の5'末端リン酸基、あるいは3'末端のリボース3'部位を修飾するのに使用可能な蛍光物質の例としてはフルオレセイン、テキサスレッド、FITCなどを挙げることができ、ポリエチレングリコールの例としては5万程度の分子量を有するものなどを挙げることができるが、それらに限定されるものではない。本発明のRNA分子を放射標識する例として、³²PラベルされたATP、UTP、CTPもしくはGTPの何れか、もしくはそれらの複数の組み合わせを用いた試験管内転写合成法あるいはキナーゼを用いた5'末端標識による該RNA分子への放射標識などを挙げることができるが、それらに限定されるものではない。

【0072】

ここで、本発明のRNA分子はヌクレアーゼに対する耐性を有しているので、生体内から採取した細胞や抽出物からヌクレアーゼを除去する操作(精製操作)を行うことなく、標的分子の存在を検出することができる。具体的には本発明のRNA分子を蛍光物質や放射活性物質等で修飾または標識すれば、標的分子とハイブリダイズさせることで標的分子の存在を検出するプローブとして利用することができる。

【0073】

更には、一般に、天然型ヌクレオチド構造のRNA分子は、非天然型ヌクレオチド構造のものに比べ細胞膜透過性に優れている。このため、蛍光物質や放射活性物質で修飾・標識した本発明のRNA分子を生体内に導入すれば、本発明のRNA分子とハイブリダイズすることによって、生体細胞内に存在する標的物質を標識するマーカーとしての使用が可能となる。そのような標識するマーカーとしての使用については下記に詳細に述べる。

【0074】

ここで、先に述べた非天然型ヌクレオチドとは、例えばリボースの2'位の水酸基がフッ素等に置換されたもの等を指し、この場合ヌクレアーゼによる分解が妨げられるため、生体内での半減期を増長させる効果が期待できる。また、ポリエチレングリコールを付加

10

20

30

40

50

した場合、生体内での安定性を向上させる効果があり、かつ、ポリエチレングリコールの重合度を変えることで生体内での半減期をコントロールすることが可能である。

【0075】

6. 本発明のRNA分子のドラッグデリバリー剤、および癌細胞等検出剤としての使用について

本発明のRNA分子に癌細胞に特異的に認識する化合物あるいは核酸配列やペプチドを付加することや担持させることにより、標的となる癌細胞に医薬を送達することができる。例えば本発明のRNA分子において、前立腺癌細胞を特異的に認識するRNAアプタマー配列を本発明のRNA分子の5'側あるいは3'側、あるいは2分子の本発明のRNA分子の間に配したものを、そのようなドラッグデリバリー補助剤として利用することができる。ドラッグデリバリー補助剤として利用した場合、ヌクレアーゼに対する耐性を備えているので、例えば、静脈投与や患部への注入によって医薬を安定に生体内に導入できる。ドラッグデリバリーの際には、カチオン性脂質、ポリ乳酸担持金コロイドなどのドラッグデリバリー物質との共役的な使用法も含まれる。さらに、蛍光物質で修飾された本発明のRNA分子または放射標識された本発明のRNA分子を用いれば、他の癌細胞標的試薬との共同的使用により癌細胞の検出剤として使用もできる。

10

【0076】

尚、本発明のRNA分子をこのような標的分子の検出に用いる場合や、ドラッグデリバリー補助剤として利用する場合には、リボザイム活性が好ましくない影響をもたらす場合などにおいては必要に応じて、ハンマーヘッドリボザイムの共通配列を有していないものを選択することができる。

20

【0077】

7. 本発明のRNA分子を含む医薬組成物について

更に本発明は、上記において述べた本発明のRNA分子において配列番号3に示すハンマーヘッドリボザイムの共通配列を有するものを、有効成分として含む医薬組成物を提供する。本発明のRNA分子が、ヒトテロメラーゼにハイブリダイズする塩基配列を備えて設計されたものであれば、ハンマーヘッドリボザイム活性によりテロメラーゼを切断分解することが可能である。また、本発明のRNA分子はRNA分解酵素耐性を備えているので、細胞内においても触媒として有効に作用する。このために本発明は天然型のRNA分子を有効成分として含む医薬組成物を提供することができる。従って、そのようなRNA分子を有効成分として含有する本発明の医薬組成物を、ヒトテロメラーゼの活性によって異常増殖が生じている細胞、例えば癌細胞に対し投与すれば、癌細胞の異常増殖を抑制することができる。

30

【0078】

尚、ヒトテロメラーゼは、ヒトのみならず、哺乳動物全般に保存された配列であるので、本発明はヒトのみに適用されるものではなく、哺乳動物全般に適用しえる。

【0079】

更に、本発明のRNA分子は、天然型のヌクレオチドで構成されたものであるため、非天然型のヌクレオチドで構成されたものに比べて安全性が高く、細胞膜への浸透性も高いため医薬組成物として用いた場合に、少量で有効な薬理効果を得られやすい。

