

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6035010号
(P6035010)

(45) 発行日 平成28年11月30日(2016.11.30)

(24) 登録日 平成28年11月4日(2016.11.4)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A G
A 6 1 K 31/7125 (2006.01)	A 6 1 K 31/7125
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48
A 6 1 P 3/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/06

請求項の数 45 (全 148 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-527323 (P2010-527323)
(86) (22) 出願日	平成20年10月3日(2008.10.3)
(65) 公表番号	特表2010-539959 (P2010-539959A)
(43) 公表日	平成22年12月24日(2010.12.24)
(86) 国際出願番号	PCT/DK2008/000344
(87) 国際公開番号	W02009/043353
(87) 国際公開日	平成21年4月9日(2009.4.9)
審査請求日	平成23年9月29日(2011.9.29)
審査番号	不服2015-1390 (P2015-1390/J1)
審査請求日	平成27年1月23日(2015.1.23)
(31) 優先権主張番号	60/977,497
(32) 優先日	平成19年10月4日(2007.10.4)
(33) 優先権主張国	米国 (US)
(31) 優先権主張番号	60/979,217
(32) 優先日	平成19年10月11日(2007.10.11)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	504013269
	ロシュ・イノベーション・センター・コペンハーゲン・アクティーゼルスカプ
	Roche Innovation Center Copenhagen A/S
	デンマーク2970ヘルスホルム、フレティズヴァイ3番
(74) 代理人	100081422
	弁理士 田中 光雄
(74) 代理人	100084146
	弁理士 山崎 宏
(74) 代理人	100122301
	弁理士 富田 憲史
(74) 代理人	100157956
	弁理士 稲井 史生

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マイクロMIR

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

7 - 9 核酸塩基の連続核酸塩基配列を含む7 - 9 核酸塩基の長さのオリゴマーであって、オリゴマーの核酸塩基単位のすべてがロックト核酸(LNA)核酸塩基単位であり、連続核酸塩基配列の核酸塩基単位の間が存在するすべてのヌクレオシド間結合がホスホロチオエートヌクレオシド間結合であり、連続核酸塩基配列が、哺乳動物、ヒトまたはウイルスのマイクロRNA配列のシード配列に完全に相補的な配列である、オリゴマー。

【請求項2】

3'末端LNA単位および5'末端LNA単位を含む請求項1のオリゴマー。

【請求項3】

オリゴマーが連続核酸塩基配列からなる請求項1または2のオリゴマー。

【請求項4】

連続核酸塩基配列が以下からなる群から選択されるmiRNAに存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項1 - 3のいずれかのオリゴマー：ebv-miR-BART1-3p、ebv-miR-BART1-5p、ebv-miR-BART10、ebv-miR-BART11-3p、ebv-miR-BART11-5p、ebv-miR-BART12、ebv-miR-BART13、ebv-miR-BART14、ebv-miR-BART15、ebv-miR-BART16、ebv-miR-BART17-3p、ebv-miR-BART17-5p、ebv-miR-BART18-3p、ebv-miR-BART18-5p、ebv-miR-BART19-3p、ebv-miR-BART19-5p、ebv-miR-BART2-3p、ebv-miR-BART2-5p、ebv-miR-BART20-3p、ebv-miR-BART20-5p、ebv-miR-BART3、ebv-miR-BART4、ebv-miR-BART5、ebv-miR-BART6-3p、ebv-miR-BART6-5p、ebv-miR-BART7、ebv-miR-BART8、ebv-miR-BART9、ebv-miR-BHRF1

-1, ebv-miR-BHRF1-2, ebv-miR-BHRF1-2*, ebv-miR-BHRF1-3, hcmv-miR-UL112, hcmv-miR-UL148D, hcmv-miR-UL22A, hcmv-miR-UL22A*, hcmv-miR-UL36, hcmv-miR-UL70-3p, phcmv-miR-UL70-5p, hcmv-miR-US25-1, hcmv-miR-US25-2-3p, hcmv-miR-US25-2-5p, hcmv-miR-US33-3p, hcmv-miR-US33-5p, hcmv-miR-US4, hcmv-miR-US5-1, hcmv-miR-US5-2, hsa-let-7a, hsa-let-7b, hsa-let-7c, hsa-let-7d, hsa-let-7e, hsa-let-7f, hsa-let-7g, hsa-let-7i, hsa-miR-1, hsa-miR-100, hsa-miR-101, hsa-miR-103, hsa-miR-105, hsa-miR-106a, hsa-miR-106b, hsa-miR-107, hsa-miR-10a, hsa-miR-10b, hsa-miR-122, hsa-miR-124, hsa-miR-125a-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b, hsa-miR-126, hsa-miR-126*, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-127-5p, hsa-miR-128, hsa-miR-129-3p, hsa-miR-129-5p, hsa-miR-130a, hsa-miR-130b, hsa-miR-132, hsa-miR-133a, hsa-miR-133b, hsa-miR-134, hsa-miR-135a, hsa-miR-135b, hsa-miR-136, hsa-miR-137, hsa-miR-138, hsa-miR-139-3p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-141, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-142-5p, hsa-miR-143, hsa-miR-144, hsa-miR-145, hsa-miR-146a, hsa-miR-146b-3p, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-147, hsa-miR-148a, hsa-miR-148b, hsa-miR-149, hsa-miR-150, hsa-miR-151-3p, hsa-miR-151-5p, hsa-miR-152, hsa-miR-153, hsa-miR-154, hsa-miR-154*, hsa-miR-155, hsa-miR-15a, hsa-miR-15b, hsa-miR-16, hsa-miR-17, hsa-miR-181a, hsa-miR-181a*, hsa-miR-181b, hsa-miR-181c, hsa-miR-181d, hsa-miR-182, hsa-miR-182*, hsa-miR-183, hsa-miR-184, hsa-miR-185, hsa-miR-186, hsa-miR-187, hsa-miR-188-3p, hsa-miR-188-5p, hsa-miR-18a, hsa-miR-18a*, hsa-miR-18b, hsa-miR-190, hsa-miR-191, hsa-miR-191*, hsa-miR-192, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b, hsa-miR-194, hsa-miR-195, hsa-miR-196a, hsa-miR-196b, hsa-miR-197, hsa-miR-198, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-199b-3p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-19a, hsa-miR-19b, hsa-miR-200a, hsa-miR-200a*, hsa-miR-200b, hsa-miR-200c, hsa-miR-202, hsa-miR-202*, hsa-miR-203, hsa-miR-204, hsa-miR-205, hsa-miR-206, hsa-miR-208a, hsa-miR-208b, hsa-miR-20a, hsa-miR-20b, hsa-miR-21, hsa-miR-210, hsa-miR-211, hsa-miR-212, hsa-miR-214, hsa-miR-215, hsa-miR-216a, hsa-miR-216b, hsa-miR-217, hsa-miR-218, hsa-miR-219-1-3p, hsa-miR-219-2-3p, hsa-miR-219-5p, hsa-miR-22, hsa-miR-220a, hsa-miR-220b, hsa-miR-220c, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-223, hsa-miR-224, hsa-miR-23a, hsa-miR-23b, hsa-miR-24, hsa-miR-25, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-27a, hsa-miR-27b, hsa-miR-28-3p, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-296-3p, hsa-miR-296-5p, hsa-miR-299-3p, hsa-miR-299-5p, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-29c, hsa-miR-301a, hsa-miR-301b, hsa-miR-302a, hsa-miR-302a*, hsa-miR-302b, hsa-miR-302b*, hsa-miR-302c, hsa-miR-302c*, hsa-miR-302d, hsa-miR-30a, hsa-miR-30b, hsa-miR-30c, hsa-miR-30d, hsa-miR-30e, hsa-miR-31, hsa-miR-32, hsa-miR-320a, hsa-miR-320b, hsa-miR-320c, hsa-miR-320d, hsa-miR-323-3p, hsa-miR-323-5p, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-325, hsa-miR-326, hsa-miR-328, hsa-miR-329, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-330-5p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-331-5p, hsa-miR-335, hsa-miR-337-3p, hsa-miR-337-5p, hsa-miR-338-3p, hsa-miR-338-5p, hsa-miR-339-3p, hsa-miR-339-5p, hsa-miR-33a, hsa-miR-33b, hsa-miR-340, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-342-5p, hsa-miR-345, hsa-miR-346, hsa-miR-34a, hsa-miR-34b, hsa-miR-34c-3p, hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-361-3p, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-362-3p, hsa-miR-362-5p, hsa-miR-363, hsa-miR-363*, hsa-miR-365, hsa-miR-367, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-369-5p, hsa-miR-370, hsa-miR-371-3p, hsa-miR-371-5p, hsa-miR-372, hsa-miR-373, hsa-miR-373*, hsa-miR-374a, hsa-miR-374b, hsa-miR-375, hsa-miR-376a, hsa-miR-376a*, hsa-miR-376b, hsa-miR-377, hsa-miR-378, hsa-miR-379, hsa-miR-380, hsa-miR-381, hsa-miR-382, hsa-miR-383, hsa-miR-384, hsa-miR-409-3p, hsa-miR-409-5p, hsa-miR-410, hsa-miR-411, hsa-miR-412, hsa-miR-421, hsa-miR-422a, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-424, hsa-miR-425, hsa-miR-429, hsa-miR-431, hsa-miR-432, hsa-miR-432*, hsa-miR-433, hsa-miR-448, hsa-miR-449a, hsa-miR-449b, hsa-miR-450a, hsa-miR-450b-3p, hsa-miR-450b-5p, hsa-miR-451, hsa-miR-452, hsa-miR-452*, hsa-miR-453, hsa-mi

10

20

30

40

50

R-454, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-455-5p, hsa-miR-483-3p, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-484, hsa-miR-485-3p, hsa-miR-485-5p, hsa-miR-486-3p, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-487a, hsa-miR-487b, hsa-miR-488, hsa-miR-489, hsa-miR-490-3p, hsa-miR-490-5p, hsa-miR-491-3p, hsa-miR-491-5p, hsa-miR-492, hsa-miR-493, hsa-miR-494, hsa-miR-495, hsa-miR-496, hsa-miR-497, hsa-miR-498, hsa-miR-499-3p, hsa-miR-499-5p, hsa-miR-500, hsa-miR-501-3p, hsa-miR-501-5p, hsa-miR-502-3p, hsa-miR-502-5p, hsa-miR-503, hsa-miR-504, hsa-miR-505, hsa-miR-506, hsa-miR-507, hsa-miR-508-3p, hsa-miR-508-5p, hsa-miR-509-3-5p, hsa-miR-509-3p, hsa-miR-509-5p, hsa-miR-510, hsa-miR-511, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-512-5p, hsa-miR-513a-3p, hsa-miR-513a-5p, hsa-miR-514, hsa-miR-515-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-516a-3p, hsa-miR-516a-5p, hsa-miR-517*, hsa-miR-517a, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a-3p, hsa-miR-518b, hsa-miR-518c, hsa-miR-518c*, hsa-miR-518d-3p, hsa-miR-518d-5p, hsa-miR-518e, hsa-miR-518f, hsa-miR-518f*, hsa-miR-519a, hsa-miR-519b-3p, hsa-miR-519c-3p, hsa-miR-519d, hsa-miR-519e, hsa-miR-519e*, hsa-miR-520a-3p, hsa-miR-520a-5p, hsa-miR-520b, hsa-miR-520c-3p, hsa-miR-520d-3p, hsa-miR-520d-5p, hsa-miR-520e, hsa-miR-520f, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-521, hsa-miR-522, hsa-miR-523, hsa-miR-524-3p, hsa-miR-524-5p, hsa-miR-525-3p, hsa-miR-525-5p, hsa-miR-526b, hsa-miR-526b*, hsa-miR-527, hsa-miR-532-3p, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-539, hsa-miR-542-3p, hsa-miR-542-5p, hsa-miR-544, hsa-miR-545, hsa-miR-548a-3p, hsa-miR-548a-5p, hsa-miR-548b-3p, hsa-miR-548b-5p, hsa-miR-548c-3p, hsa-miR-548c-5p, hsa-miR-548d-3p, hsa-miR-548d-5p, hsa-miR-549, hsa-miR-550, hsa-miR-551a, hsa-miR-551b, hsa-miR-552, hsa-miR-553, hsa-miR-554, hsa-miR-555, hsa-miR-556-3p, hsa-miR-556-5p, hsa-miR-557, hsa-miR-558, hsa-miR-559, hsa-miR-561, hsa-miR-562, hsa-miR-563, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-567, hsa-miR-568, hsa-miR-569, hsa-miR-570, hsa-miR-571, hsa-miR-572, hsa-miR-573, hsa-miR-574-3p, hsa-miR-574-5p, hsa-miR-575, hsa-miR-576-3p, hsa-miR-576-5p, hsa-miR-577, hsa-miR-578, hsa-miR-579, hsa-miR-580, hsa-miR-581, hsa-miR-582-3p, hsa-miR-582-5p, hsa-miR-583, hsa-miR-584, hsa-miR-585, hsa-miR-586, hsa-miR-587, hsa-miR-588, hsa-miR-589, hsa-miR-590-3p, hsa-miR-590-5p, hsa-miR-591, hsa-miR-592, hsa-miR-593, hsa-miR-595, hsa-miR-596, hsa-miR-597, hsa-miR-598, hsa-miR-599, hsa-miR-600, hsa-miR-601, hsa-miR-602, hsa-miR-603, hsa-miR-604, hsa-miR-605, hsa-miR-606, hsa-miR-607, hsa-miR-608, hsa-miR-609, hsa-miR-610, hsa-miR-611, hsa-miR-612, hsa-miR-613, hsa-miR-614, hsa-miR-615-3p, hsa-miR-615-5p, hsa-miR-616, hsa-miR-617, hsa-miR-618, hsa-miR-619, hsa-miR-620, hsa-miR-621, hsa-miR-622, hsa-miR-623, hsa-miR-624, hsa-miR-625, hsa-miR-626, hsa-miR-627, hsa-miR-628-3p, hsa-miR-628-5p, hsa-miR-629, hsa-miR-630, hsa-miR-631, hsa-miR-632, hsa-miR-633, hsa-miR-634, hsa-miR-635, hsa-miR-636, hsa-miR-637, hsa-miR-638, hsa-miR-639, hsa-miR-640, hsa-miR-641, hsa-miR-642, hsa-miR-643, hsa-miR-644, hsa-miR-645, hsa-miR-646, hsa-miR-647, hsa-miR-648, hsa-miR-649, hsa-miR-650, hsa-miR-651, hsa-miR-652, hsa-miR-653, hsa-miR-654-3p, hsa-miR-654-5p, hsa-miR-655, hsa-miR-656, hsa-miR-657, hsa-miR-658, hsa-miR-659, hsa-miR-660, hsa-miR-661, hsa-miR-662, hsa-miR-663, hsa-miR-668, hsa-miR-671-3p, hsa-miR-671-5p, hsa-miR-7, hsa-miR-758, hsa-miR-765, hsa-miR-766, hsa-miR-767-3p, hsa-miR-767-5p, hsa-miR-769-3p, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-770-5p, hsa-miR-802, hsa-miR-9, hsa-miR-9*, hsa-miR-92a, hsa-miR-92b, hsa-miR-93, hsa-miR-95, hsa-miR-96, hsa-miR-98, hsa-miR-99a, hsa-miR-99b, hsv1-miR-H1, kshv-miR-K12-1, kshv-miR-K12-10a, kshv-miR-K12-10b, kshv-miR-K12-11, kshv-miR-K12-12, kshv-miR-K12-2, kshv-miR-K12-3, kshv-miR-K12-3*, kshv-miR-K12-4-3p, kshv-miR-K12-4-5p, kshv-miR-K12-5, kshv-miR-K12-6-3p, kshv-miR-K12-6-5p, kshv-miR-K12-7, kshv-miR-K12-8, kshv-miR-K12-9, およびkshv-miR-K12-9*。

【請求項5】

10

20

30

40

50

連続核酸塩基配列が以下からなる群から選択されるmiRNAに存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項1-3のいずれかのオリゴマー：miR-1、miR-10b、miR-17-3p、miR-18、miR-19a、miR-19b、miR-20、miR-21、miR-34a、miR-93、miR-106a、miR-106b、miR-122、miR-133、miR-134、miR-138、miR-155、miR-192、miR-194、miR-221、miR-222、およびmiR-375。

【請求項6】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-33aまたはhsa-miR-33bに存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項1-3のいずれかのオリゴマー。

【請求項7】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-9またはhsa-miR-9*に存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項1-3のいずれかのオリゴマー。

10

【請求項8】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-10aまたはhsa-miR-10bに存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項1-3のいずれかのオリゴマー。

【請求項9】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-20aまたはhsa-miR-20bに存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項1-3のいずれかのオリゴマー。

【請求項10】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-19aまたはhsa-miR-19bに存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項1-3のいずれかのオリゴマー。

20

【請求項11】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-106aに存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項1-3のいずれかのオリゴマー。

【請求項12】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-155に存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項1-3のいずれかのオリゴマー。

【請求項13】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-21に存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項1-3のいずれかのオリゴマー。

【請求項14】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-122に存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項1-3のいずれかのオリゴマー。

30

【請求項15】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-208aまたはhsa-miR-208bに存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項1-3のいずれかのオリゴマー。

【請求項16】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-499-3pまたはhsa-miR-499-5pに存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項1-3のいずれかのオリゴマー。

【請求項17】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-15に存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項1-3のいずれかのオリゴマー。

40

【請求項18】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-195に存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項1-3のいずれかのオリゴマー。

【請求項19】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-451に存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項1-3のいずれかのオリゴマー。

【請求項20】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-29a、hsa-miR-29bまたはhsa-miR-29cに存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項1-3のいずれかのオリゴマー。

50

【請求項 2 1】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-92aまたはhsa-miR-92bに存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項 1 - 3 のいずれかのオリゴマー。

【請求項 2 2】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-143に存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項 1 - 3 のいずれかのオリゴマー。

【請求項 2 3】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-145に存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項 1 - 3 のいずれかのオリゴマー。

【請求項 2 4】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-199a-5p、hsa-miR-199b-3pまたはhsa-miR-199b-5pに存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項 1 - 3 のいずれかのオリゴマー。

【請求項 2 5】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-206に存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項 1 - 3 のいずれかのオリゴマー。

【請求項 2 6】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-378に存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項 1 - 3 のいずれかのオリゴマー。

【請求項 2 7】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-375に存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項 1 - 3 のいずれかのオリゴマー。

【請求項 2 8】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-138に存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項 1 - 3 のいずれかのオリゴマー。

【請求項 2 9】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-34aに存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項 1 - 3 のいずれかのオリゴマー。

【請求項 3 0】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-27aに存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項 1 - 3 のいずれかのオリゴマー。

【請求項 3 1】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-182に存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項 1 - 3 のいずれかのオリゴマー。

【請求項 3 2】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-183に存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項 1 - 3 のいずれかのオリゴマー。

【請求項 3 3】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-96に存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項 1 - 3 のいずれかのオリゴマー。

【請求項 3 4】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-338-3pまたはhsa-miR-338-5pに存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項 1 - 3 のいずれかのオリゴマー。

【請求項 3 5】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-30に存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項 1 - 3 のいずれかのオリゴマー。

【請求項 3 6】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-133aまたはhsa-miR133bに存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項 1 - 3 のいずれかのオリゴマー。