40

【0080】

本発明の医薬組成物は血清中のヌクレアーゼに対して耐性であるので、静脈注射により投与することが可能であるという利点を有するが、それに限定されるものではなく、投与経路としては、静脈注射、経口投与、経皮投与、直腸内投与、経眼投与、膀胱内投与など、いずれの投与経路を採用することもできる。本発明のRNA分子の投与量は該RNA分子の種類、投与方法、投与される者の状態や年齢等により異なるが、通常は血中濃度が0.001 μM ~ 1000 μM 、好ましくは0.01 μM ~ 100 μM 、更に好ましくは0.1 μM ~ 10 μM である。

【0081】

剤型としては、注射剤、懸濁剤、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤、座剤

50

、軟膏、クリーム剤、ゲル剤、貼付剤、吸入剤等の種々の剤型が挙げられる。これらの製剤は常法に従って調製されるが、特に好ましい剤型は注射剤である。尚、液体製剤にあっては、用時、水又は他の適当な溶媒に溶解または懸濁する形であってもよい。また錠剤、顆粒剤は周知の方法でコーティングしてもよい。注射剤の場合には、本発明のRNA分子を水に溶解させて調製されるが、必要に応じて生理食塩水あるいはブドウ糖溶液に溶解させてもよく、また緩衝剤や保存剤を添加してもよい。

【0082】

注射剤を製造するには、有効成分を必要に応じて塩酸、水酸化ナトリウム、乳糖、乳酸、ナトリウム、リン酸一水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウムなどのpH調整剤、塩化ナトリウム、ぶどう糖などの等張化剤と共に注射用蒸留水に溶解し、無菌濾過してアン

10

【0083】

これらの製剤は、本発明のRNA分子を0.01%~100重量%、好ましくは0.1%~95重量%、更に好ましくは1~90重量%の割合で含有することができる。これらの製剤はまた、治療上価値のある他の成分を含有していてもよい。

【0084】

また本発明は、本発明のRNA分子を有効成分として含む医薬組成物を投与することにより癌を治療する方法を包含する。更に本発明は、本発明のRNA分子を有効成分として含む医薬組成物を癌の治療のために使用する方法をも包含する。

20

【0085】

その他、本発明は、趣旨を逸脱しない範囲で当業者の知識に基づき種々の改良、修正、変更を加えた形態で実施できるものである。

【実施例】

【0086】

<実施例1>

【0087】

下記の式17(配列番号7)のRNA分子に対応するDNA配列とその上流にT7プロモーター配列をもつ二本鎖DNAを用い、ランオフ転写法によって該RNA分子を作製し、ゲル電気泳動により該RNA分子を純化した。純化した該RNA分子はヒト血清を含む生理食塩水(PBS)中で37℃で一定時間静置した後、7Mウレア入りアクリルアミド電気泳動を行い、エチジウムブロミド染色を行うことで血清による該RNA分子の分解耐性能評価を行った。結果を図2に示す。

30

【0088】

【化17】

5' -GGUUAGGGUUACUGAUGAGUCCGUGAGGACGAAA

CAAAAAAUGG-3' (配列番号7)

40

図2は、第1実施例で作製したRNA分子のヒト血清中での分解耐性能の結果を示した図である。

【0089】

まず、T7プロモーター下流に該RNA配列をコードするプラスミドDNAを鋳型DNAとして、T7RNAポリメラーゼによるランオフ転写によって該RNA配列を含む転写反応液を得た。次に、転写反応液中から該RNAを精製するため、16%変性アクリルアミドゲル電気泳動を行い、該RNAのみを切り出すことで該RNA分子を純化した。また、環状RNAに関しては、非特許論文1に記載の手法に従い調製した。該RNA分子または環状RNAを0.2µg用意し、PBS(リン酸緩衝液)中において、ヒト血清(Ca

50

m b r e x 社) を 25% 含む条件下で、37 で浸漬した。図 2 内に示される反応時間後にフェノール/クロロホルム/イソamilアルコール溶液と混合し、ボルテックスによる混合後、液体窒素を用いて反応液を氷結させることで該 RNA 分子および環状 RNA のヌクレアーゼ分解反応を停止させた。分解反応停止後、遠心処理して水層のみを回収し、エタノール沈殿による該 RNA 分子及び環状 RNA を濃縮した。分解耐性能評価のため、先に濃縮した RNA を 16% 変性アクリルアミドゲル電気泳動を行い、フルオロイメージアナライザー F L A - 900 (F U J I F I L M) により、各反応時間後の該 RNA 分子の残存率を定量することで分解耐性能評価を行った。

【0090】

図 2 においてレーン 2 からレーン 5 は実施例 1 で作製した RNA 分子 (配列番号 7) の実験系における結果である。一方図 2 においてレーン 6 からレーン 8 は比較例 1 で作製した RNA 分子 (配列番号 12) の実験系における結果である。図 2 のレーン 2 からレーン 5 に示されるように、本 RNA 分子は、ヒト血清中において少なくとも 1 時間は分解されること無く安定に存在していることが示された。