【請求項 3 7】

連続核酸塩基配列がhsa-miR-17に存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請

10

20

30

40

50

求項 1 - 3 のいずれかのオリゴマー。

【請求項 38】

連続核酸塩基配列が hsa-miR-24 に存在する対応するヌクレオチド配列に相補的である請求項 1 - 3 のいずれかのオリゴマー。

【請求項 39】

連続核酸塩基配列が以下からなる群から選択される配列からなるかまたはかかる配列を含む請求項 1 - 3 のいずれかのオリゴマー：AAAAGAT、AAACCAC、AAACCGT、AAACTGT、AAAC
TTT、AAAGACA、AAAGGAT、AAAGGGA、AAATGAA、AACACCC、AACATAC、AACATTC、AACCATTA、AAC
CATC、AACCTGC、AACGGTT、AACTGAC、AACTGGA、AACTGTA、AAGCAAT、AAGCACA、AAGCACT、AA
GCCAT、AAGGCAT、AAGGGAT、AAGTCCA、AAGTGA、AAGTGTT、AAGTTAC、AATCTAC、AATGCAT、A
ATGGAG、AATGGGT、AATGTGA、ACAAAAC、ACAACCT、ACAACCTT、ACAAGAA、ACACAAG、ACACTAC、
ACACTCC、ACACTGG、ACAGGGT、ACAGGTT、ACATATC、ACATTCC、ACCAAAG、ACCAATC、ACCATTT
、ACCGAGC、ACCGTTT、ACGCAC、ACGTGGG、ACTACCT、ACTAGGT、ACTATTA、ACTGAAA、ACTGCAG
、ACTGCCT、ACTGGCT、ACTGTAG、ACTGTGA、ACTTTAT、AGAAAAT、AGAATAC、AGACACG、AGACAG
C、AGACCGC、AGACTCA、AGAGGGA、AGCACTT、AGCATTA、AGCATT、AGCCAGC、AGCCTAG、AGCGC
AG、AGCGCGT、AGCGCTT、AGCTCAT、AGCTCCT、AGCTGCT、AGCTGGG、AGGAAGC、AGGAGTG、AGGC
ACT、AGGCGCC、AGGCGTT、AGGCGAG、AGGGCCA、AGGTCTC、AGGTGCA、AGTAGTT、AGTCAGC、AGT
CTAG、AGTCTTA、AGTGCCT、AGTGTGT、AGTTCTC、AGTTGTC、ATAACCT、ATAAGCT、ATAATAT、AT
ACAAG、ATACCCA、ATACCTC、ATACTGT、ATAGGAA、ATATGCA、ATCAGGT、ATCATGA、ATCCCCG、A
TCCTAA、ATCTCCA、ATCTTGC、ATGAAGG、ATGACGT、ATGCACG、ATGCAGT、ATGCTGC、ATGCTGG、
ATGGTGC、ATGTACA、ATGTAGC、ATGTCAC、ATGTCTT、ATGTTAA、ATGTTTC、ATTACAT、ATTAGAA
、ATTCTCA、ATTCTTT、ATTGTGA、ATTTCTC、ATTTGAA、CAACACC、CAACACT、CAAGCAC、CAAGGA
T、CAAGGGA、CAATGCA、CACTT、CACCAGC、CACCTGT、CACGTTT、CACTAAG、CACTCTA、CACTG
CC、CACTGTG、CACTTCA、CACTTTG、CAGAATT、CAGACTG、CAGATGG、CAGCACT、CAGCAGG、CAGC
CTC、CAGCTTT、CAGGGTC、CAGGTCC、CAGTATT、CAGTCAC、CAGTGTT、CAGTTTT、CATGGTC、CAT
GTAA、CATTAAAC、CATTGTG、CATTTC、CCAACCTC、CCACACA、CCACAGG、CCACCCC、CCAGGGG、CC
AGGTC、CCAGGTT、CCATCCA、CCATCCC、CCATGTC、CCCACAT、CCCAGAG、CCCAGGC、CCCCAG、C
CCCGCC、CCCGTGT、CCGTGCC、CCGTTGA、CCTCCAA、CCTCCGC、CCTCTTT、CCTGAGT、CCTGCTA、
CCTGCTG、CCTGTAA、CCTGTGA、CCTTCAT、CGAACAA、CGAACTT、CGATCCC、CGCAAAA、CGCAGCC
、CGCGCCT、CGCTGCT、CGGTACG、CGGTGCT、CGGTGTG、CGTCACT、CGTCTTA、CTACAGT、CTACCT
C、CTACTAG、CTACTGT、CTAGACC、CTAGGAA、CTATGAT、CTATGCA、CTCAAGA、CTCAGGG、CTCCA
AG、CTCCTCC、CTCTAGA、CTCTATG、CTCTGGA、CTGAGCC、CTGTAAG、CTGTAC、CTGTTAC、CTGT
TGA、CTGTTTT、CTTACCC、CTTGTAT、CTTTGCA、CTTTGTA、GAACCAA、GAATGTG、GACAATC、GAC
ACAA、GACAGGG、GACCAAC、GACCGCG、GACCTTC、GACTGTT、GAGACGC、GAGACGG、GAGACTG、GA
GCAAT、GAGCCAG、GAGCCTG、GAGCGGA、GAGCGGT、GAGCTGG、GAGGACG、GAGTGAC、GATAGGG、G
ATCCA、GATCCCC、GATTTTT、GCAAAAA、GCAAGAC、GCAAGGA、GCACAAT、GCACACT、GCACCTT、
GCACTTT、GCAGACA、GCAGCCA、GCAGCGA、GCAGCTC、GCAGGCT、GCATACA、GCATCCT、GCATTTG
、GCCACAC、GCCAAG、GCCACC、GCGCACG、GCGCCAT、GCGCCTT、GCGCTTT、GCTACTT、GCTAGT
T、GCTCTTG、GCTGAGT、GCTGCTG、GCTGGAG、GCTTGAA、GCTTGTC、GGAAGTC、GGACTAG、GGATC
CG、GGCACAT、GGCACTT、GGCAGAC、GGCAGCT、GGCAGTG、GGCCAGT、GGCCTGG、GGCGGCA、GGCT
CGG、GGCTTCC、GGGACCA、GGGAGAA、GGGATGC、GGGATTT、GGGCATT、GGGGCCC、GGTAACC、GGT
GAAG、GGTGTGT、GGTTATG、GGTTCTT、GGTTTTT、GTAAACC、GTAAGAC、GTAAGAT、GTACAGG、GT
ACGAT、GTAAGTG、GTAAGTGT、GTAGGCA、GTAGGGT、GTATGAT、GTATTAT、GTATTCT、GTCAACC、G
TCACAA、GTCAGGA、GTCCTCG、GTCCTCT、GTCGATC、GTCTACC、GTCTACT、GTCTTCC、GTGACAC、
GTGACTT、GTGCAAA、GTGCAAT、GTGCCAA、GTGCCAT、GTGCCTT、GTGGCCA、GTGGTGA、GTGGTGC
、GTGTCAA、GTGTCTAT、GTGTGAG、GTGTGCG、GTGTTGA、GTAAAG、GTTATAT、GTTTAGC、GTTTGT
T、TAATAAT、TAATGTG、TACAATC、TACGCC、TACGGGT、TACTTGA、TAGAACC、TAGAGTT、TAGCT
TT、TAGGTCA、TATCATA、TATCTGG、TATGGAA、TATTATA、TCACCTT、TCAGGTT、TCATCTC、TCCA
CCC、TCCAGAG、TCCAGAT、TCCAGGT、TCCCCAC、TCCCGTT、TCCGTCC、TCCTTCC、TCGATGG、TCT
AGAG、TCTATGA、TCTCTCC、TCTGATA、TCTGATC、TCTGGAC、TCTGGTG、TGAATGT、TGACACA、TG

10

20

30

40

50

AGATT、TGAGCAG、TGAGCGT、TGCAAAC、TGCACGA、TGCACTG、TGCACTT、TGCAGAA、TGCCAG、TGCCTCC、TGCCTTA、TGCTAGC、TGCTGCT、TGCTGGT、TGCTTTG、TGGATCA、TGGGATC、TGGGTGC、TGGTACT、TGGTGCC、TGGTGCT、TGTATGA、TGTATTA、TGTGTGA、TGTTACT、TGTTCTG、TGTTTAC、TGTTTCA、TACTAG、TACTTT、TAGCTC、TATACA、TCAACG、TCCCCC、TCCCCA、TCCGT、TTGCACT、TTGCCAA、TTGCTGA、TTGGAGA、TTGGGAG、TTTATCT、TTTGAC、TTTGTAG、およびTTTTGAG。

【請求項 40】

連続核酸塩基配列が以下からなる群から選択される配列からなるかまたはかかる配列を含む請求項 1 - 3 のいずれかのオリゴマー：

AAAACCAC、AAAAGACA、AAACACCC、AAACCATA、
 AAACCATC、AAACTGAC、AAACTGGA、AAAGCCAT、AAATGGAG、AACAAAAC、AACAACTT、AACACAAG、
 AACACTAC、AACACTGG、AACATATC、AACATTCC、AACCAAAG、AACCATTT、AACGTGGG、AACTACCT、
 AACTGGCT、AAGACACG、AAGCACTT、AAGCATT、AAGCGCAG、AAGCGCGT、AAGCGCTT、AAGGAAGC、
 AAGGCACT、AAGTCTTA、AAGTGCGT、AATAAGCT、AATGAAGG、AATGCTGC、AATGTAGC、AATTAGAA、
 AATTCTTT、AATTTCTC、ACAACACC、ACAACACT、ACAATGCA、ACACCAGC、ACACTGCC、ACAGAATT、
 ACAGCACT、ACAGTATT、ACAGTGTT、ACATTTCA、ACCACAGG、ACCACCCC、ACCCAGGC、ACCGTGCC、
 ACGAACAA、ACGGTACG、ACGGTGTG、ACTACAGT、ACTACCTC、ACTACTGT、ACTATGAT、ACTATGCA、
 ACTCCAAG、ACTGAGCC、AGAATGTG、AGACCTTC、AGACTGTT、AGAGCAAT、AGATCCCA、AGATTTTT、
 AGCAAGGA、AGCACTTT、AGCAGACA、AGCAGCTC、AGCATTGT、AGCCACAC、AGCGCCTT、AGCGCTTT、
 AGCTACTT、AGGACTAG、AGGCACAT、AGGCACTT、AGGCCAGT、AGGCTCGG、AGGTGAAG、AGGTGTGT、
 AGGTTCTT、AGTAAGAC、AGTACAGG、AGTACTGT、AGTAGGCA、AGTATTCT、AGTCAGGA、AGTCTACC、
 AGTCTTCC、AGTGACAC、AGTGACTT、AGTGCAAT、AGTGCCAA、AGTGCCAT、AGTGGTGC、AGTGTCAA、
 AGTGTTGA、ATACGCCC、ATAGGTCA、ATCAGGTT、ATCCACCC、ATCTAGAG、ATGAATGT、ATGAGCAG、
 ATGAGCGT、ATGCACGA、ATGCACTG、ATGCACTT、ATGCAGAA、ATGGGATC、ATGGGTGC、ATGGTGCT、
 ATGTATTA、ATGTTTAC、ATTCCCGA、ATTCCGTT、ATTGCACT、ATTGCCAA、ATTTGCAC、ATTTTGAG、
 CAAAAGAT、CAAAGTGT、CAAAGGAT、CAAAGGGA、CAAATGAA、CAACATTC、CAACTGTA、CAAGCACA、
 CAAGGCAT、CAAGGGAT、CAAGTCCA、CAAGTGGA、CAAGTTAC、CAATGCAT、CAATGGGT、CAATGTGA、
 CACAAGAA、CAACTCC、CACAGGTT、CACCGTTT、CACGCACA、CACTAGGT、CACTGCAG、CACTGCCT、
 CACTGTAG、CACTGTGA、CAGAAAAT、CAGAATAC、CAGACAGC、CAGACCGC、CAGCACTT、CAGCATT、
 CAGCCTAG、CAGCTGCT、CAGCTGGG、CAGGCGCC、CAGGCGTT、CAGGTGCA、CAGTAGTT、CAGTCTAG、
 CAGTGTGT、CAGTTCTC、CATACAAG、CATAGGAA、CATATGCA、CATCAGGT、CATCATGA、CATCTTGC、
 CATGGTGC、CATGTACA、CATGTTAA、CATTCTCA、CCAAGGAT、CCACGTTT、CCACTAAG、CCACTCTA、
 CCAGATGG、CCAGCAGG、CCAGCCTC、CCAGCTTT、CCAGGGTC、CCAGTCAC、CCAGTTTT、CCATGGTC、
 CCATGTAA、CCCAGGGG、CCCATCCC、CCCGTTGA、CCCTCCGC、CCCTGTGA、CCGCAGCC、CCGCTGCT、
 CCGTCACT、CCTACCTC、CCTACTAG、CCTAGACC、CCTCAAGA、CCTCTAGA、CCTCTATG、CCTCTGGA、
 CCTTGTAT、CCTTTGCA、CCTTTGTA、CGAGACGC、CGAGCGGA、CGAGTGAC、CGATCCCC、CGAAAAA、
 CGCAGCGA、CGGATCCG、CGTAGGGT、CGTCCTCT、CGTGCAA、CGTGCAAT、CGTGTCAT、CTACAATC、
 CTACGGGT、CTAGAACC、CTAGCTTT、CTATCATA、CTATGGAA、CTCCAGAG、CTCCAGAT、CTCCGTCC、
 CTCTATGA、CTCTGGAC、CTGAGATT、CTGCAAAC、CTGCCAG、CTGCCTCC、CTGGATCA、CTGGTACT、
 CTGGTGCC、CTTACTAG、CTTCAACG、CTTTGTAG、GAAACCGT、GAACATAC、GAACCTGC、GAAGCACT、
 GAAGTGTT、GAATCTAC、GACAACCT、GACCGAGC、GACTGAAA、GAGACTCA、GAGAGGGA、GAGCCAGC、
 GAGCTCAT、GAGCTCCT、GAGGAGTG、GAGGGCCA、GAGGTCTC、GAGTCAGC、GATAACCT、GATAAGCT、
 GATCCCGG、GATGACGT、GATGCACG、GATGCAGT、GATGCTGG、GATGTAGC、GATGTCAC、GATTGTGA、
 GATTTGAA、GCAAGCAC、GCAAGGGA、GCAATGCA、GCACACTT、GCACTTTG、GCAGACTG、GCAGGTCC、
 GCAGTATT、GCATTGTG、GCCAACTC、GCCAGGTC、GCCATCCA、GCCCAGAG、GCCCCAG、GCCCCGCC、
 GCCCGTGT、GCCTGCTA、GCCTGCTG、GCCTTCAT、GCGAACTT、GCGATCCC、GCGGTGCT、GCTGTTAC、
 GCTGTTTT、GCTTACCC、GGACAATC、GGACAGGG、GGACCAAC、GGAGCCAG、GGAGCTGG、GGAGGACG、
 GGCACAAT、GGCACTTT、GGCAGGCT、GGCATAACA、GGCATCCT、GGCCCACC、GGCGCAGC、GGCGCCAT、
 GGCTAGTT、GGCTGAGT、GGCTGGAG、GGCTTGAA、GGCTTGTC、GGGAAGTC、GGGCAGAC、GGGCAGTG、
 GGGCCAGT、GGGCTTCC、GGGGACCA、GGGGATGC、GGGGCATT、GGGGGCC、GGGTAACC、GGTAAACC、
 GGTAAAGAT、GGTACTGG、GGTCAACC、GGTCACAA、GGTCCTCG、GGTCGATC、GGTCTACT、GGTGCAA、

GGTGCCTT、GGTGGTGA、GGTGTGCG、GGTTTAGC、GTAATAAT、GTAATGTG、GTAGAGTT、GTATTATA、GTCCAGGT、GTCCTTCC、GTCGATGG、GTGCACTG、GTGCCCTTA、GTGCTGCT、GTGCTGGT、GTGCTTTG、GTGGGTCG、GTGTATGA、GTTGGGAG、GTTTTGAG、TAAACTTT、TAACGGTT、TAAGCAAT、TAAGTCCA、TACAGGGT、TACATTCC、TACCAATC、TACTATTA、TACTTTAT、TAGCATT A、TAGGGCAG、TAGTTGTC、TATAATAT、TATACCCA、TATACCTC、TATACTGT、TATCCTAA、TATCTCCA、TATGTCTT、TATGTTTC、TATTACAT、TCACCTGT、TCACTGTG、TCACTTCA、TCATTAAC、TCCACACA、TCCAGGTT、TCCATGTC、TCCCACAT、TCCTCCAA、TCCTCTTT、TCCTGAGT、TCCTGTAA、TCGCAAAA、TCGCGCCT、TCGTCTTA、TCTAGGAA、TCTCAGGG、TCTCCTCC、TCTGTAAG、TCTGTACAC、TCTGTTGA、TGAACCAA、TGACACAA、TGACCGCG、TGAGACGG、TGAGACTG、TGAGCCTG、TGAGCGGT、TGATAGGG、TGCAAGAC、TGCACACT、TGCACCTT、TGCAGCCA、TGCCCAAG、TGCTCTTG、TGCTGCTG、TGCCAGCT、TGGCCTGG、TGGCGGCA、TGGGAGAA、TGGGATTT、TGGTTATG、TGGTTTTT、TGTACGAT、TGTATGAT、TGTATTAT、TGTC AAC、TGTGCAAT、TGTGGCCA、TGTGTGAG、TGTTAAAG、TGTTATAT、TGTTTGTT、T TACTTGA、TTATCTGG、TTCACCTT、TTCATCTC、TTCCCCAC、TTCCCGTT、TTCTCTCC、TTCTGATA、TTCTGATC、TTCTGGTG、TTGAATGT、TGACACA、TTGCTAGC、TTGCTGCT、TTGTGTGA、TTGTTACT、TTGTTCTG、TTGTTTCA、TTACTTTT、TTTAGCTC、TTTATACA、TTTCCCCC、TTTGCTGA、TTTGGAGA、およびTTTTATCT。

【請求項 4 1】

オリゴマーが 7 つの L N A 核酸塩基の連続核酸塩基配列からなり、すべてのヌクレオシド間結合がホスホロチオエートである請求項 1 - 4 0 のいずれかのオリゴマー。

【請求項 4 2】

オリゴマーが 8 つの L N A 核酸塩基の連続核酸塩基配列からなり、すべてのヌクレオシド間結合がホスホロチオエートである請求項 1 - 4 0 のいずれかのオリゴマー。

【請求項 4 3】

オリゴマーが 9 つの L N A 核酸塩基の連続核酸塩基配列からなり、すべてのヌクレオシド間結合がホスホロチオエートである請求項 1 - 4 0 のいずれかのオリゴマー。

【請求項 4 4】

医薬として使用するための請求項 1 - 4 3 のいずれかのオリゴマー。

【請求項 4 5】

細胞におけるマイクロRNA ターゲットの有効量を減少させるためのインビトロでの方法であって、請求項 1 - 4 3 のいずれかのオリゴマーを含む組成物を、細胞におけるマイクロRNA の有効量を減少させるために投与することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[発明の分野]

本発明は、インビボでマイクロRNA をターゲットとし、それを阻害する、極めて短いオリゴヌクレオチド、ならびに医薬および医薬組成物におけるそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

[発明の背景]

マイクロRNA (miRNA) は、そのターゲット mRNA との塩基対形成によって遺伝子発現の転写後調節因子として作用する、豊富に存在する一群の短い内在性 RNA である。これらは、プレ-miRNA と呼ばれる、より長い (約 70 ~ 80 nt の) ヘアピン様前駆体から、RNase III 酵素ダイサー (Dicer) によってプロセシングされる。マイクロRNA は miRNP と呼ばれるリボ核タンパク質複合体に組み立てられ、そのターゲット部位をアンチセンス相補性によって認識することにより、そのターゲット遺伝子のダウンレギュレーションを媒介する。miRNA とそのターゲット部位の間のほぼ完全なまたは完全な相補性が、ターゲット mRNA の切断をもたらすのに対し、マイクロRNA とターゲット部位の間の限定された相補性は、ターゲット遺伝子の翻訳阻害をもたらす。

【0003】

ヒト疾患におけるマイクロRNA の役割および一本鎖オリゴヌクレオチドを使ったマイク

10

20

30

40

50

口RNAの阻害は、WO2007/112754およびWO2007/112753に要約されており、これらの文献はどちらも参照によりそのすべてが本明細書に組み込まれる。参照により本明細書に組み込まれるWO2008046911には、がんに関連するマイクロRNA配列が記載されている。数多くのマイクロRNAが疾患表現型と関連づけられているので、インピボでマイクロRNAの利用可能性を調整する能力を持つ物質を提供することは望ましい。WO2007/112754およびWO2007/112753には、そのターゲットmiRNAと強い二重鎖を形成すると考えられる短い一本鎖オリゴヌクレオチドが開示されている。配列番号 1~45はWO2007/112754およびWO2007/112753に開示されている抗マイクロRNAオリゴヌクレオチドの例である。

【 0 0 0 4 】

[関連出願]

本願は次に挙げる4つの出願に基づく優先権を主張する：US 60/977497（出願日2007年10月4日）、US 60/979217（出願日2007年10月11日）、US 61/028062（出願日2008年2月12日）、およびEP08104780（出願日2008年7月17日）（これらはすべて参照により本明細書に組み込まれる）。さらにまた、我々は、同じ出願人による先の出願であるWO2007/112754およびWO2007/112753を参照し、それらを参照により本明細書に組み込む。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 5 】

[発明の概要]

本発明は、マイクロRNAをターゲットとし、かつLNAヌクレオチドなどのヌクレオチド類似ヌクレオチド（nucleotide analogue nucleotide）の比率が高い、極めて短いオリゴヌクレオチドの使用が、インピボでのターゲットマイクロRNAによるmRNAなどのRNAの抑制を軽減するのに、極めて有効であるという発見に基づく。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 6 】

本発明は、細胞または生物におけるマイクロRNAターゲットの有効量を減少させるのに使用するための、7、8、9または10ヌクレオチド単位長の連続（contiguous）配列のオリゴマーであって、そのオリゴマーのヌクレオチド単位の少なくとも70%、例えば少なくとも80%が、LNA単位および2'置換ヌクレオチド類似体からなる群より選択されるものを提供する。

【 0 0 0 7 】

本発明は、細胞または生物におけるマイクロRNAターゲットの有効量を減少させるのに使用するための、7、8、9または10ヌクレオチド単位長の連続配列のオリゴマーであって、そのオリゴマーのヌクレオチド単位の少なくとも70%が、LNA単位および2'置換ヌクレオチド類似体からなる群より選択され、かつそのオリゴマーのヌクレオチド単位の少なくとも50%、例えば少なくとも60%、例えば少なくとも70%が、LNA単位であるものを提供する。

【 0 0 0 8 】

本発明は、全部で7~10ヌクレオチド、例えば7、8、9ヌクレオチド単位の連続ヌクレオチド配列を含む、7~10ヌクレオチド長のオリゴマーであって、そのオリゴマーのヌクレオチド単位の少なくとも50%がヌクレオチド類似体であるものを提供する。

【 0 0 0 9 】

本発明は、さらに、全部で7~10ヌクレオチド、例えば7、8、9、または10ヌクレオチド単位の連続ヌクレオチド配列を含む、7~10ヌクレオチド長のオリゴマーであって、そのヌクレオチド配列が、哺乳動物またはウイルスのマイクロRNAに見いだされる対応するヌクレオチドに相補的であり、かつそのオリゴマーのヌクレオチド単位の少なくとも50%がヌクレオチド類似体であるものを提供する。

【 0 0 1 0 】

本発明は医薬としての本発明のオリゴマーを提供する。

【 0 0 1 1 】

10

20

30

40

50

本発明は、本発明のオリゴマーと医薬上許容される希釈剤、担体、塩またはアジュバントを含む医薬組成物を提供する。

【0012】

本発明は、少なくとも1つの非ヌクレオチドまたは非ポリヌクレオチド物質（例えばコレステロールなどのステロール）にコンジュゲートされた本発明のオリゴマーを含むコンジュゲートを提供する。

【0013】

本発明は、マイクロRNA（例えば本明細書で言及するマイクロRNAの1つまたはそれ以上）の存在または過剰発現に関連する疾患または医学的障害を処置するための医薬を製造するための、本発明のオリゴマーまたはコンジュゲートの使用を提供する。

10

【0014】

本発明は、マイクロRNAの存在または過剰発現に関連する疾患または医学的障害の処置であって、本発明のオリゴマーまたはコンジュゲートを含む組成物（例えば医薬組成物）を、前記疾患または医学的障害を患っている患者または患いそうな患者に投与するステップを含む処置を提供する。

【0015】

本発明は、細胞または生物におけるマイクロRNAターゲットの有効量を減少させるための方法であって、本発明のオリゴマー、または本発明のオリゴマーもしくはコンジュゲートを含む組成物（例えば医薬組成物）を、その細胞または生物に投与することを含む方法を提供する。

20

【0016】

本発明は、細胞または生物におけるマイクロRNAターゲットの有効量を減少させるための方法であって、本発明のオリゴマーまたはコンジュゲートまたは医薬組成物を、その細胞または生物に投与することを含む方法を提供する。

【0017】

本発明は、細胞または生物におけるターゲットmRNA（または1つ以上のRNA）の抑制解除方法であって、本発明のオリゴマーもしくはコンジュゲート、または前記オリゴマーもしくはコンジュゲートを含む組成物を、前記細胞または生物に投与することを含む方法を提供する。

30

【0018】

本発明は、マイクロRNAを含む細胞（例えばヒト細胞）において、そのマイクロRNAを阻害するための、本発明のオリゴマーまたはコンジュゲートの使用を提供する。この使用はインピボまたはインピトロであることができる。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】完全にLNA修飾されホスホロチオレート化された（phosphorothiolated）LNA-アンチmiR（antimiR）によるターゲティング位置を示す、miR-21、miR-155およびmiR-122 8マーLNA-アンチmiRの概略図。成熟マイクロRNA上の、7マー、8マー、9マーおよび10マーLNAオリゴヌクレオチドの好ましいハイブリダイゼーション位置も、示されている。

【図2】ルシフェラーゼセンサーアッセイを使った、MCF-7細胞における、SEQ ID #3205およびSEQ ID #3204 LNA-アンチmiRによる、miR-21拮抗作用の評価。MCF-7細胞に、miR-21用の完全マッチターゲット部位またはミスマッチターゲット部位（.mm2）を含有するルシフェラーゼセンサープラスミドと、異なる濃度のLNA-アンチmiRとを、同時トランスフェクトした。24時間後に細胞を収集し、ルシフェラーゼ活性を測定した。3回の独立した実験についてウミシイタケ/ホタル比の平均を示す（バー = s.e.m）。これらはすべて、0nM/psiCHECK2（=対照）に対して標準化されている。

40

【図3】ルシフェラーゼセンサーアッセイを使った、HeLa細胞における、SEQ ID #3205およびSEQ ID #3204 LNA-アンチmiRによる、miR-21拮抗作用の評価。HeLa細胞に、miR-21用の完全マッチターゲット部位（mir-21）またはミスマッチターゲット部位（mm2）を含有するルシフェラーゼセンサープラスミドと、異なる濃度のLNA-アンチmiRとを、同時トラ

50

ンスフェクトした。24時間後に細胞を収集し、ルシフェラーゼ活性を測定した。3回の独立した実験についてウミシイタケ/ホタル比の平均を示す(バー=s.e.m)。これらはすべて、0nM/psiCHECK2(=対照)に対して標準化されている。

【図4】ルシフェラーゼセンサーアッセイを使った、LPS処置マウスRAW細胞における、SEQ ID #3206およびSEQ ID #3207 LNA-アンチmiRによる、miR-155拮抗作用の評価。RAW細胞に、miR-155と、異なる濃度の異なるLNA-アンチmiRとを、同時トランスフェクトした。24時間後に細胞を収集し、ルシフェラーゼ活性を測定した。ウミシイタケ/ホタルの平均を示す。これらはすべて、0nM/psiCHECK2に対して標準化されている。

【図5】ルシフェラーゼセンサーアッセイを使った、HuH-7細胞における、SEQ ID #3208 およびSEQ ID #4 LNA-アンチmiRによる、miR-122拮抗作用の評価。HuH-7細胞に、完全マ 10
ッチmiR-122ターゲット部位を含有するmiR-122ルシフェラーゼセンサーと、異なる濃度の異なるLNA-アンチmiRとを、同時トランスフェクトした。24時間後に細胞を収集し、ルシフェラーゼ活性を測定した。3回の独立した実験についてウミシイタケ/ホタル比の平均を示す(バー=s.e.m)。これらはすべて、0nM/psiCHECK2(=対照)に対して標準化されている。

【図6】miR-21ルシフェラーゼレポーターコンストラクトの概略図。

【図7】ルシフェラーゼレポーターアッセイを使った、PC3細胞における、8マーLNA-アンチmiR(SEQ ID #3205)および15マーLNA-アンチmiR(SEQ ID #3204)による、miR-21拮抗作用の対比評価。PC3細胞に、miR-21用の完全マッチターゲット部位または mismatch 20
ターゲット部位を含有するルシフェラーゼレポータープラスミドと、異なる濃度のLNA-アンチmiRとを、同時トランスフェクトした。24時間後に細胞を収集し、ルシフェラーゼ活性を測定した。3回の独立した実験の平均値(バー=s.e.m)を示す。これらのウミシイタケ/ホタル比は、0nM/ターゲット部位を持たない空ベクター(=対照)に対して標準化されている。miR-21配列ならびにLNA-アンチmiRのデザインおよび位置の概略図も示す。LNAヌクレオチドを楕円で示し、DNA残基をバーで示す。

【図8】ルシフェラーゼレポーターアッセイを使った、HeLa細胞における、8マーLNA-アンチmiRによるmiR-21拮抗作用の特異性評価。HeLa細胞に、miR-21用の完全マッチまたは mismatch 30
ターゲット部位を含有するルシフェラーゼレポータープラスミドと、異なる濃度のLNA-アンチmiR(SEQ ID #3205)または8マーLNA mismatch 対照オリゴ(SEQ ID #3218)とを、同時トランスフェクトした。24時間後に細胞を収集し、ルシフェラーゼ活性を測定した。3回の独立した実験の平均値(バー=s.e.m)を示す。これらのウミシイタケ/ホタル比は、0nM/ターゲット部位を持たない空ベクター(=対照)に対して標準化されている。miR-21配列ならびにLNA-アンチmiRのデザインおよび位置の概略図も示す。Mismatch を塗りつぶした楕円で示す。

【図9】miR-21の効果的な拮抗作用を媒介する完全にLNA修飾されたLNA-アンチmiRの、考えうる最も短い長さの評価。HeLa細胞に、miR-21用の完全マッチまたは mismatch 40
ターゲット部位を含有するルシフェラーゼレポータープラスミドと、異なる濃度のLNA-アンチmiR(SEQ ID #3209=6マーおよびSEQ ID #3210=7マー)とを、同時トランスフェクトした。24時間後に細胞を収集し、ルシフェラーゼ活性を測定した。3回の独立した実験の平均値(バー=s.e.m)を示す。これらのウミシイタケ/ホタル比は、0nM/ターゲット部位を持たない空ベクター(=対照)に対して標準化されている。miR-21配列ならびにLNA-アンチmiRのデザインおよび位置の概略図も示す。

【図10】miR-21を拮抗する完全にLNA置換されたLNA-アンチmiRの長さ評価。HeLa細胞に、miR-21用の完全マッチまたは mismatch 50
ターゲット部位を含有するルシフェラーゼレポータープラスミドと、異なる濃度のLNA-アンチmiR(SEQ ID #3211=9マー、SEQ ID #3212=10マー、SEQ ID #3213=12マーおよびSEQ ID #3214=14マー)とを、同時トランスフェクトした。24時間後に細胞を収集し、ルシフェラーゼ活性を測定した。3回の独立した実験の平均値(バー=s.e.m)を示す。これらのウミシイタケ/ホタル比は、0nM/ターゲット部位を持たない空ベクター(=対照)に対して標準化されている。miR-21配列ならびにLNA-アンチmiRのデザインおよび位置の概略図も示す。

【図1 1】miRターゲット認識配列内での、8マー-LNA-アンチmiRにとって最適な位置の決定。HeLa細胞に、miR-21用の完全マッチまたはミスマッチターゲット部位を含有するルシフェラーゼレポータープラスミドと、異なる濃度のLNA-アンチmiRとを、同時トランスフェクトした。24時間後に細胞を収集し、ルシフェラーゼ活性を測定した。3回の独立した実験の平均値(バー=s.e.m)を示す。これらのウミシイタケ/ホタル比は、0nM/ターゲット部位を持たない空ベクター(=対照)に対して標準化されている。miR-21配列ならびにLNA-アンチmiRのデザインおよび位置の概略図も示す。

【図1 2】8マー-SEQ ID #3205 LNA-アンチmiRによるPdcd4-3'-UTRとmiR-21の相互作用の実証。HeLa細胞に、Pdcd4遺伝子の3'UTRの一部を含有するルシフェラーゼレポータープラスミドと、異なる濃度のLNA-アンチmiR(SEQ ID #3205=8マー、完全マッチ; SEQ ID #3218=8マー、ミスマッチ; SEQ ID #3204=15マー、LNA/DNA混成; SEQ ID #3220=15マー、ギャップマー(gapmer))とを、同時トランスフェクトした。24時間後に細胞を収集し、ルシフェラーゼ活性を測定した。0nMに対して標準化されたウミシイタケ/ホタル比を示す。miR-21配列ならびにLNA-アンチmiRのデザインおよび位置の概略図も示す。

【図1 3】マウスRAW細胞におけるmiR-155の拮抗に関する8マー-LNA-アンチmiR(SEQ ID #3207)と15マー-LNA-アンチmiR(SEQ ID #3206)との比較。マウスRAW細胞に、miR-155用の完全マッチを含有するルシフェラーゼレポータープラスミドと、異なる濃度の異なるLNA-アンチmiRとを、同時トランスフェクトした。24時間後に細胞を収集し、ルシフェラーゼ活性を測定した。3回の独立した実験の平均値(バー=s.e.m)を示す。これらのウミシイタケ/ホタル比は、0nM/miR-155ターゲット部位を持たない空ベクター(=対照)に対して標準化されている。miR-155配列ならびにLNA-アンチmiRのデザインおよび位置の概略図も示す。

【図1 4】マウスRAW細胞における、8マー-LNA-アンチmiR(SEQ ID #3207)および15マー-LNA-アンチmiR(SEQ ID #3206)による、miR-155拮抗作用に関する機能的読出しとしての、c/EBPタンパク質レベルの評価。マウスRAW細胞に、miR-155用の完全マッチを含有するルシフェラーゼレポータープラスミドと、異なる濃度のLNA-アンチmiRとを、同時トランスフェクトした。20時間後に、細胞を収集し、RAW細胞から得られるタンパク質抽出物のウェスタンブロット解析を行なった。c/EBPの異なるアイソフォームを示し、c/EBP LIPと-チューブリンについて算出した比を下に示す。

【図1 5】完全にLNA修飾された8マー(SEQ ID #3221)LNA-アンチmiRまたは15マーミックスマー(mixmer)(SEQ ID #3228)アンチmiRによる、miR-106bの拮抗作用。HeLa細胞に、miR-106b用の完全マッチを含有するルシフェラーゼレポータープラスミドと、異なる濃度の異なるLNA-アンチmiRとを、同時トランスフェクトした。24時間後に細胞を収集し、ルシフェラーゼ活性を測定した。4つのレプリケートの平均値を示す。これらのウミシイタケ/ホタル比は、0nM/miRNAターゲット部位を持たない空ベクター(=対照)に対して標準化されている。miR-106b配列ならびにLNA-アンチmiRのデザインおよび位置の概略図も示す。

【図1 6】完全にLNA修飾された8マー(SEQ ID #3222)LNA-アンチmiRおよび15マー(SEQ ID #3229)ミックスマーアンチmiRによるmiR-19bの拮抗作用。HeLa細胞に、miR-19a用の完全マッチを含有するルシフェラーゼレポータープラスミドと、異なる濃度の上記2つのLNA-アンチmiRとを、同時トランスフェクトした。24時間後に細胞を収集し、ルシフェラーゼ活性を測定した。4つのレプリケート実験の平均値を示す。これらのウミシイタケ/ホタル比は、0nM/miR-19aターゲット部位を持たない空ベクター(=対照)に対して標準化されている。miR-19a配列ならびにLNA-アンチmiRのデザインおよび位置の概略図も示す。

【図1 7】成熟ヒトmiR-221およびmiR-222配列を示す概略図。両方のmiRNA配列に保存されているシード(seed)配列(7マー)を枠内に示す。

【図1 8】完全にLNA置換された短いLNA-アンチmiRを使ったマイクロRNAファミリーのターゲットング。PC3細胞に、miR-221用およびmiR-222用のルシフェラーゼレポータープラスミド(個別に、または一緒に)と、さまざまな濃度の異なるLNA-アンチmiRとを、同時トランスフェクトした。LNA-アンチmiR(15マー)SEQ ID #3223(miR-221に対するもの)

10

20

30

40

50

およびSEQ ID #3224 (miR-222に対するもの)を同時トランスフェクトする場合、合計濃度は2nM (各1nM)とし、細胞にSEQ ID #3225 (7マー)をトランスフェクトする際は、濃度を0、1、5、10または25nMとした。24時間後に細胞を収集し、ルシフェラーゼ活性を測定した。3回の独立した実験の平均値 (バー = s.e.m) を示す。これらのウミシイタケ/ホタル比は、0nM/miRNAターゲット部位を持たない空ベクター (= 対照) に対して標準化されている。miR-221/222配列ならびにLNA-アンチmiRのデザインおよび位置の概略図も示す。

【図19】7マーSEQ ID #3225 LNA-アンチmiRによるmiR-221/222ファミリーの拮抗作用に関する機能的読出し (functional readout) としての、p27タンパク質レベルの評価。PC3細胞に、miR-221とmiR-222の両方をターゲットとする7マーLNA-アンチmiR SEQ ID #3225を、さまざまな濃度でトランスフェクトした。24時間後に細胞を収集し、タンパク質レベルをウェスタンブロットで測定した。p27/チューブリンの比を示す。

10

【図20】ルシフェラーゼレポーターアッセイを使った、HepG2細胞における、8マーLNA-アンチmiR (SEQ ID #3205) ならびに15マーLNA-アンチmiR (SEQ ID #3204) および2つの mismatchesを持つ8マー (SEQ ID #3218) による、miR-21拮抗作用の対比評価。HepG2細胞に、miR-21用の完全マッチターゲット部位を含有するルシフェラーゼレポータープラスミドと、異なる濃度のLNA-アンチmiRとを、同時トランスフェクトした。24時間後に細胞を収集し、ルシフェラーゼ活性を測定した。3回の独立した実験の平均値 (バー = s.e.m) を示す。これらのウミシイタケ/ホタル比は、0nM/ターゲット部位を持たない空ベクター (= 対照) に対して標準化されている。miR-21配列ならびにLNA-アンチmiRのデザインおよび位置の概略図も示す。

20

【図21】8マーSEQ ID #3205 LNA-アンチmiRならびに15マー (SEQ ID #3204) および2つの mismatchesを持つ8マー (SEQ ID #3218) による、Pcd4 3'UTRとmiR-21の相互作用の実証。Huh-7細胞に、Pcd4遺伝子の3'UTRの一部を含有するルシフェラーゼレポータープラスミド、プレ-miR-21 (10nM) および異なる濃度のLNA-アンチmiRを、同時トランスフェクトした。24時間後に細胞を収集し、ルシフェラーゼ活性を測定した。3回の独立した実験の平均値 (バー = s.e.m) を示す。これらのウミシイタケ/ホタル比は、0nM/ターゲット部位を持たない空ベクター (= 対照) に対して標準化されている。miR-21配列ならびにLNA-アンチmiRのデザインおよび位置の概略図も示す。

【図22】SEQ ID #3205によるmiR-21の拮抗作用は、Pcd4タンパク質レベルのレベルの増加につながる。HeLa細胞に、5nMのLNA-アンチmiR SEQ ID #3205 (完全マッチ)、またはSEQ ID #3219のLNAスクランブル (scrambled) (8マー) もしくはSEQ ID #3218 (8マー mismatches) をトランスフェクトした。細胞を24時間後に収集し、Pcd4抗体によるウェスタンブロットに付した。

30

【図23】SEQ ID #3205 (完全マッチ) またはSEQ ID #3218 (mismatches対照) で処置したマウスにおけるALTおよびASTレベル。1日おきに25mg/kgを投与して、14日後に、マウスを屠殺した。

【図24】短いLNA-アンチmiR (SEQ ID #3207) によるmiR-155拮抗作用に関する機能的読出しとしてのPU.1タンパク質レベルの評価。THP-1細胞にプレ-miR-155 (5nmol) と異なるLNAオリゴヌクレオチド (5nM) とを同時トランスフェクトし、100ng/mlのLPSを加えた。24時間後に細胞を収集し、THP-1細胞から得られるタンパク質抽出物のウェスタンブロット解析を行なった。PU.1およびチューブリンを示す。

40

【図25】7マーSEQ ID #3225 LNA-アンチmiRによる、miR-221/222ファミリーの拮抗作用に関する機能的読出しとしての、p27タンパク質レベルの評価。PC3細胞に、miR-221とmiR-222の両方をターゲットとする7マーLNA-アンチmiR SEQ ID #3225およびLNAスクランブル対照を、5nMおよび25nMでトランスフェクトした。24時間後に細胞を収集し、タンパク質レベルをウェスタンブロットで測定した。p27/チューブリンの比を示す。

【図26】7マーSEQ ID #3225 (完全マッチ) LNA-アンチmiRによるmiR-221/222のノックダウンは、PC3細胞において、軟寒天でのコロニー形成を減少させる。PC3細胞に、25nMの、miR-221とmiR-222の両方をターゲットとする7マーLNA-アンチmiR SEQ ID #3225 または

50

7マーのスクランブル対照 (SEQ ID #3231) をトランスフェクトした。24時間後に細胞を収集し、軟寒天上に播種した。12日後にコロニーを計数した。1回の実験を3重に行なった。

【図27】ヒトlet-7ファミリーおよび試験したアンタゴニストの概要。(上)配列は各メンバーについての成熟miRNAを表し、枠は、LNA-アンチmiRによって典型的に拮抗される位置であるヌクレオチド2~16を表す。右側の欄は、それぞれシード(S:位置2~8)、拡張シード(extended seed)(ES;位置2~9)、およびLNA-アンチmiRが典型的にターゲットとする残りの配列(NE;位置9~16)内での、let-7aと比較したヌクレオチド相違の数を示す。色が反転しているヌクレオチドはlet-7aと比較して異なっている。(下)試験した、let-7ファミリーに対するアンタゴニストの要約であって、デザイン、長さおよび完全に相補的なターゲットに関する情報を含む。化合物はすべて完全にホスホロチオレート化される。

10

【図28】ルシフェラーゼセンサーアッセイを使った、Huh-7細胞における、6つの異なるLNA-アンチmiRによる、let-7拮抗作用の評価。Huh-7細胞に、部分HMGA2 3'UTR(4つのlet-7結合部位を持つ)を含有するルシフェラーゼセンサープラスミドを、let-7a前駆体と共に、またはlet-7a前駆体を伴わずに(それぞれ灰色および黒色のバー)、増加する一連の濃度の6つの異なるLNA-アンチmiRと共に、同時トランスフェクトした。24時間後に細胞を収集し、ルシフェラーゼ活性を測定した。各アッセイについて、二重に測定したウミシイタケ/ホタル比の平均および標準偏差を示す。各LNA-アンチmiR群内では、すべての比が、let-7a前駆体を含有しないウェル(黒色のバー)の平均に対して標準化されている。

20

【図29】HMGA2 3'UTRセンサープラスミド、LNA-アンチmiR SEQ ID #3226(左)およびSEQ ID #3227(右)、ならびにlet-7a(A)、let-7d(B)、let-7e(C)、およびlet-7i(D)のプレ-miRをトランスフェクトしたHuh-7細胞から得られるルシフェラーゼ結果。灰色のバーはプレ-miR投入後のターゲット抑制解除を示し、一方、黒色の対照バーは、プレ-miRを添加しなかった場合の相当するレベルを表す。各比は4重の測定に基づき、各処置群内での前駆体を含有しないウェル(黒色のバー)の平均に対して標準化されている。

【図30】HMGA2 3'UTRセンサープラスミドまたは対照ベクターおよびさまざまな濃度のLNA-アンチmiR SEQ ID #3227をトランスフェクトしたHeLa細胞から得られるルシフェラーゼ結果。各比は、無処理(0nM)の空対照ベクター(psi-CHECK-2;灰色のバー)に対して標準化された4重の測定に基づく。