10

< 実施例 2 >

【0091】

下記の式 18 (配列番号 8) に示す RNA 分子を実施例 1 と同様のランオフ転写方法で作製し、ゲル電気泳動法により純化した。該 RNA 分子は、ヒトテロメラーゼに対してハイブリダイズする配列を備えると共に、配列番号 7 に示す RNA 分子と 2 つの塩基配列が異なったものである。この RNA 分子に対し実施例 1 と同様の分解耐性能評価を行った。この結果により、本 RNA 分子は、ヒト血清中において少なくとも 1 時間は分解されないことが示された。

20

【0092】

【化 18】

5' -GGUUAGGGUUACUGAUGAGUCCGAAAGGACGAAA
CAAAAAAUGG-3' (配列番号 8)

< 実施例 3 >

【0093】

本実施例では、下記の式 19 (配列番号 9) に示す RNA 分子を実施例 1 と同様のランオフ転写方法で作製した。該 RNA 分子は、ヒトテロメラーゼに対してハイブリダイズする配列を備えると共に、配列番号 7 に示す RNA 分子と 1 つの塩基配列が異なったものである。この RNA 分子に対し実施例 1 と同様の分解耐性能評価を行ったところ、該 RNA 分子は、ヒト血清中において少なくとも 1 時間は分解されること無く安定に存在した。

30

【0094】

【化 19】

5' -GGUUAGGGUUACUAAUGAGUCCGUGAGGACGAAA
CAAAAAAUGG-3' (配列番号 9)

40

< 実施例 4 >

【0095】

実施例 1 にて作製した RNA 分子 (配列番号 7) (0.8 - 3.2 μM) と該 RNA 分子の基質とする 5' 末端を FITC 標識したテロメラーゼ RNA 配列 (鋳型領域のみ) を混合し、リボザイム反応液 (50 mM Tris - HCl pH 8.0、10 mM MgCl₂、該テロメラーゼ RNA 20 nM) 中で、37 で 10 分反応させた後、16% 変性アクリルアミドゲル電気泳動を行い、該基質 RNA (該テロメラーゼ RNA) の切断率をフルオロイメージアナライザー F L A - 900 (F U J I F I L M) によって定量した。配列番号 7 に示す RNA 分子は、ハンマーヘッドリボザイムの共通配列を有するもの

50

である。

【0096】

図3は、実施例1にて作製したRNA分子のリボザイム活性評価を示した図である。図3においてレーン1は基質RNA(30nM)のみ、レーン2は基質RNA+実施例1にて作製したRNA分子(3.2μM)、レーン3は基質RNA+実施例1にて作製したRNA分子(1.6μM)、レーン4は基質RNA+実施例1にて作製したRNA分子(0.8μM)、レーン5は基質RNA+実施例1にて作製したRNA分子(3.2μM)+EDTAの実験系である。図3からも分るように実施例1で作製したRNA分子により基質RNAは分解され、リボザイム活性が認められた。

<実施例5>

【0097】

実施例2および3で作製したRNA分子について、実施例4と同様のリボザイム活性評価を行った。ハンマーヘッドリボザイムの共通配列を有する実施例2のRNA分子はリボザイム活性を有し、ハンマーヘッドリボザイムの共通配列を有していない実施例3のRNA分子はリボザイム活性を備えないことが示された。

<比較例1>

【0098】

下記式20(配列番号12)で示される環状RNA分子を作製し、実施例1と同様の条件にてRNA分子の分解耐性能評価を行った。図2のレーン7と8に示されるように、比較例1のRNA分子はヒト血清中において1分以内に完全に分解した。

【0099】

【化20】

5'-CUACCGUUUAAUUAUUGGAUCCCCGACCAGAAUCA
UGCAAGUGCGUAAGAUAGUCGCGGGCCGGCUGCAGAU
GUUUUCUUGGGU-3' (配列番号12)

<比較例2>

【0100】

下記式21(配列番号13)で示されるRNA分子を実施例1と同様に作成し、実施例1と同様の条件にてRNA分子の分解耐性能評価を行った。比較例2のRNA分子は、38塩基で構成されている。結果を図4に示す。図4は、比較例2のRNA分子のヒト血清中での分解耐性能の結果を示した図である。図4に示すように、ヒト血清中において比較例2のRNA分子は1分以内に分解した。

【0101】

【化21】

5'-GGAGGGUUACUGAUGAGUCCGUGAGGACGAAACAA
AAA-3' (配列番号13)

[配列表]

10

20

30

40

SEQUENCE LISTING

<110> National University Corporation TOYOHASHI UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

<120> An improved oligonucleotide and a pharmaceutical composition containing the oligonucleotide

<130> FA5025-12012PCT

<160> 13

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 451
<212> DNA
<213> human

10

```

<400> 1
gggttgcgga gggtgggct gggaggggtg gtggccatt ttgtctaac cctaactgag    60
aagggcgtag gcgcogtgc ttgtctccc gcgcogtgtt ttctcgtg actttcagcg    120
ggcggaaaag cctcggcctg ccgcctcca ccgttcattc tagagcaaac aaaaaatgtc    180
agctgctggc ccgttcgcc ctcccgggga cctcggcggg gtcgcctgcc cagcccccgga    240
accccgcctg gaggccgagg tcggccgggg gcttctcggg aggcacccac tgccacgcg    300
aagagttggg ctctgtcagc cgcgggtctc tcgggggcga gggcgaggtt caggcctttc    360
aggccgcagg aagaggaacg gagcagatcc ccgcgcggg cgcgattccc tgagctgtgg    420
gacgtgcacc caggactcgg ctcacacatg c                                451

```

20

<210> 2
<211> 44
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(28)
<223> N is A, U, G or C

<400> 2
gguuaggguu acnnnnnnnn nnnnnnnnac gaaacaaaaa augg 44

30

<210> 3
<211> 24
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> n is A, U, G or C

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> n is A, U, G or C

40

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(16)
<223> n is A, U, G or C

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n is A, U, G or C

<400> 3

cugangagnc nnnnnngncg aaac

24

<210> 4
 <211> 44
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> n is A, U, G or C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> n is A, U, G or C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> n is A, U, G or C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(27)
 <223> n is A, U, G or C

<400> 4
 gguuaggguu acunangagn cnnnnngac gaaacaaaaa augg

44

10

20

<210> 5
 <211> 44
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> n is A, U, G or C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> n is A, U, G or C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> n is A, U, G or C

<400> 5
 gguuaggguu acunaugagu ccgnnaggac gaaacaaaaa augg

44

30

<210> 6
 <211> 44
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> n is A or G

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> n is U or A

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> n is G or A

40

<400> 6 gguuaggguu acunaugagu ccgnnaggac gaaacaaaaa augg	44	
<210> 7 <211> 44 <212> RNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> RNA molecule in Example 1		
<400> 7 gguuaggguu acugaugagu ccgugaggac gaaacaaaaa augg	44	10
<210> 8 <211> 44 <212> RNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> RNA molecule in Example 2		
<400> 8 gguuaggguu acugaugagu ccgaaaggac gaaacaaaaa augg	44	
<210> 9 <211> 44 <212> RNA <213> Artificial Sequence		20
<220> <223> RNA molecule in Example 3		
<400> 9 gguuaggguu acuaaugagu ccgugaggac gaaacaaaaa augg	44	
<210> 10 <211> 8 <212> RNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> RNA template region sequence in human telomerase		30
<400> 10 cuaaccu	8	
<210> 11 <211> 10 <212> RNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Partial sequence of SEQ. ID. No.2 that hybridizes to SEQ. ID. No.9		
<400> 11 guuaggguaa	10	40
<210> 12 <211> 83 <212> RNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> RNA molecule in Comparative Example 1		
<400> 12 cuaccguuaa auauuggauc cccgaccaga aucaugcaag ugcguaagau agucgcgggc	60	
cggcugcaga uguuuucuug ggu	83	

<210> 13
<211> 38
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RNA molecule in Comparative Example 2

<400> 13
ggaggguuac ugaugagucc gugaggacga aacaaaaa

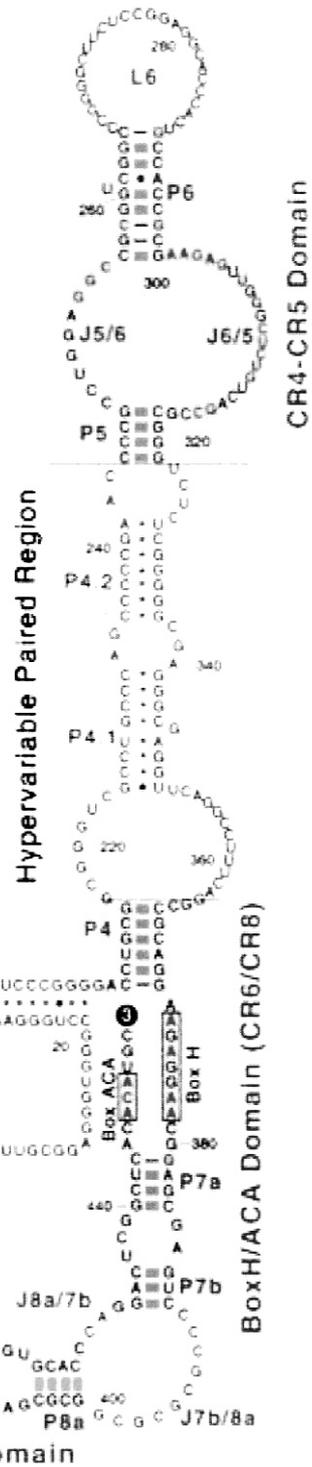
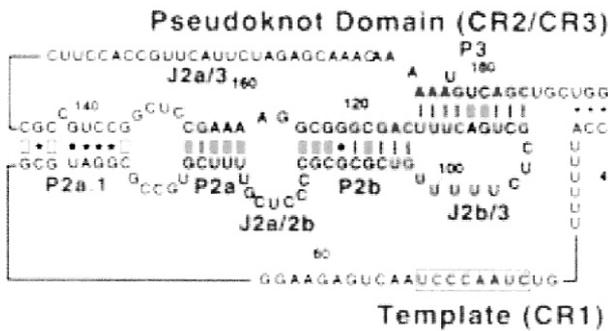
38