30

【図31】ルシフェラーゼセンサーアッセイを使った、HCT116細胞における、8マー(#3205)による、miR-21拮抗作用の評価。HCT116細胞に、miR-21用の完全マッチターゲット部位を含有するルシフェラーゼセンサープラスミド(灰色のバー)と、異なる濃度のLNA-アンチmiRおよび対照オリゴヌクレオチドとを、同時トランスフェクトした。24時間後に細胞を収集し、ルシフェラーゼ活性を測定した。2つのうちの一つの典型例を示す。これらのウミシイタケ/ホタル比は、0nM/空ベクター(=黒色のバー)に対して標準化されている。

【図32】8マー#3205 LNA-アンチmiRによるmiR-21のサイレンシングは、PC3細胞において、軟寒天でのコロニー形成を減少させる。PC3細胞に、25nMの、miR-21をターゲットとする8マーLNA-アンチmiR #3205をトランスフェクトした。24時間後に細胞を収集し、軟寒天上に播種した。12日後にコロニーを計数した。それぞれ3重に行なって、0nM対照(すなわちトランスフェクションは行なうが、LNAなし)に対して標準化した、3回の独立した実験の平均を示す。#3205に関して $p = 0.01898$ 。

40

【図33】8マー#3205 LNA-アンチmiRによるmiR-21のノックダウンは、HepG2細胞において、軟寒天でのコロニー形成を減少させる。HepG2細胞に、25nMの、miR-21をターゲットとする8マーLNA-アンチmiR #3205をトランスフェクトした。24時間後に細胞を収集し、軟寒天上に播種した。17日後にコロニーを計数した。1回の実験から得られる3つのレプリケートの平均を示す(バー=SEM)。

【図34】#3205による処理後の浸潤性ヒト前立腺細胞株PC3における創傷閉鎖(wound closure)。(A)3日目に、PC3細胞に、25nMのLNA-アンチmiRおよび対照オリゴヌクレオチ

50

ド、#3205（8マー、完全マッチ）および#3219（8マー、ミスマッチ）をトランスフェクトし、翌日、引っ掻き傷（scratch）を付けた。移動をモニターするために、24時間後に、写真を撮った。（B）各時点における面積を、ソフトウェアプログラムImage Jで測定し、それぞれの0時間時点に対して標準化した。

【図35】miR-155を拮抗する完全にLNA置換されたLNA-アンチmiRの長さ評価。RAW細胞に、miR-155用の完全マッチターゲット部位を含有するルシフェラーゼレポータープラスミドと、異なる濃度のLNA-アンチmiRオリゴヌクレオチドとを、同時トランスフェクトした。24時間後に細胞を収集し、ルシフェラーゼ活性を測定した。3回の独立した実験の平均値（ $\bar{x} = s.e.m$ ）を示す。これらのウミシイタケ/ホタル比は、0nM/ターゲット部位を持たない空ベクター（=モック）に対して標準化されている。miR配列ならびにLNA-アンチmiRのデザインおよび位置の概略図も示す。

10

【図36】マウス血漿タンパク質への5'-FAM標識LNA-アンチmiR-21（#3205）の結合。（A）マウス血漿中のオリゴヌクレオチド濃度の関数としての%未結合LNA-アンチmiR-21化合物。（B）マウス血漿中の#3205濃度の関数としての未結合LNA-アンチmiR-21化合物#3205の濃度。

【図37】ウェスタンブロット解析によるRasタンパク質レベルの定量。A. 処置（アンチ-let-7；8マー）および無処置（食塩水）の肺および腎臓試料中のRasおよびチューブリン（内部標準）タンパク質を示すゲルイメージ。B. LNA-アンチmiR処置マウス（黒色のバー）の、それぞれ肺および腎臓におけるRasタンパク質レベルの定量（チューブリンをイコールローディングコントロール（equal-loading control）として使用して、食塩水対照（灰色のバー）に対して標準化したもの）。C. #3205によるmiR-21のサイレンシングは、インビボで、Pdcd4タンパク質レベルのレベルの増加につながる。D. マウスに食塩水または25mg/kgのLNA-アンチmiR（#3205）を14日間にわたって1日おきに全部で5回注射した。マウスを屠殺し、腎臓からタンパク質を単離し、Pdcd4抗体によるウェスタンブロット解析に付した。A. 処置（アンチmiR-21；8マー）対無処置（食塩水）の腎臓試料（M1、マウス1；M2、マウス2）中のPdcd4およびGapdh（内部標準）タンパク質を示すゲルイメージ。B. LNA-アンチmiR処置マウス（暗灰色のバー）の腎臓におけるPdcd4タンパク質レベルの定量（Gapdhをローディングコントロールとして使用して、相当する食塩水対照（明灰色のバー）の平均に対して標準化したもの）。

20

【発明を実施するための形態】

30

【0020】

[発明の詳細な説明]

LNAを組み込んだ短いオリゴヌクレオチドはインビトロ試薬領域では知られている（例えばWO2005/098029およびWO2006/069584参照）。しかし、診断用または試薬用に設計される分子は、インビボ用または薬学用の分子とは、デザインが著しく異なる。例えば、試薬オリゴの末端ヌクレオチドは典型的にはLNAではなくDNAであり、ヌクレオチド間結合は典型的には、本発明のオリゴヌクレオチドで使用される好ましい結合であるホスホロチオエート（phosphorothioate）ではない。したがって本発明は、それ自体、新しい種類のオリゴヌクレオチド（以下、オリゴマーという）を提供する。

【0021】

40

下記の実施形態は、医薬組成物に使用することができる本発明のオリゴマーのいくつかの実施形態を表す。オリゴマーに当てはまる諸態様は、連続ヌクレオチド配列にも当てはまり、逆もまた同様である。

【0022】

（オリゴマー）

本発明のオリゴマーは、LNAなどのヌクレオチド類似体を含み、それがそのオリゴヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列の一部または全体を形成している、一本鎖オリゴヌクレオチドである。オリゴマーのヌクレオチド配列は、連続ヌクレオチド配列からなる。

【0023】

用語「オリゴヌクレオチド」（単に「オリゴ」ともいう）は、用語「オリゴマー」と可

50

換的に使用され、本発明においては、2つ以上のヌクレオチドの共有結合によって形成される分子を指す。本発明のオリゴヌクレオチド（一本鎖オリゴヌクレオチドともいう）に関連して使用される場合、「オリゴヌクレオチド」という用語は、ある実施形態では、例えば7~10ヌクレオチド、例えば個別の実施形態においては、7、8、9、または10個のヌクレオチドをもちうる。

【0024】

「ヌクレオチド」という用語は、DNAおよびRNAなどのヌクレオチドと、ヌクレオチド類似体を指す。いくつかの態様では、核酸塩基という用語もヌクレオチド（これは天然物でも非天然物でもよい）に言及するために使用される場合があり、この点において、核酸塩基およびヌクレオチドという用語は、本明細書では可換的に使用されうると認識すべきである。

10

【0025】

いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列が7個のヌクレオチド類似体からなる。いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列が8個のヌクレオチド類似体からなる。いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列が9個のヌクレオチド類似体からなる。

【0026】

ある実施形態では、オリゴマーのヌクレオチドの少なくとも約50%、例えば少なくとも約55%、例えば少なくとも約60%、または少なくとも約65%もしくは少なくとも約70%、例えば少なくとも約75%、例えば少なくとも約80%、例えば少なくとも約85%、例えば少なくとも約90%、例えば少なくとも約95%、または例えば100%が、ヌクレオチド類似体である。オリゴヌクレオチドが、ヌクレオチド類似体だけからなるヌクレオチド配列から構成されうること、明白であるだろう。好適には、オリゴマーは、少なくとも1つのLNAモノマー、例えば2、3、4、5、6、7、8、9または10個のLNAモノマーを含みうる。後述のとおり、連続ヌクレオチド配列は、LNA単位（ホスホロチオエート結合などの連結基を含む）だけからなるか、LNA単位とDNA単位、またはLNAと他のヌクレオチド類似体からなることができる。いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列が、1個または2個のDNAヌクレオチドを含み、残りのヌクレオチドはLNA単位などのヌクレオチド類似体である。

20

【0027】

いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列が、6個のヌクレオチド類似体と1個のDNAヌクレオチドとからなる。いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチドが、7個のヌクレオチド類似体と1個のDNAヌクレオチドとからなる。いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列が、8個のヌクレオチド類似体と1個のDNAヌクレオチドとからなる。いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列が、9個のヌクレオチド類似体と1個のDNAヌクレオチドとからなる。いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列が、7個のヌクレオチド類似体と2個のDNAヌクレオチドとからなる。いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列が、8個のヌクレオチド類似体と2個のDNAヌクレオチドとからなる。

30

【0028】

オリゴマーは連続ヌクレオチド配列からなりうる。

【0029】

特に好ましいある実施形態では、ヌクレオチド類似体がすべてLNAである。さらにもう一つの好ましい実施形態では、オリゴマーのヌクレオチドがすべてLNAである。さらにもう一つの好ましい実施形態では、オリゴマーのヌクレオチドがすべてLNAであり、ヌクレオチド間連結基がすべてホスホチオエート（phosphothioate）である。

40

【0030】

本明細書において「含窒素塩基」という用語は、例えばDNA核酸塩基A、C、TおよびG、RNA核酸塩基A、C、UおよびG、ならびに非DNA/RNA核酸塩基、例えば5-メチルシトシン（^{Me}C）、イソシトシン、プソイドイソシトシン、5-プロモウラシル、5-プロピニルウラシル、5-プロピニル-6-フルオロウラシル、5-メチルチアゾールウラシル、6-アミノプリン、2-アミノプリン、イノシン、2,6-ジアミノプリン、7-プロピニル-7-デアザアデニン、7-プロ

50

ピン-7-デアザグアニンおよび2-クロロ-6-アミノプリン（特に^{Me}C）などのプリン類およびピリミジン類を包含するものとする。非DNA/RNA核酸塩基の実際の選択が、そのオリゴヌクレオチドがターゲットにしようとするマイクロRNA鎖中に存在する、対応する（またはマッチする）ヌクレオチドに依存することは、理解されるだろう。例えば、対応するヌクレオチドがGである場合、通常は、Gに対して水素結合を樹立する能力を持つ非DNA/RNA核酸塩基を選択する必要があるだろう。対応するヌクレオチドがGであるというこの具体例の場合、好ましい非DNA/RNA核酸塩基の典型例は^{Me}Cである。

【0031】

「ある実施形態」という用語は、必ずしも、一つの具体的実施形態を指すだけでなく、「いくつかの実施形態」に存在しうる特徴も、さらには本発明の一般的特徴も、指しうると認識すべきである。同様に、「いくつかの実施形態」という用語は、一つの具体的実施形態の特徴、または実施形態の集合の特徴、さらには本発明の一般的特徴を説明するために用いられる。

10

【0032】

「に対応する」（「corresponding to」および「corresponds to」）という用語は、オリゴマーまたは連続ヌクレオチド配列の配列（第1配列）と、i) マイクロRNA核酸ターゲット（例えばSEQ ID 40～SEQ ID 976から選択されるマイクロRNAターゲット）の逆相補配列の部分配列、および/またはii) 本明細書に記載のヌクレオチド配列、例えば配列番号977～1913、または配列番号1914～2850、または配列番号2851～3787からなる群、のいずれかから選択される、もう一つの配列の相当する連続ヌクレオチド配列との比較を指す。ヌクレオチド類似体は、それぞれの相当するまたは対応するヌクレオチドと、直接的に比較される。i) またはii) に記載のもう一つの配列に対応する第1配列は、典型的には、第1配列（例えば連続ヌクレオチド配列）の全長にわたって、その配列と同一である。

20

【0033】

本明細書において言及されるヌクレオチド分子の長さに言及する場合、その長さは、モノマー単位の数、すなわちヌクレオチドの数に対応し、それらのモノマー単位がヌクレオチドであるか、ヌクレオチド類似体であるかは問わない。ヌクレオチドまたは核酸塩基に関して、モノマーおよび単位という用語は、本明細書では可換的に使用される。

【0034】

具体的な値または値域に関して「約」という用語を使用する場合、その開示は、言及されたその具体的な値または範囲を含むと読解すべきである、と理解すべきである。

30

【0035】

本明細書にいう「ハイブリダイゼーション」とは、相補的ヌクレオシドまたはヌクレオチド塩基間の水素結合（これは、ワトソン-クリック型、フーグスティーン型、逆フーグスティーン型水素結合などであることができる）を意味する。DNA中によく見いだされる4つの核酸塩基はG、A、TおよびCであり、このうち、GはCと対になり、AはTと対になる。RNAでは、Tがウラシル（U）で置き換えられ、それがAと対になる。標準的二重鎖形成に参加する核酸塩基中の化学基はワトソン-クリック面を構成する。フーグスティーンは、数年後に、プリン核酸塩基（GおよびA）が、そのワトソン-クリック面に加えて、フーグスティーン面を持つことを示した。このフーグスティーン面は、二重鎖の外側から認識されることが可能であり、これを使ってピリミジンオリゴヌクレオチドを水素結合で結合することにより、3重らせん構造が形成される。

40

【0036】

本明細書に関して「相補的」とは、2つのヌクレオチド配列間で互いに正確に対形成できることを指す。例えば、あるオリゴヌクレオチドの、ある位置に存在するヌクレオチドが、あるDNAまたはRNA分子の対応する位置に存在するヌクレオチドと水素結合する能力を持つ場合、そのオリゴヌクレオチドとそのDNAまたはRNAとは、その位置において、互いに相補的であるとみなされる。DNAまたはRNA鎖は、安定な複合体の形成が可能になるように、オリゴヌクレオチド中の十分な数のヌクレオチドが、ターゲットDNAまたはRNA中の対応するヌクレオチドと水素結合を形成できる場合に、互いに相補的であるとみなされる。イ

50

ンビットロまたはインビボで安定であるために、オリゴヌクレオチドの配列は、そのターゲットマイクロRNAに対して100%相補的である必要はない。したがって、「相補的」および「特異的にハイブリダイズ可能」という用語は、オリゴヌクレオチドがターゲット分子に十分に強くかつ特異的に結合して、非ターゲットRNAの機能には影響を及ぼすことなく、ターゲットの正常な機能の望ましい妨害をもたらすことを含意する。しかし、好ましい実施形態では、相補的という用語が、100%相補的または完全に相補的であることを意味するものとする。

【0037】

ある好ましい実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドが、miRNA配列、例えばヒトマイクロRNA配列、または本明細書で言及するマイクロRNA配列の一つに対して、100%相補的である。

10

【0038】

ある好ましい実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドが、ヒトマイクロRNA配列のシード領域に100%相補的な連続配列を含む。

【0039】

好ましくは、「マイクロRNA」または「miRNA」という用語は、本発明においては、長さが18~25個のヌクレオチドからなるRNAオリゴヌクレオチドを意味する。機能面では、miRNAは、典型的には、調節機能を持つ内在性RNA分子である。

【0040】

「ターゲットマイクロRNA」または「ターゲットmiRNA」という用語は、例えば、がんにおける、アップレギュレートされた腫瘍原性miRNAまたは腫瘍抑制性miRNAなど、ヒト疾患において生物学的役割を持ち、それゆえに当該疾患の治療的介入のためのターゲットになるマイクロRNAを指す。

20

【0041】

「ターゲット遺伝子」または「ターゲットmRNA」という用語は、マイクロRNAの調節性mRNAターゲットを指し、この場合、前記「ターゲット遺伝子」または「ターゲットmRNA」は、miRNAとそのターゲット部位の間のほぼ完全なまたは完全な相補性に基づき（この場合はターゲットmRNA切断が起こる）、または限定された相補性（これは、多くの場合、いわゆるシード配列（miRNAのヌクレオチド2~7）とターゲット部位の間の相補性に付与される）に基づき（この場合はターゲットmRNAの翻訳阻害が起こる）、マイクロRNAによって、転写後調節される。

30

【0042】

本発明に関して、オリゴヌクレオチドは一本鎖である。これは、そのオリゴヌクレオチドが相補的オリゴヌクレオチドを伴っていない状況、すなわち、そのオリゴヌクレオチドがsiRNAなどの二本鎖オリゴヌクレオチド複合体ではないことを指す。ある実施形態において、本発明の組成物は、5個以上の、例えば6、7、8、9、または10個の、例えば8個以上の連続ヌクレオチドのオリゴマーと相補的な領域を持つ他のオリゴヌクレオチドを含まない。

【0043】

（長さ）

40

驚いたことに、本発明者らは、上述の短い「アンチmiR」が、マイクロRNAターゲットに対する顕著な特異性を保ったまま、インビボで、マイクロRNAの、改善された特異的阻害をもたらすことを見いだした。もう一つの利点として、マイクロRNA種の間では相同な短い配列（例えば本明細書で説明するシード領域）が保存されているので、いくつかのマイクロRNAを同時に阻害できることがわかった。本発明によれば、7、8、9、10ヌクレオチド、例えば7、8または9ヌクレオチドの短いオリゴヌクレオチドが、特に有利であることがわかった。

【0044】

（配列）

連続ヌクレオチド配列は、哺乳動物、ヒトまたはウイルスのマイクロRNA（miRNA）配列

50

、好ましくはヒトまたはウイルスのmiRNA配列の対応する領域に対して、相補的（例えば100%相補的 - すなわち完全に相補的）である。

【0045】

マイクロRNA配列は、好適には、成熟マイクロRNAであることができる。いくつかの実施形態では、マイクロRNAがマイクロRNA前駆体でありうる。

【0046】

ヒトマイクロRNA配列は、WO2008/046911に開示されている配列番号 1~558から選択することができる、これらはすべて、参照により具体的に本明細書に組み込まれる。WO2008/046911で述べられているとおり、これらのマイクロRNAは、がんに関連する。

【0047】

ウイルスのマイクロRNA配列は、いくつかの実施形態では、単純ヘルペスウイルス1、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス、エプスタイン・バーウイルスおよびヒトサイトメガロウイルスからなる群より選択することができる。

【0048】

ある実施形態では、連続ヌクレオチド配列が、表1に列挙するmiRNAの群から選択されるmiRNA配列の対応する領域に対して、相補的（例えば100%相補的）である。表1には、miR Base（リリース12.0 - <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>）に公開されたヒトおよびウイルスのマイクロRNAをターゲットとする7マー、8マーおよび9マーオリゴマーが記載されている。

【0049】

いくつかの実施形態では、本発明のオリゴマーが、miR-1、miR-10b、miR-17-3p、miR-18、miR-19a、miR-19b、miR-20、miR-21、miR-34a、miR-93、miR-106a、miR-106b、miR-122、miR-133、miR-134、miR-138、miR-155、miR-192、miR-194、miR-221、miR-222、miR-375からなる群より選択される対応するマイクロRNA配列に相補的な連続ヌクレオチド配列からなるか、それら連続ヌクレオチド配列を含みうる。

【0050】

したがって、ある実施形態では、miRNA（すなわちターゲットmiRNA）が、miR-1、miR-10b、miR-17-3p、miR-18、miR-19a、miR-19b、miR-20、miR-21、miR-34a、miR-93、miR-106a、miR-106b、miR-122、miR-133、miR-134、miR-138、miR-155、miR-192、miR-194、miR-221、miR-222、およびmiR-375からなる群より選択される。

【0051】

ある実施形態では、miRNAターゲットが、miR 17-92クラスターのメンバー、例えばmiR 17、miR 106a、miR 106b、miR 18、miR 19a、miR 19b/1、miR 19b/2、miR20/93、miR92/1、miR92/2およびmiR25である。

【0052】

いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列が、miR-21、miR-155、miR-221、miR-222、およびmiR-122からなる群より選択されるマイクロRNA（miRNA）の対応する領域に相補的である。

【0053】

いくつかの実施形態では、前記miRNAが、miR-1、miR-10、miR-29、miR-125b、miR-126、miR-133、miR-141、miR-143、miR-200b、miR-206、miR-208、miR-302、miR-372、miR-373、miR-375、およびmiR-520c/eからなる群より選択される。

【0054】

いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列が、miR 17-92クラスター中に存在するマイクロRNA（miRNA）の対応する領域、例えばmiR-17-5p、miR-20a/b、miR-93、miR-106a/b、miR-18a/b、miR-19a/b、miR-25、miR-92a、miR-363からなる群より選択されるマイクロRNAの対応する領域に相補的である。

【0055】

ある実施形態では、miRNA（すなわちターゲットmiRNA）がmiR-21、例えばhsa-miR-21である。ある実施形態では、miRNA（すなわちターゲットmiRNA）がmiR-122、例えばhsa-miR

10

20

30

40

50

-122である。ある実施形態では、miRNA(すなわちターゲットmiRNA)がmiR-19b、例えばhsa-miR-19bである。ある実施形態では、miRNA(すなわちターゲットmiRNA)がmiR-155、例えばhsa-miR-155である。ある実施形態では、miRNA(すなわちターゲットmiRNA)がmiR-375、例えばhsa-miR-375である。ある実施形態では、miRNA(すなわちターゲットmiRNA)がmiR-375、例えばhsa-miR-106bである。

【0056】

好適には、連続ヌクレオチド配列が、マイクロRNAの対応する領域、例えば19b、21、122、155および375からなる群より選択されるhsa-miRの対応する領域に相補的でありうる。

【0057】

(シード領域およびシードマー(Seedmer))