【 図 1 】

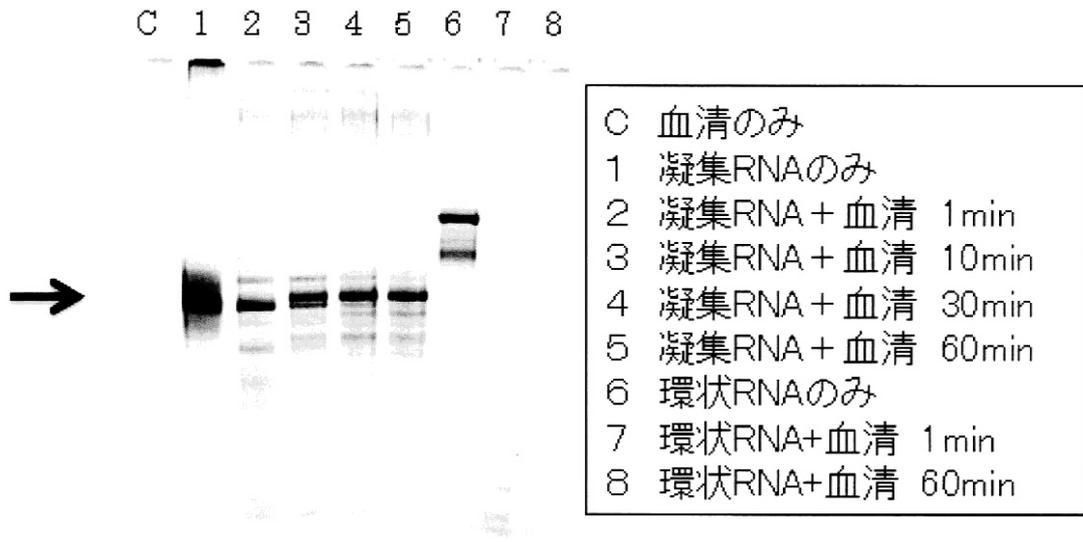
Human Telomerase RNA

G,A,U,C : 100% conserved

- : supported by universal covariation
- : supported by group-specific covariation
- : Watson-Crick base pair in >90% of sequences
- : G/U base pair
- : non-canonical base pair
- ★ : non-universal base pair



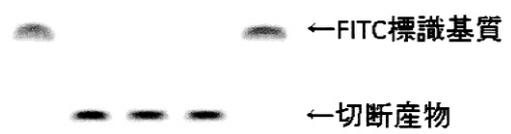
【 図 2 】



【 図 3 】

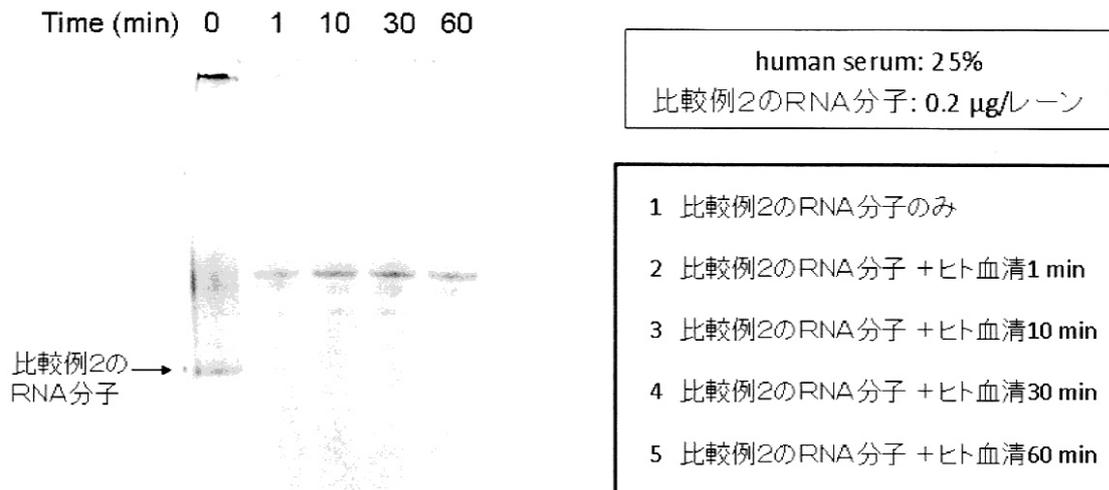
1 2 3 4 5

FITC標識基質: 30 nM
 実施例1のRNA分子: 0.8, 1.6, 3.2 μM
 37°Cにて10 min反応



1	基質RNAのみ
2	基質RNA + 実施例1のRNA分子 (3.2 μM)
3	基質RNA + 実施例1のRNA分子 (1.6 μM)
4	基質RNA + 実施例1のRNA分子 (0.8 μM)
5	基質RNA + 実施例1のRNA分子 (3.2 μM) + EDTA

【図4】



【手続補正書】

【提出日】平成25年3月26日(2013.3.26)

【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

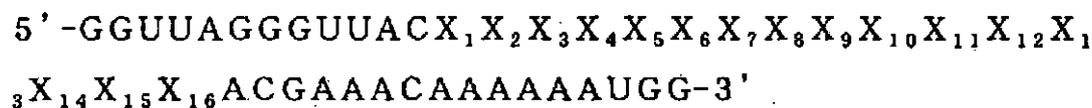
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記、一般式1

【化1】



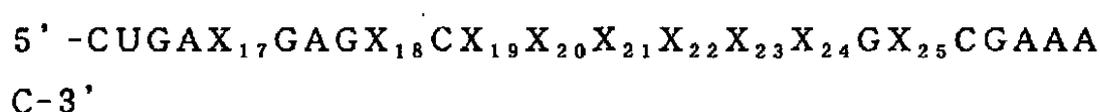
(一般式1において X_1 から X_{16} はそれぞれ独立にアデニン、シトシン、グアニン、ウラシルのうちのいずれかの塩基を表す)

に示される塩基配列、あるいはこの配列中において1から複数個の塩基の変異を有する塩基配列からなり、ヌクレアーゼ耐性を有することを特徴とするRNA分子。

【請求項2】

下記、一般式2

【化2】



(一般式2において X_{17} から X_{25} はそれぞれ独立にアデニン、シトシン、グアニン、ウラシルのうちのいずれかの塩基を表す)

で示されるハンマーヘッドリボザイムの共通配列を有することを特徴とする請求項1に記載のRNA分子。

【請求項3】

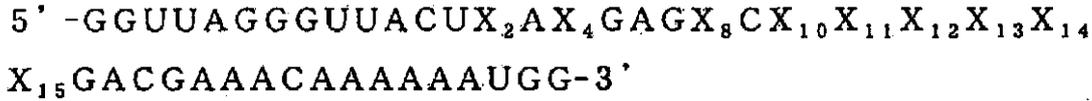
ヒテロメラーゼのRNA鋳型領域にハイブリダイズする塩基配列を有することを特徴

とする請求項 1 または請求項 2 に記載の RNA 分子。

【請求項 4】

下記、一般式 3

【化 3】



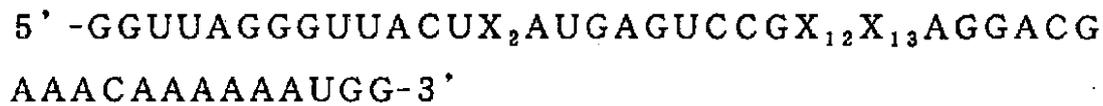
(一般式 3 において X_2 、 X_4 、 X_8 、 X_{10} から X_{15} はそれぞれ独立にアデニン、シトシン、グアニン、ウラシルのうちのいずれかの塩基を表す)

に示される塩基配列、あるいはこの配列中において 1 から複数個の塩基の変異を有する塩基配列からなり、ヌクレアーゼ耐性能を有することを特徴とする請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の RNA 分子。

【請求項 5】

下記、一般式 4

【化 4】



(一般式 4 において X_2 、 X_{12} 、 X_{13} はそれぞれ独立にアデニン、シトシン、グアニン、ウラシルのうちのいずれかの塩基を表す)

に示される塩基配列、あるいはこの配列中において 1 から複数個の塩基の変異を有する塩基配列からなり、ヌクレアーゼ耐性能を有することを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の RNA 分子。

【請求項 6】

5' 側末端の配列が GG、G、A または GGG であることを特徴とする請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の RNA 分子。

【請求項 7】

一般式 1 の塩基配列のうち 39 以上の塩基を備える直鎖状の RNA 分子であることを特徴とする請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の RNA 分子。

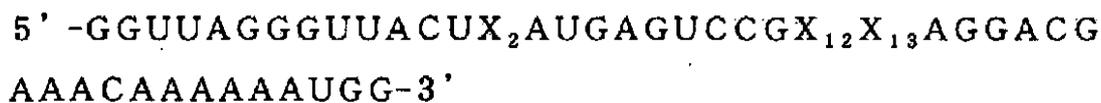
【請求項 8】

ヌクレオチドの糖部位の少なくとも一部がハロゲンあるいはアルコキシ基により置換されている、リン酸骨格構造の少なくとも一部が、蛍光物質、ポリエチレングリコールのいずれかにて修飾されている、またはいずれかの原子が放射標識されていることを特徴とする請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の RNA 分子。

【請求項 9】

下記、一般式 5

【化 5】



(一般式 5 において X_2 はアデニンまたはグアニンのいずれかの塩基を表し、 X_{12} はウラシルまたはアデニンのいずれかの塩基を表し、 X_{13} はグアニンまたはアデニンのいずれかの塩基を表す)

に示される塩基配列からなり、ヌクレアーゼ耐性能を有することを特徴とする請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載の RNA 分子。