本発明者らは、ヌクレオチド類似体(例えばロック核酸(LNA)単位などの高アフィニティヌクレオチド類似体)を含むか、そのようなヌクレオチド類似体からなる、注意深く設計された短い一本鎖オリゴヌクレオチドが、マイクロRNAの著しいサイレンシングを示し、マイクロRNAレベルの低下をもたらすことを見いだした。ターゲットマイクロRNAのいわゆるシード配列(典型的には5'端から数えてヌクレオチド2~8または2~7)に対する前記オリゴヌクレオチドのタイトな結合が重要であることがわかった。ターゲットマイクロRNAのヌクレオチド1は非対形成塩基であり、おそらくAgo2タンパク質中の結合ポケットに隠されるだろう。特定の理論に束縛されることは望まないが、シード領域配列を選択すれば、特にLNAを含むオリゴヌクレオチド、好ましくはシード領域に相補的な領域にLNA単位を含むオリゴヌクレオチドを使用すれば、miRNAとオリゴヌクレオチドの間の二重鎖は、miRNAをターゲットとし、オフターゲット効果を回避し、おそらくは、RISC指向的(RISC directed)miRNA機能を妨げるさらにもう一つの特徴を得るのに、特に有効であると、本発明者らは考える。

【0058】

本発明者らは、LNA修飾一本鎖オリゴヌクレオチドが、この非対形成ヌクレオチド1に対応する3'端のヌクレオチドを含有しない場合には、マイクロRNAサイレンシングが、さらに強化されることを見いだした。さらに、本発明のオリゴヌクレオチドの3'端にある少なくとも2つのLNA単位が、そのオリゴヌクレオチドに高いヌクレアーゼ耐性を付与することもわかった。

【0059】

ある実施形態では、オリゴマーの1番目または2番目の3'ヌクレオチドが、マイクロRNA配列の2番目の5'ヌクレオチドに対応し、それはLNAなどのヌクレオチド類似体であることができる。

【0060】

ある実施形態では、オリゴマーの3'端から計ってオリゴマーのヌクレオチド単位1~6(両端を含む)が、マイクロRNAシード領域配列に相補的であり、それらはすべて、LNAなどのヌクレオチド類似体であることができる。

【0061】

ある実施形態では、オリゴマーの3'端から計ってオリゴマーのヌクレオチド単位1~7(両端を含む)が、マイクロRNAシード領域配列に相補的であり、それらはすべて、LNAなどのヌクレオチド類似体であることができる。

【0062】

ある実施形態では、オリゴマーの3'端から計ってオリゴマーのヌクレオチド単位2~7(両端を含む)が、マイクロRNAシード領域配列に相補的であり、それらはすべて、LNAなどのヌクレオチド類似体であることができる。

【0063】

ある実施形態では、オリゴマーが、少なくとも1つのヌクレオチド類似体単位、例えば少なくとも1つのLNA単位を、miRNAシード領域に相補的な領域内にある位置に含む。オリゴマーは、ある実施形態では、1~6個または1~7個のヌクレオチド類似体単位、例えば1~6個および1~7個のLNA単位を、miRNAシード領域に相補的な領域内にある位置に含む

10

20

30

40

50

る。

【0064】

ある実施形態では、連続ヌクレオチド配列が、前記マイクロRNAのシード配列に相補的（例えば100%相補的）な配列からなるか、または前記マイクロRNAのシード配列に相補的（例えば100%相補的）な配列を含む。

【0065】

ある実施形態では、連続ヌクレオチド配列が、表1に列挙するシードマー配列のいずれか一つから選択される配列からなるか、またはそのような配列を含む。

【0066】

ある実施形態では、シードマーの3'ヌクレオチドが、連続ヌクレオチド配列の最も3'側のヌクレオチドを形成し、ここで、連続ヌクレオチド配列は、場合によっては、1つまたは2つのさらなるヌクレオチドを、シードマー配列の5'側に含んでもよい。

10

【0067】

ある実施形態では、オリゴマーが、5'端から数えてマイクロRNA配列中に存在する1番目のヌクレオチドに対応するヌクレオチドを含まない。

【0068】

ある実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドが、ターゲットマイクロRNAの1番目の5'端ヌクレオチドに対応するヌクレオチドを、3'端に含まない。

【0069】

（ヌクレオチド類似体）

20

本発明によれば、7、8、9、10ヌクレオチド、例えば7、8または9ヌクレオチドの短いオリゴヌクレオチドであって、オリゴマーのヌクレオチド単位の少なくとも50%、例えば55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または例えば100%が（好ましくは高アフィニティー）ヌクレオチド類似体、例えばロケット核酸（LNA）ヌクレオチド単位であるものは、特に有利であることがわかった。

【0070】

いくつかの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドが、7、8または9ヌクレオチド長であって、ヒトまたはウイルスのマイクロRNAのシード領域に相補的な連続ヌクレオチド配列を含み、ここでは、ヌクレオチドの少なくとも75%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも85%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば100%が、ロ

30

【0071】

そのようなオリゴマーにおいて、いくつかの実施形態では、連結基がホスホジエステル結合ではなく、例えばホスホロチオエート結合である。

【0072】

ある実施形態では、連続ヌクレオチド配列のヌクレオチド単位のすべてがLNAヌクレオチド単位である。

【0073】

ある実施形態では、連続ヌクレオチド配列が、7、8、9または10個の、好ましくは連続した、LNAヌクレオチド単位を含むか、そのようなLNAヌクレオチド単位からなる。

40

【0074】

さらにもう一つの好ましい実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドが7、8または9ヌクレオチド長であり、ヒトまたはウイルスのマイクロRNAのシード領域に相補的な連続ヌクレオチド配列を含み、ここで、ヌクレオチドの少なくとも80%はLNAであり、ヌクレオチド間結合の少なくとも80%、例えば85%、例えば90%、例えば95%、例えば100%はホスホロチオエート結合である。オリゴマー（シードマー）の連続ヌクレオチド配列がシード領域外に及んでもよいことは認識されるだろう。

【0075】

いくつかの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドが7ヌクレオチド長であり、それらがすべてLNAである。

50

【0076】

いくつかの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドが8ヌクレオチド長であり、そのうち、LNAでなくてもよいのは、最大1ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドが9ヌクレオチド長であり、そのうち、LNAでなくてもよいのは、最大1または2ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドが10ヌクレオチド長であり、そのうち、LNAでなくてもよいのは、1、2または3ヌクレオチドである。LNA以外のヌクレオチドは、例えばDNAまたは2'置換ヌクレオチド類似体であることができる。

【0077】

高アフィニティーヌクレオチド類似体は、相当するDNAヌクレオチドの結合アフィニティよりも高い、相補的RNAとの熱的二重鎖安定性を持つオリゴヌクレオチドをもたらす、ヌクレオチド類似体である。これは T_m を測定することによって決定することができる。

10

【0078】

いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列中に存在するヌクレオチド類似体単位が、2'-O-アルキル-RNA単位、2'-OMe-RNA単位、2'-アミノ-DNA単位、2'-フルオロ-DNA単位、LNA単位、PNA単位、HNA単位、INA単位、および2'MOE RNA単位からなる群より、場合によっては独立して、選択される。

【0079】

いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列中に存在するヌクレオチド類似体単位が、2'-O-アルキル-RNA単位、2'-OMe-RNA単位、2'-アミノ-DNA単位、2'-フルオロ-DNA単位、LNA単位、および2'MOE RNA単位からなる群より、場合によっては独立して、選択される。

20

【0080】

2'フルオロ-DNAという用語は、2'位にフッ素への置換(2'F)を持つDNA類似体を指す。2'フルオロ-DNAは2'フルオロ-ヌクレオチドの好ましい形態である。

【0081】

いくつかの実施形態では、オリゴマーが、少なくとも4個のヌクレオチド類似体単位、例えば少なくとも5個のヌクレオチド類似体単位、例えば少なくとも6個のヌクレオチド類似体単位、例えば少なくとも7個のヌクレオチド類似体単位、例えば少なくとも8個のヌクレオチド類似体単位、例えば少なくとも9個のヌクレオチド類似体単位、例えば10個のヌクレオチド類似体単位を含む。

30

【0082】

ある実施形態では、オリゴマーが、少なくとも3個のLNA単位、例えば少なくとも4個のLNA単位、例えば少なくとも5個のLNA単位、例えば少なくとも6個のLNA単位、例えば少なくとも7個のLNA単位、例えば少なくとも8個のLNA単位、例えば少なくとも9個のLNA単位、例えば10個のLNAを含む。

【0083】

ある実施形態では、LNA単位などのヌクレオチド類似体のうち、少なくとも1個がシトシンまたはグアニン、例えばLNA単位などのヌクレオチド類似体のうち、1~10個がシトシンまたはグアニン、例えばLNA単位などのヌクレオチド類似体のうち、2、3、4、5、6、7、8、または9個がシトシンまたはグアニンである。

40

【0084】

ある実施形態では、LNA単位などのヌクレオチド類似体のうち、少なくとも2個がシトシンまたはグアニンである。ある実施形態では、LNA単位などのヌクレオチド類似体のうち、少なくとも3個がシトシンまたはグアニンである。ある実施形態では、LNA単位などのヌクレオチド類似体のうち、少なくとも4個がシトシンまたはグアニンである。ある実施形態では、LNA単位などのヌクレオチド類似体のうち、少なくとも5個がシトシンまたはグアニンである。ある実施形態では、LNA単位などのヌクレオチド類似体のうち、少なくとも6個がシトシンまたはグアニンである。ある実施形態では、LNA単位などのヌクレオチド類似体のうち、少なくとも7個がシトシンまたはグアニンである。ある実施形態では、LNA単

50

位などのヌクレオチド類似体のうち、少なくとも8個がシトシンまたはグアニンである。

【0085】

ある好ましい実施形態では、ヌクレオチド類似体が、相補的RNAヌクレオチドに対して、相当するDNAヌクレオチドの前記相補的RNAヌクレオチドへの結合アフィニティーよりも高い、熱的二重鎖安定性を持つ。

【0086】

ある実施形態では、ヌクレオチド類似体が、一本鎖オリゴヌクレオチドに、強化された血清安定性を付与する。

【0087】

配列表および表1中の具体的SEQ IDはホスホロチオエート(PS)バックボーンを持つLNAモノマーのオリゴマーを指すが、本発明が、LNAの代替として、またはLNAと組み合わせて、他のヌクレオチド類似体および/または結合の使用も包含することはわかるだろう。したがって、配列表に示すヌクレオチド(塩基)の配列は、LNA/PSなどのLNAの配列であってもよいし、同じ塩基配列(A、T、CまたはG)を保ったまま、代替的なバックボーンケミストリー(例えば糖/結合ケミストリー)を持つオリゴマーであってもよい。

【0088】

他のヌクレオチド類似体、例えば2'-MOE RNAまたは2'-フルオロヌクレオチドなども、本発明のオリゴマーにおいて有用でありうると予想されるが、オリゴマーは、高い比率の、例えば少なくとも50%の、LNAヌクレオチドを持つことが好ましい。

【0089】

ヌクレオチド類似体は、DNA類似体、例えば2'-H基が-OH(RNA)以外の置換基で(例えば-O-CH₃、-O-CH₂-CH₂-O-CH₃、-O-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂、-O-CH₂-CH₂-CH₂-OHまたは-Fによる置換で)置換されているDNA類似体であることができる。ヌクレオチド類似体は、RNA類似体、例えばその2'-OH基が、例えば-H(DNA)以外の基(例えば-O-CH₃、-O-CH₂-CH₂-O-CH₃、-O-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂、-O-CH₂-CH₂-CH₂-OHまたは-F)による置換などで、修飾されているRNA類似体であることができる。ある実施形態では、ヌクレオチド類似体が「ENA」である。

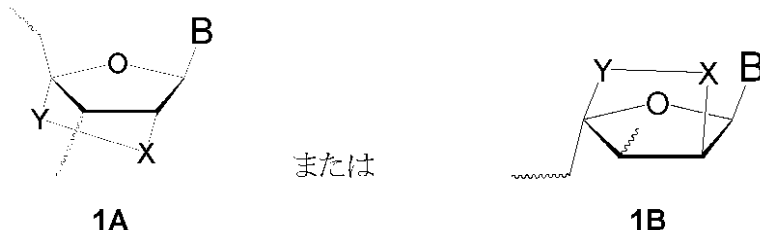
【0090】

(LNA)

本明細書で使用される「LNA単位」「LNAモノマー」「LNA残基」「ロックト(locked)核酸単位」「ロックト核酸モノマー」または「ロックト核酸残基」という用語は、二環式ヌクレオチド類似体を指す。LNA単位は、とりわけ、WO 99/14226、WO 00/56746、WO 00/56748、WO 01/25248、WO 02/28875、WO 03/006475およびWO 03/095467に記載されている。LNA単位はその化学式に関して定義することもできる。例えば、本明細書にいう「LNA単位」は、下記のスキーム1に示す化学構造を持つ。

スキーム1

【化1】



ここで、Xは、O、SおよびNR^Hからなる群より選択され、R^Hは、HまたはC₁₋₄-アルキルである；Yは、(-CH₂)_rであり、rは1~4の整数である；そしてBは含窒素塩基である。

【0091】

本発明のある好ましい実施形態では、rが1または2、特に1である。すなわち、好ましいLNA単位は、下記のスキーム2に示す化学構造を持つ。

スキーム2

10

20

30

40

50

ここで、Bは上に定義したとおりである。

【0096】

好ましくは、オキシ-LNA単位は、その -D-型である。すなわち、上記5Aに示す構造を持つ。上に示したとおり、Bは含窒素塩基（天然由来でも非天然由来でもよい）である。含窒素塩基の具体例には、アデニン（A）、シトシン（C）、5-メチルシトシン（^{Me}C）、イソシトシン、プソイドイソシトシン、グアニン（G）、チミン（T）、ウラシル（U）、5-プロモウラシル、5-プロピニルウラシル、5-プロピニル-6（5-propyny-6）、5-メチルチアゾールウラシル（5-methylthiazoleuracil）、6-アミノプリン、2-アミノプリン、イノシン、2,6-ジアミノプリン、7-プロピニル-7-デアザアデニン、7-プロピニル-7-デアザグアニンおよび2-クロロ-6-アミノプリンが含まれる。

10

【0097】

「チオ-LNA単位」という用語は、スキーム1におけるXがSであるLNA単位を指す。チオ-LNA単位は -D型と -L型の両方を取りうる。一般にチオ-LNA単位は -D型が好ましい。チオ-LNA単位は -D型および -L型をスキーム3にそれぞれ化合物3Aおよび3Bとして示す。

【0098】

「アミノ-LNA単位」という用語は、スキーム1におけるXがNHまたはNR^HであるLNA単位を指し、ここで、R^Hは水素またはC₁₋₄-アルキルである。アミノ-LNA単位は -D型と -L型の両方を取りうる。一般にアミノ-LNA単位は -D型が好ましい。アミノ-LNA単位は -D型および -L型をスキーム4にそれぞれ化合物4Aおよび4Bとして示す。

【0099】

「オキシ-LNA単位」という用語は、スキーム1におけるXがOであるLNA単位を指す。オキシ-LNA単位は -D型と -L型の両方を取りうる。一般にオキシ-LNA単位は -D型が好ましい。オキシ-LNA単位は -D型および -L型をスキーム5にそれぞれ化合物5Aおよび5Bとして示す。

20

【0100】

本明細書において、「C₁₋₆-アルキル」という用語は、最も長い鎖が1~6個の炭素原子を持つ線状または分岐飽和炭化水素鎖、例えばメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチルおよびヘキシルを意味するものとする。分岐炭化水素鎖とは、任意の炭素が炭化水素鎖で置換されたC₁₋₆-アルキルを意味するものとする。

30

【0101】

本明細書において、「C₁₋₄-アルキル」という用語は、最も長い鎖が1~4個の炭素原子を持つ線状または分岐飽和炭化水素鎖、例えばメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチルおよびtert-ブチルを意味するものとする。分岐炭化水素鎖とは、任意の炭素において炭化水素鎖で置換されているC₁₋₄-アルキルを意味するものとする。

【0102】

本明細書で使用される「C₁₋₆-アルコキシ」という用語は、C₁₋₆-アルキル-オキシ、例えばメトキシ、エトキシ、n-プロポキシ、イソプロポキシ、n-ブトキシ、イソブトキシ、sec-ブトキシ、tert-ブトキシ、ペントキシ、イソペントキシ、ネオペントキシおよびヘキソキシを意味するものとする。

40

【0103】

本明細書において「C₂₋₆-アルケニル」という用語は、2~6個の炭素原子を持ち、1個以上の二重結合を含む線状または分岐炭化水素基を意味するものとする。C₂₋₆-アルケニル基の説明となる例には、アリル、ホモ-アリル、ビニル、クロチル、プテニル、ブタジエニル、ペンテニル、ペンタジエニル、ヘキセニルおよびヘキサジエニルが含まれる。不飽和（二重結合）の位置は、炭素鎖上のどの位置にあってもよい。

【0104】

本発明に関して、「C₂₋₆-アルキニル」という用語は、2~6個の炭素原子を持ち、1個以上の三重結合を含む線状または分岐炭化水素基を意味するものとする。C₂₋₆-アルキニル

50

基の説明となる例には、アセチレン、プロピニル、ブチニル、ペンチニルおよびヘキシニルが含まれる。不飽和（三重結合）の位置は、炭素鎖上のどの位置にあってもよい。当業者には知られているように、2個以上の結合が不飽和であって、「C₂₋₆-アルキニル」が、ジ-イン（di-yne）またはエンジ-イン（enedi-yne）であることもできる。

【0105】

本発明に関して、DNA単位を、それに対応するLNA単位で置換するという場合、「対応するLNA単位」という用語は、置き換えられたDNA単位と同じ含窒素塩基を含むLNA単位によって、DNA単位が置き換えられていることを意味し、例えば含窒素塩基Aを含有するDNA単位の対応するLNA単位は、同様に含窒素塩基Aを含有する。例外は、DNA単位が塩基Cを含有する場合に、対応するLNA単位は塩基Cを含有しても塩基^MeCを含有してもよく、好ましくは^MeCを含有することである。

10

【0106】

本明細書において、「非LNA単位」という用語は、LNA単位ではないヌクレオシドを指す。すなわち、「非LNA単位」という用語には、DNA単位ならびにRNA単位が含まれる。好ましい非LNA単位はDNA単位である。

【0107】

「単位」「残基」および「モノマー」という用語は、本明細書では可換的に使用される。「少なくとも1つの」という用語は、1以上の整数、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20などを包含する。

【0108】

ヌクレオチド、薬剤（agent）、LNA単位などに関して使用される「ある」および「1つの」という用語は、1つまたはそれ以上を意味するものとする。特に、「...からなる群より選択される構成要素（例えばヌクレオチド、薬剤、LNA単位など）」という表現は、言及された構成要素の1つまたはそれ以上を選択しうることを意味するものとする。したがって、「A、BおよびCからなる群より選択される構成要素」のような表現には、A、BおよびCのあらゆる組合せ、すなわち、A、B、C、A+B、A+C、B+CおよびA+B+Cが含まれるものとする。

20

【0109】

（ヌクレオチド間結合）

「ヌクレオチド間連結基」とは、2つのヌクレオチドを一つに共有結合させる能力を持つ基、例えばDNA単位間、DNA単位とヌクレオチド類似体の間、2つの非LNA単位間、非LNA単位とLNA単位の間、および2つのLNA単位間などを共有結合させる能力を持つ基を意味するものとする。その例には、ホスフェート基、ホスホジエステル基およびホスホロチオエート基が含まれる。

30

【0110】

いくつかの実施形態では、オリゴマー中のヌクレオチド間結合の少なくとも1つ、例えばすべてが、ホスホジエステルである。しかし、インビボ使用には、ホスホロチオエート結合が好ましいかもしれない。

【0111】

オリゴヌクレオチド中の典型的なヌクレオチド間連結基はホスフェート基であるが、これらはホスフェートとは異なるヌクレオチド間連結基で置き換えることができる。本発明のもう一つの興味深い実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドは、そのヌクレオチド間連結基構造が修飾される。すなわち、修飾オリゴヌクレオチドは、ホスフェートとは異なるヌクレオチド間連結基を含む。したがって、ある好ましい実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドが、ホスフェートとは異なるヌクレオチド間連結基を少なくとも1つは含む。

40

【0112】

ホスフェート（-O-P(O)₂-O-）とは異なるヌクレオチド間連結基の具体例には、-O-P(O, S)-O-、-O-P(S)₂-O-、-S-P(O)₂-O-、-S-P(O, S)-O-、-S-P(S)₂-O-、-O-P(O)₂-S-、-O-P(O, S)-S-、-S-P(O)₂-S-、-O-PO(R^H)-O-、O-PO(OCH₃)-O-、-O-PO(NR^H)-O-、-O-PO(OCH₂CH₂S-R

50

)-O-、-O-PO(BH₃)-O-、-O-PO(NHR^H)-O-、-O-P(O)₂-NR^H-、-NR^H-P(O)₂-O-、-NR^H-CO-O-、-NR^H-CO-NR^H-、-O-CO-O-、-O-CO-NR^H-、-NR^H-CO-CH₂-、-O-CH₂-CO-NR^H-、-O-CH₂-CH₂-NR^H-、-CO-NR^H-CH₂-、-CH₂-NR^H-CO-、-O-CH₂-CH₂-S-、-S-CH₂-CH₂-O-、-S-CH₂-CH₂-S-、-CH₂-SO₂-CH₂-、-CH₂-CO-NR^H-、-O-CH₂-CH₂-NR^H-CO-、-CH₂-NCH₃-O-CH₂-が含まれ、ここで、R^Hは水素またはC₁₋₄-アルキルである。