【請求項 10】

下記、式 6

【化 6】

5' -GGUUAGGGUUACUGAUGAGUCCGUGAGGACGAAA
CAAAAAAUGG-3'

に示される塩基配列、または、
下記、式 7

【化 7】

5' -GGUUAGGGUUACUGAUGAGUCCGAAAGGACGAAA
CAAAAAAUGG-3'

に示される塩基配列からなり、ヌクレアーゼ耐性能を有することを特徴とする請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の RNA 分子。

【請求項 1 1】

下記、式 8

【化 8】

5' -GGUUAGGGUUACUAAUGAGUCCGUGAGGACGAAA
CAAAAAAUGG-3'

に示される塩基配列からなり、ヌクレアーゼ耐性能を有することを特徴とする請求項 1 あるいは請求項 3 から 9 のいずれか 1 項に記載の RNA 分子。

【請求項 1 2】

請求項 1 から 1 1 のいずれか 1 項に記載の RNA の塩基配列と同一のまたは相補的な塩基配列を有する DNA 配列を含むことを特徴とする DNA 分子。

【請求項 1 3】

請求項 2 記載の RNA 分子を有効成分として含むことを特徴とする癌治療用の医薬組成物。

【請求項 1 4】

請求項 3 記載の RNA 分子を含むことを特徴とする癌細胞に特異性を有するドラッグデリバリーの補助剤。

【請求項 1 5】

請求項 3 記載の RNA 分子を含むことを特徴とする癌細胞の検出剤。

【請求項 1 6】

ヌクレアーゼ耐性能を有する RNA 分子を作製する方法であって、下記、一般式 1

【化 9】

5' -GGUUAGGGUUACX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆ACGAAACAAAAAUGG-3'

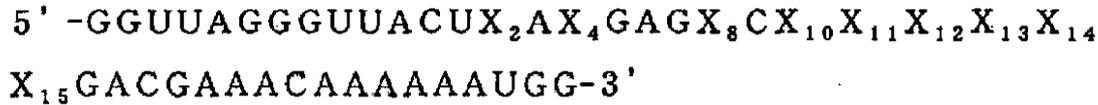
(一般式 1 において X₁ から X₁₆ はそれぞれ独立にアデニン、シトシン、グアニン、ウラシルのうちのいずれかの塩基を表す)

に示される塩基配列、あるいはこの配列中において 1 から複数個の塩基の変異を有する塩基配列からなる塩基配列を有する RNA 分子を作製することを特徴とする、上記方法。

【請求項 1 7】

ヌクレアーゼ耐性能を有する RNA 分子を作製する請求項 1 6 に記載の方法であって、下記、一般式 3

【化 1 0】



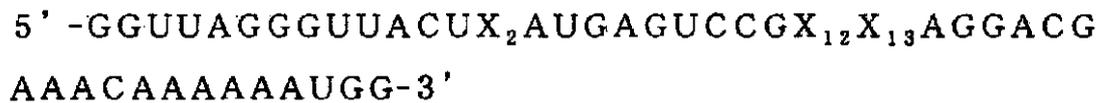
(一般式 3 において X_2 、 X_4 、 X_8 、 X_{10} から X_{15} はそれぞれ独立にアデニン、シトシン、グアニン、ウラシルのうちのいずれかの塩基を表す)

に示される塩基配列、あるいはこの配列中において 1 から複数個の塩基の変異を有する塩基配列からなる塩基配列を有する RNA 分子を作製することを特徴とする、上記方法。

【請求項 1 8】

ヌクレアーゼ耐性能を有する RNA 分子を作製する請求項 1 6 または請求項 1 7 に記載の方法であって、下記、一般式 4

【化 1 1】



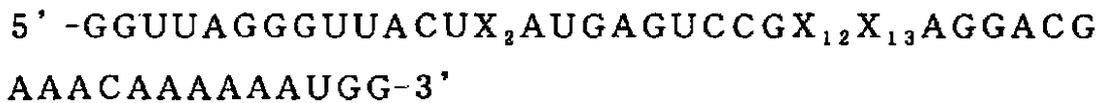
(一般式 4 において X_2 、 X_{12} 、 X_{13} はそれぞれ独立にアデニン、シトシン、グアニン、ウラシルのうちのいずれかの塩基を表す)

に示される塩基配列、あるいはこの配列中において 1 から複数個の塩基の変異を有する塩基配列からなる塩基配列を有する RNA 分子を作製することを特徴とする、上記方法。

【請求項 1 9】

ヌクレアーゼ耐性能を有する RNA 分子を作製する請求項 1 6 から請求項 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法であって、下記、一般式 5

【化 1 2】



(一般式 5 において X_2 はアデニンまたはグアニンのいずれかの塩基を表し、 X_{12} はウラシルまたはアデニンのいずれかの塩基を表し、 X_{13} はグアニンまたはアデニンのいずれかの塩基を表す)