【0113】

ヌクレオシド間連結基が修飾される場合、ヌクレオシド間連結基は好ましくはホスホロチオエート基(-O-P(O,S)-O-)である。ある好ましい実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドのすべてのヌクレオシド間連結基がホスホロチオエートである。

【0114】

ヌクレオシド間結合は、-O-P(O)₂-O-、-O-P(O,S)-O-、-O-P(S)₂-O-、-S-P(O)₂-O-、-S-P(O,S)-O-、-S-P(S)₂-O-、-O-P(O)₂-S-、-O-P(O,S)-S-、-S-P(O)₂-S-、-O-PO(R^H)-O-、O-PO(OCH₃)-O-、-O-PO(NR^H)-O-、-O-PO(OCH₂CH₂S-R)-O-、-O-PO(BH₃)-O-、-O-PO(NHR^H)-O-、-O-P(O)₂-NR^H-、-NR^H-P(O)₂-O-、-NR^H-CO-O-、-NR^H-CO-NR^H-からなる群より選択することができ、かつ/またはヌクレオシド間結合は、-O-CO-O-、-O-CO-NR^H-、-NR^H-CO-CH₂-、-O-CH₂-CO-NR^H-、-O-CH₂-CH₂-NR^H-、-CO-NR^H-CH₂-、-CH₂-NR^H-CO-、-O-CH₂-CH₂-S-、-S-CH₂-CH₂-O-、-S-CH₂-CH₂-S-、-CH₂-SO₂-CH₂-、-CH₂-CO-NR^H-、-O-CH₂-CH₂-NR^H-CO-、-CH₂-NCH₃-O-CH₂-からなる群より選択することができ、ここで、R^Hは、水素およびC₁₋₄-アルキルから選択される。好適には、いくつかの実施形態では、上記の硫黄(S)含有ヌクレオシド間結合が好ましいだろう。ヌクレオシド間結合は、独立して選択してもよいし、すべてが同じ、例えばホスホロチオエート結合であってもよい。ある実施形態では、連続ヌクレオチド配列のヌクレオチド単位間に存在するヌクレオシド間結合の少なくとも75%、例えば80%または85%または90%または95%またはすべてが、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

【0115】

(2つ以上のマイクロRNAをターゲットとするマイクロmir(micromir)オリゴヌクレオチド)

ある実施形態では、連続ヌクレオチド配列が、少なくとも2つのmiRNA配列、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のmiRNA配列の対応する配列に相補的である。単一のユニバーサル塩基を使用することにより、本発明の単一オリゴマーは、2つの別個のマイクロRNA(その一方または両方が、そのユニバーサルヌクレオチドが配置される位置で、オリゴマーに対応する領域中に単一のミスマッチを持つもの)をターゲットとすることができる。

【0116】

ある実施形態では、連続ヌクレオチド配列が、少なくとも2つのmiRNAシード領域配列(例えば2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のmiRNAシード領域配列)の配列に相補的である配列からなる、または、それを含む。

【0117】

ある実施形態では、連続ヌクレオチド配列が、miR-221とmiR-222の両方の対応する領域に相補的である。

【0118】

ある実施形態では、連続ヌクレオチド配列が、miR-17-92クラスターの2つ以上のメンバー(例えばmiR-17-5p、miR-20a/b、miR-93、miR-106a/bの2つ以上もしくはすべて;またはmiR-25、miR-92aおよびmiR-363の2つ以上もしくはすべて)の対応する領域に相補的である。

【0119】

ある実施形態では、連続ヌクレオチド配列が、5'GCTACAT3'に相補的な配列からなる、または、それを含む。

【0120】

(オリゴマーデザイン)

10

20

30

40

50

ある実施形態では、3'端から数えて本発明のオリゴマーの1番目のヌクレオチドが、LNA単位などのヌクレオチド類似体である。同じであっても異なってもよい実施形態では、3'端から数えて本発明のオリゴマーの最後のヌクレオチドが、LNA単位などのヌクレオチド類似体である。

【0121】

ある実施形態では、3'端から数えて本発明のオリゴマーの2番目のヌクレオチドが、LNA単位などのヌクレオチド類似体である。

【0122】

ある実施形態では、3'端から数えて本発明のオリゴマーの9番目および/または10番目のヌクレオチドが、LNA単位などのヌクレオチド類似体である。

10

【0123】

ある実施形態では、3'端から数えて本発明のオリゴマーの9番目のヌクレオチドが、LNA単位などのヌクレオチド類似体である。

【0124】

ある実施形態では、3'端から数えて本発明のオリゴマーの10番目のヌクレオチドが、LNA単位などのヌクレオチド類似体である。

【0125】

ある実施形態では、3'端から計算して本発明のオリゴマーの9番目と10番目のヌクレオチドがどちらも、LNA単位などのヌクレオチド類似体である。

【0126】

20

ある実施形態では、本発明のオリゴマーが、3個を超えて連続するDNAヌクレオチド単位の領域を含まない。ある実施形態では、本発明のオリゴマーが、2個を超えて連続するDNAヌクレオチド単位の領域を含まない。

【0127】

ある実施形態では、オリゴマーが、少なくとも2つの連続するヌクレオチド類似体単位からなる領域、例えば少なくとも2つの連続するLNA単位からなる領域を、少なくとも1つは含む。

【0128】

ある実施形態では、オリゴマーが、少なくとも3つの連続するヌクレオチド類似体単位からなる領域、例えば少なくとも3つの連続するLNA単位からなる領域を、少なくとも1つは含む。

30

【0129】

(オリゴマーにおけるLNAなどのヌクレオチド類似体の他のパターン)

少なくとも6個のLNAを含有するオリゴマー、例えば少なくとも7個のヌクレオチド単位を含有するオリゴマーが好ましいだろうと予想されるが、そのような短いオリゴマーがインピボで極めて効果的にマイクロRNAをターゲットとするという発見は、他のヌクレオチド類似体、例えば高アフィニティーヌクレオチド類似体を含む、短い本発明のオリゴマーを作製するために使用することができる。実際、LNAと他の高アフィニティーヌクレオチド類似体との組合せは、本発明の一部であるとみなされる。

【0130】

40

3'端から数えて位置1または2にあるヌクレオチドの修飾。位置1および/または2のヌクレオチドは、ヌクレオチド類似体、例えば高アフィニティーヌクレオチド類似体、例えばLNA、または、2'-O-アルキル-RNA単位、2'-OMe-RNA単位、2'-アミノ-DNA単位、2'-フルオロ-DNA単位、2'-MOE-RNA単位、LNA単位、PNA単位、HNA単位、INA単位からなる群より選択されるヌクレオチド類似体であることができる。したがって、これら2つの3'ヌクレオチドは、Xx、xX、XXまたはxxであることができ、ここで、ある実施形態では、XはLNAであり、xはDNAまたは別のヌクレオチド類似体、例えば2'-O-アルキル-RNA単位、2'-OMe-RNA単位、2'-アミノ-DNA単位、2'-フルオロ-DNA単位、LNA、および2'MOE RNA単位からなる群より選択される2'置換ヌクレオチド類似体である。したがって、前記非LNA単位(x)は、2'MOE RNAまたは2'-フルオロ-DNAであることができる。あるいは、Xはヌクレオチド類似体

50

であり、xはDNAである。

【0131】

2つの3'末端ヌクレオチドにおける上記の修飾は、後述のように、3'端から数えて位置3~8にあるヌクレオチドの修飾と組み合わせることができる。この点において、Xおよびxと呼ばれるヌクレオチドは、オリゴマー全体を通して同じであることができる。オリゴマーが7ヌクレオチド長しかない場合は、3'端から数えて8番目のヌクレオチドを捨てるべきであることはわかるだろう。位置3~8にあるヌクレオチドの修飾に関する下記の実施形態では、LNA単位を、ある実施形態では、他のヌクレオチド類似体、例えば本明細書で言及するもので置き換えることができる。したがって、「X」は、2'-O-アルキル-RNA単位、2'-OMe-RNA単位、2'-アミノ-DNA単位、2'-フルオロ-DNA単位、2'-MOE-RNA単位、LNA単位、PNA単位、HNA単位、INA単位からなる群より選択することができる。「x」は、好ましくは、DNAまたはRNA、最も好ましくはDNAである。しかしXはLNAであることが好ましい。

10

【0132】

本発明のある実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドが、3'端から数えて位置3~8で修飾される。この配列のデザインは、存在する非LNA単位の数または存在するLNA単位の数によって定義することができる。前者の好ましい一実施形態では、3'端から数えて位置3~8にあるヌクレオチドのうち、少なくとも1つ（例えば1つ）が非LNA単位である。もう一つの実施形態では、3'端から数えて位置3~8にあるヌクレオチドのうち、少なくとも2つ（例えば2つ）が非LNA単位である。さらにもう一つの実施形態では、3'端から数えて位置3~8にあるヌクレオチドのうち、少なくとも3つ（例えば3つ）が非LNA単位である。さらにもう一つの実施形態では、3'端から数えて位置3~8にあるヌクレオチドのうち、少なくとも4つ（例えば4つ）が非LNA単位である。さらにもう一つの実施形態では、3'端から数えて位置3~8にあるヌクレオチドのうち、少なくとも5つ（例えば5つ）が非LNA単位である。さらにもう一つの実施形態では、3'端から数えて位置3~8にある6つのヌクレオチドがすべて非LNA単位である。

20

【0133】

もう一つの定義では、ある実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドは、3'端から数えて位置3~8に、少なくとも3つのLNA単位を含む。本発明のオリゴヌクレオチドは、その一実施形態において、3'端から数えて位置3~8に3つのLNA単位を含む。3'端から数えて位置3~8にあるヌクレオチドに関する置換パターンは、XXXxxx、xXXXxx、xxXXXx、xxxXXX、XXxXxx、XXxxXx、XXxxxX、xXXxXx、xXXxxX、xxXXxX、XxXXxx、XxxXXx、XxxxXX、xXxXXx、xXxxXX、xxXxxX、xXxxXx、XxXXxx、XxxxXX、xXxXXx、xXxxXX、xxXxxX、xXxxXxおよびXxXxXxからなる群より選択することができる。ここで「X」はLNA単位を表し、「x」は非LNA単位を表す。ある好ましい実施形態では、3'端から数えて位置3~8にあるヌクレオチドに関する置換パターンが、XXxXxx、XXxxXx、XXxxxX、xXXxXx、xXXxxX、xxXXxX、XxXXxx、XxxxXX、xXxXXx、xXxxXX、xxXxxX、xXxxXxおよびXxXxXxからなる群より選択され、ここで「X」はLNA単位を表し、「x」は非LNA単位を表す。より好ましい一実施形態では、3'端から数えて位置3~8にあるヌクレオチドに関する置換パターンが、xXXxXx、xXXxxX、xxXXxX、xXxXXx、xXxxXX、xxXxxXおよびXxXxXxからなる群より選択され、ここで「X」はLNA単位を表し、「x」は非LNA単位を表す。ある実施形態では、3'端から数えて位置3~8にあるヌクレオチドに関する置換パターンが、xXxXxXまたはXxXxXxであり、ここで「X」はLNA単位を表し、「x」は非LNA単位を表す。ある実施形態では、3'端から数えて位置3~8にあるヌクレオチドに関する置換パターンがxXxXxXであり、ここで「X」はLNA単位を表し、「x」は非LNA単位を表す。

30

40

【0134】

さらにもう一つの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドが、3'端から数えて位置3~8に少なくとも4つのLNA単位を含む。その一実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドは、3'端から数えて位置3~8に4つのLNA単位を含む。3'端から数えて位置3~8にあるヌクレオチドに関する置換パターンは、xxXXXX、xXxXXX、xXXxXX、xXXXxX、xXXXXx、Xx xXXX、XxXxXX、XxXXxX、XxXXXx、XXxxXX、XXxXxX、XXxXXx、XXXxxX、XXXxXxおよびXXXXxxからなる群より選択することができる。ここで「X」はLNA単位を表し、「x」は非LNA単位を

50

表す。

【0135】

さらにもう一つの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドが3'端から数えて位置3~8に少なくとも5つのLNA単位を含む。その一実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドは、3'端から数えて位置3~8に5つのLNA単位を含む。3'端から数えて位置3~8にあるヌクレオチドに関する置換パターンは、xxxxxx、Xxxxxx、XXxxxx、XXXxxx、XXXXxxおよびXXXXxからなる群より選択することができ、ここで「X」はLNA単位を表し、「x」は非LNA単位を表す。

【0136】

好ましくは、本発明のオリゴヌクレオチドは、3'端から数えて位置3~8に、1つまたは2つのLNA単位を含む。これは、オリゴ：マイクロRNA二重鎖（RNA:RNA二重鎖と似た構造を持つ二重鎖）によって形成されるA-ヘリックスの安定性にとって有利であると考えられる。

【0137】

さらにもう一つの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドが、3'端から数えて位置3~8に少なくとも6個のLNA単位を含む。その一実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドは、3'端から数えて位置3~8に3~6個のLNA単位を含むと共に、3'端から数えて位置3~8の領域において高アフィニティーヌクレオチド類似体（LNA単位を含む）の総量が6になるように、同じ領域に0~3個の他の高アフィニティーヌクレオチド類似体を含む。

【0138】

いくつかの実施形態では、例えばXがLNAである場合に、前記非LNA単位（x）が、別のヌクレオチド類似体単位、例えば2'-O-アルキル-RNA単位、2'-OMe-RNA単位、2'-アミノ-DNA単位、2'-フルオロ-DNA単位、LNA、および2'MOE RNA単位からなる群より選択される2'置換ヌクレオチド類似体である。したがって前記非LNA単位（x）は2'MOE RNAまたは2'-フルオロ-DNAであることができる。

【0139】

9個または10個のヌクレオチドを持つオリゴマーの場合、位置9および/または10にあるヌクレオチドは、ヌクレオチド類似体、例えばLNAなどの高アフィニティーヌクレオチド類似体であるか、2'-O-アルキル-RNA単位、2'-OMe-RNA単位、2'-アミノ-DNA単位、2'-フルオロ-DNA単位、2'-MOE-RNA単位、LNA単位、PNA単位、HNA単位、INA単位からなる群より選択されるヌクレオチド類似体であることができる。したがって、それら2つの5'ヌクレオチドは、Xx、xX、XXまたはxxであることができ、ここで、ある実施形態においては、XはLNAであり、xはDNAまたは別のヌクレオチド類似体、例えば2'-O-アルキル-RNA単位、2'-OMe-RNA単位、2'-アミノ-DNA単位、2'-フルオロ-DNA単位、LNA、および2'MOE RNA単位からなる群より選択される2'置換ヌクレオチド類似体である。したがって、前記非LNA単位（x）は、2'MOE RNAまたは2'-フルオロ-DNAであることができる。あるいは、Xはヌクレオチド類似体であり、xはDNAである。

【0140】

2つの5'末端ヌクレオチドにおける上記の修飾は、3'端から数えて位置3~8にあるヌクレオチドおよび/または2つの3'ヌクレオチドの、上述した修飾と組み合わせることができる。これに関して、Xおよびxと呼ばれるヌクレオチドは、オリゴマー全体を通して同じであることができる。

【0141】

本発明のある好ましい実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、5'端にLNA単位を含有する。もう一つの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、5'端から数えて最初の2つの位置にLNA単位を含有する。

【0142】

ある実施形態では、本発明は、さらに、本発明の医薬組成物に関連して説明するオリゴマー、または生物でインビボを使用するための、例えば医薬用の、オリゴマーであって、前記オリゴマー（または連続ヌクレオチド配列）が、

- i) 少なくとも1個のホスホロチオエート結合、および/または
 - ii) 少なくとも1個の3'末端LNA単位、および/または
 - iii) 少なくとも1個の5'末端LNA単位
- を含むものを提供する。

【0143】

したがって本オリゴマーは、少なくとも1個のホスホロチオエート結合（例えばすべての結合がホスホロチオエートである）および少なくとも1個の3'末端LNA単位、および少なくとも1個の5'末端LNA単位を含有しうる。

【0144】

大半の治療用途にとって、オリゴヌクレオチドは完全にホスホロチオエート化されることが好ましい。例外は、ヌクレアーゼが存在しないために、連続するDNA単位間であってもホスホジエステル結合を使用することができ、ホスホロチオエート化（phosphorothioation）が毒性を持ちうる、脳または脊髄などといったCNSで使用するための治療オリゴヌクレオチドである。

【0145】

本明細書で言及するとおり、本発明のオリゴヌクレオチドのもう一つの態様は、2番目の3'ヌクレオチド、および/または（3'端から）9番目および10番目（存在する場合）も、LNAでありうることである。

【0146】

ある実施形態では、オリゴマーが、少なくとも5個のヌクレオチド類似体単位、例えば少なくとも5個のLNA単位を、miRNAシード領域に相補的な位置に含む。

【0147】

ある実施形態では、マイクロRNAシード領域の配列に相補的なオリゴマーのヌクレオチド配列が、(X)xXXXXX、(X)XxXXXX、(X)XXxXXX、(X)XXXxXX、(X)XXXXxXおよび(X)XXXXXxからなる群より選択され、ここで、「X」はヌクレオチド類似体、例えばLNA単位を表し、(X)は、随意のヌクレオチド類似体、例えばLNA単位を表し、「x」はDNAまたはRNAヌクレオチド単位を表す。

【0148】

ある実施形態では、オリゴマーが6個または7個のヌクレオチド類似体単位、例えば6個または7個のLNA単位を、miRNAシード領域に相補的な位置に含む。

【0149】

ある実施形態では、マイクロRNAシード領域の配列に相補的なオリゴマーのヌクレオチド配列が、XXXXXX、XxXXXXX、XXxXXXX、XXXxXXX、XXXXxXX、XXXXXxXおよびXXXXXXxからなる群より選択され、ここで、「X」はヌクレオチド類似体、例えばLNA単位、例えばLNA単位を表し、「x」はDNAまたはRNAヌクレオチド単位を表す。

【0150】

ある実施形態では、オリゴマーの3'端から数えて位置7~8にある2ヌクレオチドモチーフが、xx、XX、xXおよびXxからなる群より選択され、ここで、「X」はヌクレオチド類似体、例えばLNA単位、例えばLNA単位を表し、「x」はDNAまたはRNAヌクレオチド単位を表す。

【0151】

ある実施形態では、オリゴマーの3'端から数えて位置7~8にある2ヌクレオチドモチーフが、XX、xXおよびXxからなる群より選択され、ここで、「X」はヌクレオチド類似体、例えばLNA単位、例えばLNA単位を表し、「x」はDNAまたはRNAヌクレオチド単位を表す。

【0152】

ある実施形態では、オリゴマーが少なくとも12個のヌクレオチドを含み、オリゴマーの3'端から数えて位置11~12にある2ヌクレオチドモチーフが、xx、XX、xXおよびXxからなる群より選択される。ここで「X」はヌクレオチド類似体、例えばLNA単位、例えばLNA単位を表し、「x」はDNAまたはRNAヌクレオチド単位を表す。

【0153】

10

20

30

40

50

ある実施形態では、オリゴマーが12個のヌクレオチドを含み、オリゴマーの3'端から数えて位置11~12にある2ヌクレオチドモチーフが、XX、xXおよびXxからなる群より選択され、ここで「X」はヌクレオチド類似体、例えばLNA単位、例えばLNA単位であり、「x」はDNAまたはRNAヌクレオチド単位、例えばDNA単位である。

【0154】

ある実施形態では、オリゴマーがヌクレオチド類似体単位、例えばLNA単位を、5'端に含む。

【0155】

ある実施形態では、ヌクレオチド類似体単位、例えばXが、2'-O-アルキル-RNA単位、2'-OMe-RNA単位、2'-アミノ-DNA単位、2'-フルオロ-DNA単位、2'-MOE-RNA単位、LNA単位、PNA単位、HNA単位、INA単位からなる群より独立して選択される。

10

【0156】

ある実施形態では、本発明のオリゴマーのすべてのヌクレオチドがヌクレオチド類似体単位である。

【0157】

ある実施形態では、ヌクレオチド類似体単位、例えばXが、2'-OMe-RNA単位、2'-フルオロ-DNA単位、およびLNA単位からなる群より独立して選択される。

【0158】

ある実施形態では、オリゴマーが、前記少なくとも1つのLNA類似体単位と、少なくとも1つの、LNAではないさらなるヌクレオチド類似体単位とを含む。

20

【0159】

ある実施形態では、1つまたは複数の非LNAヌクレオチド類似体単位が、2'-OMe RNA単位および2'-フルオロDNA単位から独立して選択される。

【0160】

ある実施形態では、オリゴマーが少なくとも1つの配列XYXまたはYXYからなり、ここで、XはLNAであり、Yは2'-OMe RNA単位および2'-フルオロDNA単位のどちらかである。

【0161】

ある実施形態では、オリゴマーのヌクレオチドの配列が、交互するX単位とY単位からなる。

【0162】

ある実施形態では、オリゴマーが交互するLNA単位とDNA単位(Xx)または(xX)を含む。ある実施形態では、オリゴマーが、交互するLNAとそれに続く2つのDNA単位というモチーフ(Xxx)、xXxまたはxxXを含む。