に示される塩基配列、あるいはこの配列中において 1 から複数個の塩基の変異を有する塩基配列からなる塩基配列を有する RNA 分子を作製することを特徴とする、上記方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2012/064491
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/113(2010.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/113, A61K48/00, A61P35/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2012 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/REGISTRY (STN), CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	LIU, B. et al., Inhibition of telomerase in tumor cells by ribozyme targeting telomerase RNA component, Science in China, Series C: Life Sciences, 2002, Vol.45, No.1, p.87-95, particularly, abstract, page 88, lines 5 to 8, fig. 1, pages 91 to 93, 2.2, 2.3	<u>1-7, 9, 12, 13</u> 1-15
X Y	JP 10-505488 A (Geron Corp.), 02 June 1998 (02.06.1998), particularly, page 47; page 47, line 17, sequence 1; claim 4 & US 5958680 A & EP 778842 A & WO 1996/001835 A1	<u>1-5, 7, 9, 12,</u> <u>13</u> 1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 05 July, 2012 (05.07.12)		Date of mailing of the international search report 17 July, 2012 (17.07.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/064491

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Hiroshi KIKUCHI, "Design and synthesis of RNA enzymes.(1).Types and in vitro activity of RNA enzymes.Focussing on hammer head and hairpin type ribozyme is centered", Kagaku to Seibutsu, 1992, vol.30, no.2, pages 112 to 118, particularly, fig. 1	1-15
P,A	So UMEKAGE et al., "Discovery of an RNA sequence resistant to human serum ribonucleases", Dai 34 Kai Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan Online Yoshi [online], 1P-0618(1T13pl-7) Poster, 21 November 2011 (21.11.2011), [retrieved on 03 July 2012 (03.07.2012)] < http://www.aeplan.co.jp/mbsj2011 >	1-15
P,A	So UMEKAGE et al., "Hito Kessei-chu ni Oitemo Bunkai Sarenikui Tennen-gata RNA Hairetsu", Antisens Idenshi Delivery Symposium 2011 Yoshishu, 01 September 2011 (01.09.2011), page 80	1-15

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 6 4 4 9 1									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/113(2010.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/113, A61K48/00, A61P35/00											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2012年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2012年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2012年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2012年	日本国実用新案登録公報	1996-2012年	日本国登録実用新案公報	1994-2012年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2012年										
日本国実用新案登録公報	1996-2012年										
日本国登録実用新案公報	1994-2012年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/REGISTRY (STN), CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X Y	LIU, B. et al., Inhibition of telomerase in tumor cells by ribozyme targeting telomerase RNA component, Science in China, Series C: Life Sciences, 2002, Vol.45, No.1, p.87-95, 特に、Abstract、88頁5-8行、Fig.1、91-93頁の2.2及び2.3	1-7, 9, 12, 13 1-15									
X Y	JP 10-505488 A (ジェロン コーポレイション) 1998.06.02, 特に、47頁、47頁17行めの配列1;、請求項4 & US 5958680 A & EP 778842 A & WO 1996/001835 A1	1-5, 7, 9, 12, 13 1-15									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		のの後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 05.07.2012		国際調査報告の発送日 17.07.2012									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 吉田 知美	4 B 3 3 3 5								
		電話番号 03-3581-1101 内線	3 4 4 8								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2012/064491
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	菊池 洋, RNA酵素の設計と合成－1 RNA酵素の種類と invitro 活性 ハンマーヘッド型、ヘアピン型リボザイムを中心に, 化学と生物, 1992, Vol. 30, No. 2, p. 112-118, 特に、図 1	1-15
PA	梅影 創, 外 3 名, ヒト血清中で安定な RNA 配列の発見, 第 3 4 回日本分子生物学会年会 オンライン要旨 [online], 1 P-0618 (1 T 1 3 p 1-7) ポスター, 2011.11.21, [retrieved on 2012-07-03] < http://www.aeplan.co.jp/mbsj2011 >	1-15
PA	梅影 創, 外 2 名, ヒト血清中においても分解されにくい天然型 RNA 配列, アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2011 要旨集, 2011.09.01, p. 80	1-15

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/36 (2006.01)	A 6 1 K 47/36	4 C 0 8 6
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00	A
A 6 1 K 51/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/02	C
A 6 1 K 31/712 (2006.01)	A 6 1 K 31/712	
A 6 1 K 31/7125 (2006.01)	A 6 1 K 31/7125	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(72) 発明者 梅影 創
愛知県豊橋市天伯町雲雀ヶ丘 1 - 1 国立大学法人豊橋技術科学大学内
(72) 発明者 越智 明德
愛知県豊橋市天伯町雲雀ヶ丘 1 - 1 国立大学法人豊橋技術科学大学内
(72) 発明者 菊池 洋
愛知県豊橋市天伯町雲雀ヶ丘 1 - 1 国立大学法人豊橋技術科学大学内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA01 CA11 HA17
4B063 QA01 QA19 QQ08 QR35 QR56 QS36 QX02 QX07
4C076 CC27 EE30 FF70
4C084 AA13 NA14 ZB261 ZB262
4C085 HH03 HH11 KA27 KA29 KB92 LL18
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。