30

【0163】

ある実施形態では、DNAまたは非LNAヌクレオチド類似体単位の少なくとも1つが、上で言及した実施形態のいずれか一つにおいてLNAヌクレオチド単位であると特定された位置から選択された位置において、LNAヌクレオチドで置き換えられる。ある実施形態では「X」がLNA単位を表す。

【0164】

(本発明のオリゴマーのさらなるデザイン)

40

下記の表1に、本発明のオリゴヌクレオチドの有利なターゲットとなりうる短いマイクロRNA配列の限定でない例を記載する。

【0165】

本発明のオリゴヌクレオチド、例えば表1に開示するものは、7、8、9または10LNAヌクレオチドの配列5'-3'LLLLLLL(L)(L)(L)(L)を持つか、次に挙げるモチーフの最初の7、8、9または10ヌクレオチドからなる群より選択されるヌクレオチドの配列を持つことができる：

LdLddL(L)(d)(d)(L)(d)(L)(d)(L)(L)、LdLdLL(L)(d)(d)(L)(L)(L)(d)(L)(L)、LMLMML(L)(M)(M)(L)(M)(L)(M)(L)(L)、LMLMLL(L)(M)(M)(L)(L)(L)(M)(L)(L)、LFLFFL(L)(F)(F)(L)(F)(L)(F)(L)(L)、LFLFLL(L)(F)(F)(L)(L)(L)(F)(L)(L)、3つ周期のデザイン(every third

50

【 0 1 7 5 】

高コレステロール血症に関して、関連障害とは、アテローム性動脈硬化または高脂質血症などの疾患を指す。関連疾患のさらなる例には、異なるタイプのHDL/LDLコレステロール不均衡；異常脂質血症、例えば家族性複合型高脂質血症（FCHL）、後天性高脂質血症、スタチン抵抗性高コレステロール血症；冠状動脈疾患（CAD）、冠動脈心疾患（CHD）、アテローム性動脈硬化も含まれる。

【 0 1 7 6 】

ある実施形態では、本発明の医薬組成物がさらに、VLDLアセンブリー経路の阻害剤、例えばApoB阻害剤、またはMTP阻害剤（例えば参照により本明細書に組み込まれるUS 60/977,497に開示されているもの）である、第2の独立した活性成分を含む。

10

【 0 1 7 7 】

本発明はさらに、マイクロRNAの存在または過剰発現に関連する疾患または医学的障害を処置するための方法であって、処置を必要とする人に、7~10ヌクレオチド長、例えば7、8、9、または10ヌクレオチド長のオリゴマーを含む組成物（例えば医薬組成物）を投与するステップを含む方法を提供する。

【 0 1 7 8 】

本発明はさらに、ある細胞または生物におけるmiRNAターゲットの有効量（すなわち「利用可能な」miRNA）を減少させるための方法であって、その細胞または生物に、6または7~10ヌクレオチド長、例えば7、8、9、または10ヌクレオチド長のオリゴマーを含む組成物（例えば医薬組成物）を投与することを含む方法を提供する。

20

【 0 1 7 9 】

ある細胞または生物における1つ以上のマイクロRNAの「有効量を減少させる」とは、その細胞または生物におけるマイクロRNA機能の障害を指すと認識すべきである。細胞は好ましくはその1つ以上のマイクロRNAを発現させる哺乳動物細胞またはヒト細胞である。

【 0 1 8 0 】

本発明はさらに、ある細胞または生物におけるmiRNAのターゲットmRNAを抑制解除するための方法であって、その細胞または生物に、7~10ヌクレオチド長、例えば7、8、9、または10ヌクレオチド長のオリゴマー、または前記オリゴヌクレオチドを含む組成物を投与することを含む方法を提供する。

【 0 1 8 1 】

上述のように、マイクロRNAはいくつかの疾患に関係する。したがって、本発明の第4の態様は、脊髄性筋萎縮症、トゥーレット症候群、C型肝炎、脆弱X精神遅滞、ディジョージ症候群およびがん、例えば限定でない例として、慢性リンパ球性白血病、乳がん、肺がんおよび大腸がんからなる群より選択される、マイクロRNAの発現に関連する疾患、特にがんを処置するための医薬を製造するための、本明細書に記載するオリゴヌクレオチドの使用に関する。

30

【 0 1 8 2 】

（合成方法）

本発明は、さらに、ヒトマイクロRNAをターゲットとするオリゴマー、例えば本明細書に記載のオリゴマーを合成するための方法であって、

40

- a. 場合によっては、3'端から数えて1番目の、LNAヌクレオチドなどのヌクレオチド類似体であるヌクレオチドを選択するステップ、
- b. 場合によっては、3'端から数えて2番目の、LNAヌクレオチドなどのヌクレオチド類似体であるヌクレオチドを選択するステップ、
- c. 本明細書に記載するmiRNAシード領域に対応するオリゴマーの領域を選択するステップ、
- d. 本明細書に記載する7番目および場合によっては8番目のヌクレオチドを選択するステップ、
- e. 場合によっては、本明細書に記載するとおり、オリゴマーのさらなる5'末端を1個または2個選択するステップ

50

を含み、合成がステップa~eに記載の領域の逐次的合成によって行なわれる方法を提供し、ここで、前記合成は、3'-5' (aからf) 方向または5'-3' (eからa) 方向に行なうことができ、前記オリゴマーはmiRNAターゲットの配列に相補的である。

【0183】

本発明はさらに、オリゴマー（例えば本発明のオリゴマー）を製造するための方法であって、a) 2つ以上のmiRNA配列を比較して、少なくとも7ヌクレオチド長、例えば7、8、9または10ヌクレオチド長の共通する連続ヌクレオチド配列（すなわちどちらの非同一miRNAにも見いだされる配列）を含む、2つ以上のmiRNA配列を同定するステップ、b) 前記共通する連続ヌクレオチド配列に相補的な連続ヌクレオチド配列からなる、または、から構成される（consists or comprises of）オリゴマー配列を製造するステップを含み、前記オリゴマーが本発明のオリゴマーである方法を提供する。好ましい一例では、共通する連続ヌクレオチド配列が、前記2つ以上のmiRNA配列（少なくとも6ヌクレオチド長の共通する連続ヌクレオチド配列を含むもの）のシード領域からなる、または、から構成される。ある実施形態では、2つ以上のmiRNAのシード領域が同一である。好適には、オリゴマーが、前記2つ以上のmiRNAに相補的な配列から構成される7または8ヌクレオチド長のシードマー配列からなる、または、から構成される。この方法は、上述した方法のステップcと共に使用することができる。

10

【0184】

本発明のオリゴマーを合成するための方法は、標準的な固相オリゴヌクレオチド合成を使って行なうことができる。

20

【0185】

ある実施形態では、ヒトマイクロRNAをターゲットとするオリゴマーを合成するための方法が、3'から5'への方向（a-e）に行なわれる。本発明のもう一つの態様は、ターゲットマイクロRNAを本明細書に記載するオリゴヌクレオチドと接触させることによって、そのターゲットマイクロRNAのレベルを減少させるための方法であり、ここで、オリゴヌクレオチドは（i）ターゲットマイクロRNA配列に相補的であり、（ii）3'端に、ターゲットマイクロRNAの1番目の5'端ヌクレオチドに対応するヌクレオチドを持たない。

【0186】

（二重鎖の安定性および T_m ）

ある実施形態において、本発明のオリゴマーは、ホスホジエステルヌクレオシド間結合を持つ相補的一本鎖RNA核酸分子（典型的には前記一本鎖オリゴヌクレオチドとほぼ同じ長さであるもの）と、二重鎖を形成する能力を持ち、ここで、その二重鎖は、30 ~ 70 または80、例えば30 ~ 60 もしくは70、または30 ~ 50 もしくは60 の T_m を持つ。ある実施形態では、 T_m が少なくとも40 である。 T_m は、オリゴマーと相補的RNAターゲットとの T_m を次のバッファー条件で決定することによって決定することができる：100mM NaCl、0.1mM EDTA、10mM Na-ホスフェート、pH 7.0（詳細なプロトコールについては実施例参照）。高アフィニティー類似体は、本発明のオリゴマー中に使用した場合に、DNA塩基だけを含む同一オリゴマーと比較して、そのオリゴマーの T_m を増加させる類似体と定義することができる。

30

【0187】

（コンジュゲート）

ある実施形態では、前記オリゴマーが、1つ以上の非ヌクレオチド（またはポリ-ヌクレオチド）化合物とコンジュゲートされる。

40

【0188】

この文脈において、「コンジュゲート」という用語は、本明細書に記載するオリゴマーと1つ以上の非ヌクレオチドまたは非ポリヌクレオチド部分との共有結合（「コンジュゲーション」）によって形成される不均質な（heterogenous）分子を示すものとする。非ヌクレオチドまたは非ポリヌクレオチド部分の例には、高分子剤、例えばタンパク質、脂肪酸鎖、糖残基、糖タンパク質、ポリマー、またはそれらの組合せが含まれる。典型的には、タンパク質として、ターゲットタンパク質に対する抗体が挙げられる。典型的なポリマ

50

ーとして、ポリエチレングリコールが挙げられる。

【0189】

したがって、さまざまな実施形態において、本発明のオリゴマーは、典型的にはヌクレオチドの連続配列からなるポリヌクレオチド領域と、さらなる非ヌクレオチド領域との両方を含みうる。連続ヌクレオチド配列からなる本発明のオリゴマーに言及する場合、その化合物は、非ヌクレオチド構成要素、例えばコンジュゲート構成要素を含みうる。

【0190】

本発明のさまざまな実施形態において、オリゴマー化合物は、例えばオリゴマー化合物の細胞取り込みを増加させるために使用することができるリガンド/コンジュゲートに連結される。WO2007/031091には、適切なリガンドおよびコンジュゲートが記載されており、それらは参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0191】

本発明は、本明細書に記載する本発明の化合物と、前記化合物に共有結合された少なくとも1つの非ヌクレオチドまたは非ポリヌクレオチド部分とを含む、コンジュゲートも提供する。したがって、本発明の化合物が本明細書に開示する指定された核酸またはヌクレオチド配列からなるさまざまな実施形態において、本化合物は、前記化合物に共有結合された少なくとも1つの非ヌクレオチドまたは非ポリヌクレオチド部分（例えば1つ以上のヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体を含まないもの）も含みうる。

【0192】

（コンジュゲート部分への）コンジュゲーションは、本発明のオリゴマーの活性、細胞分布または細胞取り込みを強化しうる。そのような部分には、抗体、ポリペプチド、脂質部分、例えばコレステロール部分、コール酸、チオエーテル、例えばヘキシル-s-トリチルチオール、チオコレステロール、脂肪族鎖、例えばドデカンジオールまたはウンデシル残基、リン脂質、例えばジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールまたはトリエチルアンモニウム1,2-ジ-o-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-h-ホスホネート、ポリアミンまたはポリエチレングリコール鎖、アダマンタン酢酸、パルミチル部分、オクタデシルアミンまたはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分が含まれるが、これらに限るわけではない。

20

【0193】

本発明のオリゴマーは、活性薬物、例えばアスピリン、イブプロフェン、サルファ剤、抗糖尿病薬、抗菌剤または抗生物質にコンジュゲートすることもできる。

30

【0194】

一定の実施形態では、コンジュゲートされる部分がステロール、例えばコレステロールである。

【0195】

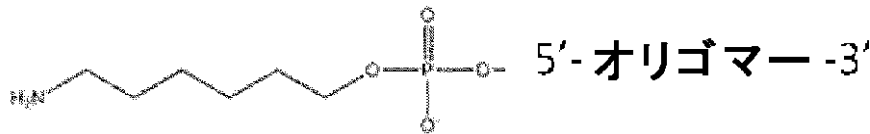
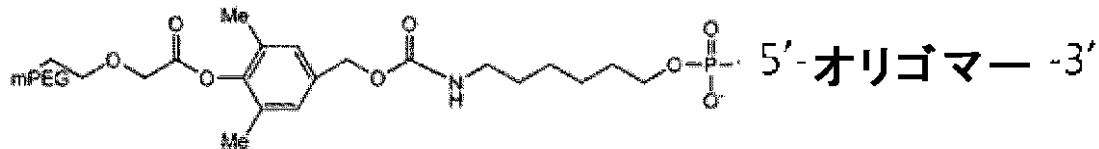
さまざまな実施形態において、コンジュゲートされる部分は、陽荷電ポリマー、例えば1~50、例えば2~20、例えば3~10アミノ酸残基長の陽荷電ペプチド、および/またはポリアルキレンオキシド、例えばポリエチレングリコール（PEG）またはポリプロピレングリコールなどを含む、または、それからなる - 参照により本明細書に組み込まれるWO 2008/034123参照。好適には、陽荷電ポリマー、例えばポリアルキレンオキシドを、本発明のオリゴマーに、リンカー（例えばWO 2008/034123に記載の切り離し可能なリンカー）を介して取付けることができる。

40

【0196】

例えば、本発明のコンジュゲートには、以下のコンジュゲート部分を使用することができる。

【化6】



10

【0197】

(活性化オリゴマー)

本明細書で使用する「活性化オリゴマー」という用語は、オリゴマーを1つ以上の、コンジュゲートされる部分（すなわちそれ自身は核酸またはモノマーでない部分）に共有結合して、本明細書に記載のコンジュゲートを形成させることを可能にする、少なくとも1つの官能部分に共有結合（すなわち官能化）された本発明のオリゴマーを指す。典型的には、官能部分は、例えばアデニン塩基の3'-ヒドロキシル基または環外NH₂基を介してオリゴマーに共有結合する能力を持つ化学基、好ましくは親水性であるスペーサー、およびコンジュゲートされる部分に結合する能力を持つ末端基（例えばアミノ、スルフヒドリルまたはヒドロキシル基）を含むだろう。いくつかの実施形態では、この末端基が保護されず、例えばNH₂基である。別の実施形態では、末端基が、例えば任意の適切な保護基（例えば「Protective Groups in Organic Synthesis」Theodora W Greene and Peter G M Wuts, 第3版 (John Wiley & Sons, 1999) に記載されているもの）で保護される。適切なヒドロキシル保護基の例には、酢酸エステルなどのエステル、ベンジル、ジフェニルメチル、またはトリフェニルメチルなどのアラキル基、およびテトラヒドロピラニルが含まれる。適切なアミノ保護基の例には、ベンジル、*p*-メチルベンジル、ジフェニルメチル、トリフェニルメチル、ベンジルオキシカルボニル、*tert*-ブトキシカルボニル、およびアシル基、例えばトリクロロアセチルまたはトリフルオロアセチルが含まれる。いくつかの実施形態では、官能部分が自己切断性である。別の実施形態では、官能部分が生分解性である。例えば参照によりそのまま本明細書に組み込まれる米国特許第7,087,229号参照。

20

30

【0198】

いくつかの実施形態では、コンジュゲートされる部分をオリゴマーの5'端に共有結合することができるように、本発明のオリゴマーが5'端で官能化される。別の実施形態では、本発明のオリゴマーを、3'端で官能化することができる。さらに別の実施形態では、本発明のオリゴマーをバックボーン上で官能化するか、複素環式塩基部分上で官能化することができる。さらに別の実施形態では、5'端、3'端、バックボーンおよび塩基から独立して選択される2箇所以上の位置で、本発明のオリゴマーを官能化することができる。

【0199】

いくつかの実施形態では、本発明の活性化オリゴマーが、官能部分に共有結合された1つ以上のモノマーを合成時に組み込むことによって合成される。別の実施形態では、本発明の活性化オリゴマーが、官能化されていないモノマーを使って合成され、合成の完了後に、そのオリゴマーが官能化される。いくつかの実施形態では、アミノアルキルリンカー（ここで、アルキル部分は式(CH₂)_wを持ち、wは1~10の範囲の整数、好ましくは約6であり、アルキルアミノ基のアルキル部分は直鎖または分岐鎖であることができる）を含有するヒンダードエステルで官能化され、この場合、官能基はオリゴマーにエステル基(-O-C(=O)-(CH₂)_wNH)を介して取付けられる。

40

【0200】

別の実施形態では、オリゴマーが、(CH₂)_w-スルフヒドリル(SH)リンカーを含有するヒンダードエステル（ここで、wは1~10の範囲の整数、好ましくは約6であり、アルキル

50

アミノ基のアルキル部分は直鎖または分岐鎖であることができる)で官能化され、この場合、官能基は、オリゴマーにエステル基(-O-C(=O)-(CH₂)_wSH)を介して取付けられる。

【0201】

いくつかの実施形態では、スルフヒドリル活性化オリゴヌクレオチドが、ポリエチレングリコールまたはペプチドなどのポリマー部分と(ジスルフィド結合の形成を介して)コンジュゲートされる。

【0202】

上述のようにヒンダードエステルを含有する活性化オリゴマーは、当技術分野で知られる任意の方法によって、特に、参照によりそのまま本明細書に組み込まれるPCT公開番号W/O 2008/034122とその実施例に開示されている方法によって、合成することができる。

【0203】

さらに別の実施形態では、米国特許第4,962,029号および同第4,914,210号に実質的に記載されている官能化試薬、すなわち、一端にホスホルアミダイト基を持ち、それが、親水性スパーサー鎖を介して、保護されたまたは保護されていないスルフヒドリル、アミノまたはヒドロキシル基を含む他端に連結されている、実質的に線状の試薬を使って、スルフヒドリル、アミノまたはヒドロキシル基をオリゴマー中に導入することにより、本発明のオリゴマーが官能化される。そのような試薬は、主として、オリゴマーのヒドロキシル基と反応する。いくつかの実施形態では、そのような活性化オリゴマーが、オリゴマーの5'-ヒドロキシル基にカップリングされた官能化試薬を持つ。別の実施形態では、活性化オリゴマーが、3'-ヒドロキシル基にカップリングされた官能化試薬を持つ。さらに別の実施形態では、本発明の活性化オリゴマーが、オリゴマーのバックボーン上のヒドロキシル基にカップリングされた官能化試薬を持つ。さらなる実施形態では、本発明のオリゴマーが、参照により本明細書にそのまま組み込まれる米国特許第4,962,029号および同第4,914,210号に記載されているように、2つ以上の官能化試薬で官能化される。そのような官能化試薬を合成し、それらをモノマーまたはオリゴマーに組み込む方法は、米国特許第4,962,029号および同第4,914,210号に開示されている。

【0204】

いくつかの実施形態では、固相に結合されたオリゴマーの5'末端をジエチルホスホルアミダイト誘導体で官能化した後、脱保護されたオリゴマーを例えばDiels-Alder付加環化反応によってアミノ酸またはペプチドとコンジュゲートする。

【0205】

さまざまな実施形態では、2'-糖修飾を持つモノマー、例えば2'-カルバメート置換糖または2'-(0-ペンチル-N-フタルイミド)-デオキシリボース糖をオリゴマーに組み込むことにより、コンジュゲートされる部分をオリゴマーの糖に共有結合させることが容易になる。別の実施形態では、1つ以上のモノマーの2'位にアミノ含有リンカーを持つオリゴマーが、例えば5'-ジメトキシトリチル-2'-0-(e-フタルイミジルアミノペンチル)-2'-デオキシシアデノシン-3'-N,N-ジイソプロピル-シアノエトキシホスホルアミダイトなどの試薬を使って製造される。例えばManoharanら, Tetrahedron Letters, 1991, 34, 7171参照。

【0206】

さらなる実施形態において、本発明のオリゴマーは、ヌクレオチド上、例えばN6プリンアミノ基上、グアニンの環外N2上、シトシンのN4または5位上に、アミン含有官能部分を持ちうる。さまざまな実施形態において、そのような官能化は、既に官能化されている市販の試薬をオリゴマー合成で使用することによって達成することができる。

【0207】

いくつかの官能部分は市販されており、例えばヘテロ二官能性およびホモ二官能性連結部分は、Pierce Co. (イリノイ州ロックフォード)から入手することができる。他の市販連結基に、5'-Amino-Modifier C6および3'-Amino-Modifier試薬があり、これらはどちらもGlen Research Corporation (バージニア州スターリング)から入手できる。5'-Amino-Modifier C6は、ABI (Applied Biosystems Inc., カリフォルニア州フォスターシティ)からAminolink-2として入手することもでき、3'-Amino-Modifierは、Clontech Laborator

10

20

30

40

50

ies Inc. (カリフォルニア州パロアルト) から入手することができる。

【0208】

(治療および医薬組成物 - 製剤および投与)

最初に説明したように、本発明のオリゴヌクレオチドは、改善された特性を持つ適切な薬を構成するだろう。強力で安全な薬の設計には、アフィニティ/特異性、生物学的液体における安定性、細胞取り込み、作用様式、薬物動態特性および毒性など、さまざまなパラメータの微調整が必要である。

【0209】

したがって、さらにもう一つの態様において、本発明は、本発明のオリゴヌクレオチドと医薬上許容される希釈剤、担体またはアジュバントとを含む医薬組成物に関する。好ましくは、前記担体は食塩水または緩衝食塩水である。

10

【0210】

さらにもう一つの態様において、本発明は、医薬として使用するための本発明のオリゴヌクレオチドに関する。

【0211】

理解されるであろうが、投薬は、処置されるべき疾患状態の重症度および応答性に依存し、一連の処置は、数日から数ヶ月、または治癒が達成されるまで、もしくは疾患状態の減退が達成されるまで続けられる。最適な投薬スケジュールは、患者の身体における薬蓄積の測定から算出することができる。最適な投薬量は、個々のオリゴヌクレオチドの相対的力価に依存して変動しうる。これは、一般的には、インビトロおよびインビボ動物モデルで有効であることがわかったEC50に基づいて、見積ることができる。一般的に、投薬量は、体重1kgあたり0.01 µg~1gであり、1日、1週間、1ヶ月または1年に1回以上投与するか、2~10年ごとに1回投与するか、数時間~数ヶ月間にわたる持続注入によって投与することができる。投薬の反復率は、体液または組織におけるその薬の測定された滞留時間および濃度に基づいて見積ることができる。処置が成功した後、疾患状態の再発を防ぐために、患者は維持療法を受けることが望ましいかもしれない。

20

【0212】

上述のように、本発明は、少なくとも1つの本発明のオリゴヌクレオチドを活性成分として含む医薬組成物にも関係する。本発明の医薬組成物が、場合によっては、医薬担体を含むこと、および本医薬組成物が、場合によっては、化学療法用化合物、抗炎症化合物、抗ウイルス化合物および/または免疫調整化合物などのさらなる化合物を含むことを理解すべきである。

30

【0213】

本発明のオリゴヌクレオチドは「そのまま」使用するか、さまざまな医薬上許容される塩の形態で使用することができる。本明細書で使用する「医薬上許容される塩」という用語は、本明細書で特定するオリゴヌクレオチドの望ましい生物学的活性を保持して、望ましくない毒性効果はごくわずかし示さない塩を指す。そのような塩の限定でない例は有機アミノ酸で形成させることができ、また、例えば亜鉛、カルシウム、ビスマス、バリウム、マグネシウム、アルミニウム、銅、コバルト、ニッケル、カドミウム、ナトリウム、カリウムなどの金属カチオン、またはアンモニア、N,N-ジベンジルエチレン-ジアミン、D-グルコサミン、テトラエチルアンモニウム、もしくはエチレンジアミンから形成されるカチオンを使って形成される塩基付加塩であることができる。

40

【0214】

本発明のある実施形態では、オリゴヌクレオチドが、プロドラッグの形態をとりうる。オリゴヌクレオチドは、本質的に陰性荷電イオンである。細胞膜の親油性ゆえに、オリゴヌクレオチドの細胞取り込みは、相当する中性または親水性の物質と比較すると低下する。この極性「障害(hindrance)」は、プロドラッグアプローチを使って回避することができる(例えばCrooke, R. M. (1998) in Crooke, S. T. 「Antisense research and Application」Springer-Verlag、ドイツ・ベルリン、vol. 131, pp. 103-140を参照されたい)。

50

【0215】

医薬上許容される結合剤およびアジュバントは、製剤された薬の一部を構成しうる。

【0216】

本明細書に記載する治療剤を送達するための送達方法の例、ならびに医薬製剤、塩の詳細は、どこか他に、例えば参照により本明細書に組み込まれる米国仮特許出願第60/838,710号および同第60/788,995号、ならびにやはり参照により本明細書に組み込まれるデンマーク出願PA 2006 00615に詳しく記載されるだろう。

【0217】

本発明の医薬組成物には、溶液剤、乳剤、およびリポソーム含有製剤が含まれるが、これらに限るわけではない。これらの組成物は、既製の液体、自己乳化性固体、および自己乳化性半固体を含む（ただしこれらに限るわけではない）、さまざまな構成要素から調製することができる。腫瘍組織への薬の送達は、カチオン性リポソーム、シクロデキストリン、ポリフィリン誘導体、分岐鎖デンドリマー、ポリエチレンイミンポリマー、ナノ粒子およびマイクロスフェアを含む（ただしこれらに限るわけではない）担体を介した送達によって強化されうる（Dass CR. J Pharm Pharmacol 2002; 54(1):3-27）。本発明の医薬組成物は、単位剤形で好都合に提示することができ、医薬産業においてよく知られる従来の技法に従って製造することができる。そのような技法には、活性成分を医薬担体または賦形剤と混合するステップが含まれる。一般に、製剤は、活性成分を液状担体もしくは微細な固形担体またはその両方と均一かつ緊密に混合した後、必要であれば、その生成物を付形することによって製造される。本発明の組成物は、例えば限定するわけではないが、錠剤、カプセル剤、ゲルカプセル剤、液状シロップ剤、ソフトゲル剤および坐剤など、数多くの考えうる剤形のどれにでも製剤することができる。本発明の組成物は、水性、非水性または混合溶媒中の懸濁剤として製剤することもできる。水性懸濁剤は、その懸濁液の粘度を増加させる物質、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールおよび/またはデキストランなどをさらに含有しうる。懸濁剤は安定剤も含有しうる。本発明の化合物は、活性薬物、例えばアスピリン、イブプロフェン、サルファ剤、抗糖尿病薬、抗細菌剤または抗生物質にコンジュゲートすることもできる。

【0218】

もう一つの実施形態では、本発明の組成物が、第1のマイクロRNAにターゲティングされる1つ以上のオリゴヌクレオチド化合物と、第2のマイクロRNAターゲットにターゲティングされる1つ以上の追加オリゴヌクレオチド化合物とを含有しうる。2つ以上の組み合わせられた化合物は、一緒にまたは逐次的に使用することができる。

【0219】

本明細書に開示する化合物は、上に示したとおり、いくつかの治療的応用に役立つ。一般に、本発明の治療方法には、哺乳動物、特にヒトへの、治療有効量のオリゴヌクレオチドの投与が含まれる。ある特定の実施形態において、本発明は（a）1つ以上の本発明の化合物と（b）1つ以上の化学療法剤とを含有する医薬組成物を提供する。本発明の化合物と共に使用する場合、そのような化学療法剤は、個別に、逐次的に、または1つ以上の他の同様の化学療法剤と組み合わせ、または放射線療法と組み合わせ使用することができる。当業者に知られている化学療法剤はすべて、本発明の化合物との併用処置として、ここに組み込まれる。他の活性剤、例えば抗炎症薬（非ステロイド系抗炎症薬およびコルチコステロイドを含むが、これらに限るわけではない）、抗ウイルス薬、および免疫調整薬も、本発明の組成物で組み合わせることができる。2つ以上の組み合わせられた化合物は、一緒にまたは逐次的に使用することができる。

【0220】

本発明の医薬組成物で処置しうる治療的適応の例を以下に挙げる。

10

20

30

40

【表 1】

マイクロRNA	考えうる医学的適応	
miR-1	心不整脈	
miR-21	膠芽腫、乳がん、肝細胞癌、直腸結腸がん、細胞毒性薬に対する神経膠腫の感受性、心肥大	
miR-21、miR-200bおよびmiR-141	化学療法に対する応答および胆管癌成長の調節	
miR-122	高コレステロール血症、C型肝炎感染、ヘモクロマトーシス	
miR-19b	リンパ腫および他の腫瘍タイプ	10
miR-26a	ヒト幹細胞の骨芽細胞分化	
miR-155	リンパ腫、膝腫瘍発生、乳がんおよび肺がん	
miR-203	乾癬	
miR-375	糖尿病、代謝障害、膵臓内分泌細胞からのグルコース誘発インスリン分泌	
miR-181	筋芽細胞分化、自己免疫障害	
miR-10b	乳がん細胞の浸潤および転移	
miR-125b-1	乳がん、肺がん、卵巣がんおよび子宮頸がん	
miR-221および222	前立腺癌、ヒト甲状腺乳頭状癌、ヒト肝細胞癌	
miRNA-372および-373	精巣胚細胞性腫瘍	
miR-142	B細胞白血病	20
miR-17-19bクラスター	B細胞性リンパ腫、肺がん、肝細胞癌	

【0221】

腫瘍抑制遺伝子トロポミオシン (tropomyosin) 1 (TPM1) mRNAは、miR-21のターゲットであることが示されている。ミオトロフィン (mtpn) mRNAはmiR 375のターゲットであることが示されている。

【0222】

さらなる一態様において、本発明は、アテローム性動脈硬化、高コレステロール血症および高脂質血症；がん、膠芽腫、乳がん、リンパ腫、肺がん；糖尿病、代謝障害；筋芽細胞分化；免疫障害からなる群より選択される疾患を処置するための医薬を製造するための、本発明のオリゴヌクレオチドの使用に関する。

【0223】

本発明はさらに、アテローム性動脈硬化、高コレステロール血症および高脂質血症；がん、膠芽腫、乳がん、リンパ腫、肺がん；糖尿病、代謝障害；筋芽細胞分化；免疫障害からなる群より選択される疾患の処置に使用するための、本発明のオリゴヌクレオチドに向けられる。

【0224】

本発明は、アテローム性動脈硬化、高コレステロール血症および高脂質血症；がん、膠芽腫、乳がん、リンパ腫、肺がん；糖尿病、代謝障害；筋芽細胞分化；免疫障害からなる群より選択される疾患または状態を患っている対象を処置する方法であって、その必要がある対象に、本発明のオリゴヌクレオチドまたは医薬組成物を投与するステップを含む方法を提供する。

【0225】

本発明はさらに、本発明の医薬組成物と、VLDLアセンブリー経路の阻害剤、例えばApoB阻害剤、またはMTP阻害剤である第2の独立した活性成分とを含むキットを提供する。

【0226】

(がん)

さらにもう一つの態様において、本発明は、がんを処置するための医薬を製造するための、本発明のオリゴヌクレオチドの使用に関する。もう一つの態様において、本発明は、

10

20

30

40

50

がんを処置または予防するための方法であって、本発明のオリゴヌクレオチドまたは本発明の医薬組成物を、その必要がある患者に投与することを含む方法に関する。

【0227】

そのようながんには、リンパ細網性新生物、リンパ芽球性白血病、脳腫瘍、胃腫瘍、形質細胞腫、多発性骨髄腫、白血病、結合組織腫瘍、リンパ腫、および固形腫瘍を含めることができる。

【0228】

がんを処置するための医薬を製造するための、本発明の化合物の使用において、そのがんは、好適には、固形腫瘍の形態をとりうる。同様に、本明細書に開示するがんを処置するための方法では、そのがんが、好適には、固形腫瘍の形態をとりうる。

10

【0229】

さらにまた、前記がんは、好適には、癌である。癌は、典型的には、悪性黒色腫、基底細胞癌、卵巣癌、乳癌、非小細胞肺癌、腎細胞癌、膀胱癌、再発表在性膀胱がん、胃癌、前立腺癌、膵癌、肺癌、子宮頸癌、子宮頸部異形成、咽頭乳頭腫症、大腸癌、結腸直腸癌およびカルチノイド腫瘍からなる群より選択される。より典型的には、前記癌は、悪性黒色腫、非小細胞肺癌、乳癌、大腸癌および腎細胞癌からなる群より選択される。悪性黒色腫は、典型的には、表在性拡大型黒色腫、結節型黒色腫、悪性黒子型黒色腫、肢端黒色腫、メラニン欠乏性黒色腫および線維形成性黒色腫からなる群より選択される。

【0230】

あるいは、がんは、好適には、肉腫であることもできる。肉腫は、典型的には、骨肉腫、ユーイング肉腫、軟骨肉腫、悪性線維性組織球腫、線維肉腫およびカボジ肉腫からなる群より選択される形態をとる。

20

【0231】

あるいは、がんは、好適には、神経膠腫であることもできる。

【0232】

さらにもう一つの実施形態は、がんを処置するための医薬を製造するための、本発明のオリゴヌクレオチドの使用であって、前記医薬がさらに、副腎皮質ステロイド、例えばプレドニゾン、デキサメタゾンまたはデカドロン；アルトレタミン（ヘキサレン、ヘキサメチルメラミン（HMM））；アミフォスチン（エチオール）；アミノグルテチミド（シタドレン）；アムサクリン（M-AMSA）；アナストロゾール（アリミデックス）；アンドロゲン、例えばテストステロン；アスパラギナーゼ（エルスパー（elspar））；カルメット-ゲラン菌；ピカルタミド（カソデックス）；プレオマイシン（プレノキサソ）；プスルファン（ミレラン）；カルボプラチン（パラプラチン）；カルムスチン（BCNU、BiCNU）；クロラムブシル（リューケラン（leukeran））；クロロデオキシアデノシン（2-CDA、クラドリピン、ロイスタチン）；シスプラチン（プラチノール）；シトシンアラビノシド（シタラピン）；ダカルバジン（DTIC）；ダクチノマイシン（アクチノマイシン-D、コスメゲン）；ダウノルビシン（セルビジン（cerubidine））；ドセタキセル（タキソテール）；ドキソルビシン（アドリアマイシン（adriamycin））；エピルビシン；エストラムスチン（エムサイト（emcyt））；エストロゲン、例えばジエチルstilbestrol（DES）；エトポシド（etoposide）（VP-16、VePesid、エトポホス）；フルダラビン（フルダラ）；フルタミド（ユーレキシン（eulexin））；5-FUDR（フロクスウリジン）；5-フルオロウラシル（5-FU）；ゲムシタピン（ジェムザール）；ゴセレリン（ゾダレックス（zodalex））；ハーセプチン（トラスツズマブ）；ヒドロキシ尿素（ハイドレア）；イダルビシン（イダマイシン）；イホスファミド；IL-2（プロリユキ、アルデスロイキン）；インターフェロン・アルファ（イントロンA、ロフェロンA）；イリノテカン（カンプトサル）；ロイプロリド（ルプロン）；レバミソール（エルガミゾール（ergamisole））；ロムスチン（CCNU）；メクロレタミン（mechlorothamine）（マスタージェン（mustargen）、ナイトロジェンマスタード）；メルファラン（アルケラン）；メルカプトプリン（プリネトール、6-MP）；メトトレキサート（メキセート）；マイトマイシン-C（ムタマイシン（mutamucin））；ミトキサントロン（ノバントロン）；オクトレオチド（サンドスタチン

30

40

50

); ペントスタチン (2-デオキシコホルマイシン、ニペント); プリカマイシン (ミトラマイシン、ミトラシン); プロカルバジン (prorocarbazine) (マチュレン (matulane)); ストレプトゾシン; タモキシフェン (ノルバデックス); タキソール (パクリタキセル); テニポシド (ビュウモン、VM-26); チオテパ; トポテカン (ハイカムチン); トレチノイン (ベサノイド、全トランス型レチノイン酸); ビンブラスチン (バルバン); ピンクリスチン (オンコピン) および ビノレルピン (ナベルピン) からなる群より選択される化学療法剤を含むものに向けられる。好適には、さらなる化学療法剤が、タキサン類、例えばタキソール、パクリタキセルまたはドセタキセルから選択される。

【0233】

同様に、本発明はさらに、がんを処置するための医薬を製造するための、本発明のオリゴヌクレオチドの使用であって、前記処置が、副腎皮質ステロイド、例えばプレドニゾン、デキサメタゾンまたはデカドロン; アルトレタミン (ヘキサレン、ヘキサメチルメラミン (HMM)); アミフォスチン (エチオール); アミノグルテチミド (シタドレン); アムサクリン (M-AMSA); アナストロゾール (アリミデックス); アンドロゲン、例えばテストステロン; アスパラギナーゼ (エルスパー); カルメット-ゲラン菌; ビカルタミド (カソデックス); プレオマイシン (プレノキサ); プスルファン (ミレラン); カルボプラチン (パラプラチン); カルムスチン (BCNU、BiCNU); クロラムブシル (リユーケラン); クロロデオキシアデノシン (2-CDA、クラドリピン、ロイスタチン); シスプラチン (プラチノール); シトシンアラビノシド (シタラピン); ダカルバジン (DTIC); ダクチノマイシン (アクチノマイシン-D、コスメゲン); ダウノルビシン (セルビジン); ドセタキセル (タキソテール); ドキソルビシン (アドリアマイシン); エピルビシン; エストラムスチン (エムサイト); エストロゲン、例えばジエチルstilbestrol (DES); エトポシド (VP-16、VePesid、エトポホス); フルダラピン (フルダラ); フルタミド (ユーレキシ); 5-FUDR (フロクスウリジン); 5-フルオロウラシル (5-FU); ゲムシタピン (ジェムザール); ゴセレリン (ゾダレックス); ハーセプチン (トラスツズマブ); ヒドロキシ尿素 (ハイドレア); イダルビシン (イダマイシン); イホスファミド; IL-2 (プロリユーキン、アルデスロイキン); インターフェロン・アルファ (イントロンA、ロフェロンA); イリノテカン (カンプトサル); ロイプロリド (ルプロン); レバミソール (エルガミゾール); ロムスチン (CCNU); メクロレタミン (マスタージェン、ナイトロジェンマスタード); メルファラン (アルケラン); メルカプトプリン (プリネトール、6-MP); メトトレキサート (メキセート); マイトマイシン-C (ムタマイシン); ミトキサントロン (ノバントロン); オクトレオチド (サンドスタチン); ペントスタチン (2-デオキシコホルマイシン、ニペント); プリカマイシン (ミトラマイシン、ミトラシン); プロカルバジン (マチュレン); ストレプトゾシン; タモキシフェン (ノルバデックス); タキソール (パクリタキセル); テニポシド (ビュウモン、VM-26); チオテパ; トポテカン (ハイカムチン); トレチノイン (ベサノイド、全トランス型レチノイン酸); ビンブラスチン (バルバン); ピンクリスチン (オンコピン) および ビノレルピン (ナベルピン) からなる群より選択されるさらなる化学療法剤の投与を、さらに含むものに向けられる。好適には、前記処置は、タキサン類、例えばタキソール、パクリタキセルまたはドセタキセルから選択されるさらなる化学療法剤の投与を、さらに含む。

【0234】

言い換えると、本発明はさらに、癌を処置するための方法であって、本発明のオリゴヌクレオチドまたは本発明の医薬組成物をその必要がある患者に投与することを含み、さらなる化学療法剤の投与も含む方法に向けられる。前記さらなる投与は、さらなる化学療法剤が、本発明の化合物にコンジュゲートされるか、本医薬組成物中に存在するか、または別個の製剤として投与されるような投与であることができる。

【0235】

(感染性疾患)

本発明の化合物は、広範囲にわたる感染性疾患、例えばジフテリア、破傷風、百日咳、

10

20

30

40

50

ポリオ、B型肝炎、C型肝炎、インフルエンザ菌 (hemophilus influenza)、麻疹、ムンプス、および風疹に、広く適用可能であるだろう。

【0236】

hsa-miR122はC型肝炎感染において示されるので、miR-122をターゲットとする本発明のオリゴヌクレオチドはC型肝炎感染を処置するために使用することができる。

【0237】

したがって、さらにもう一つの態様において、本発明は、感染性疾患を処置するための医薬を製造するための、本発明のオリゴヌクレオチドの使用に関すると共に、感染性疾患を処置するための方法であって、本発明のオリゴヌクレオチドまたは本発明の医薬組成物をその必要がある患者に投与することを含む方法に関する。

10

【0238】

ある好ましい実施形態において、本発明は、抗miR-122オリゴマーをVLDLアセンブリーの阻害剤、例えばapoBまたはMTPの阻害剤と組み合わせて投与する併用処置を提供する。

【0239】

(炎症性疾患)

炎症応答は、感染性因子の攻撃に対する生物の基本的防御機構であり、自己免疫障害を含む多くの急性および慢性疾患の病理発生にも関連づけられている。病原体と闘うことが必要とされているにもかかわらず、炎症バースト (inflammatory burst) の効果は壊滅的になる場合がある。したがって、抗炎症薬の使用により炎症の総体的症状を制限することがしばしば必要になる。炎症は、通常は組織損傷によってトリガーされる、複雑なプロセスであり、このプロセスには、数多くの一連の酵素の活性化、血管透過性の増大および血液 (blood fluids) の血管外遊出、細胞移動および化学伝達物質の放出が含まれ、これらはすべて、損傷した組織の破壊と修復の両方を目的としている。

20

【0240】

さらにもう一つの態様において、本発明は、炎症性疾患を処置するための医薬を製造するための、本発明のオリゴヌクレオチドの使用に関すると共に、炎症性疾患を処置するための方法であって、本発明のオリゴヌクレオチドまたは本発明の医薬組成物をその必要がある患者に投与することを含む方法に関する。

【0241】

本発明の好ましい一実施態様では、炎症性疾患が、リウマチ疾患および/または結合組織疾患、例えば慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス (SLE) もしくは狼瘡、強皮症、多発性筋炎、炎症性腸疾患、皮膚筋炎、潰瘍性大腸炎、クローン病、血管炎、乾癬性関節炎、剥脱性乾癬性皮膚炎、尋常性天疱瘡およびシェーグレン症候群、特に炎症性腸疾患およびクローン病である。

30

【0242】

あるいは、炎症性疾患は、滑液包炎、滑膜炎、被膜炎、腱炎、および/または外傷性および/またはスポーツ性 (sportive) の他の炎症性病変のような、非リウマチ性炎症であってもよい。

【0243】

(代謝性疾患)

代謝性疾患は、体内で自然に産生される化学物質の蓄積によって引き起こされる障害である。これらの疾患は、通常、深刻であり、生死に関わるものさえある。他にも、身体発育を遅らせたり、精神遅滞を引き起こすものがある。これらの障害を持つ乳幼児の大半は、最初は、明白な疾患の徴候を示さない。これらの問題は、多くの場合、適正な出生時スクリーニングによって発見することができる。早期診断および早期処置によって、代謝性疾患は効果的に管理できることが多い。

40

【0244】

さらにもう一つの態様において、本発明は、代謝性疾患を処置するための医薬を製造するための、本発明のオリゴヌクレオチドまたはそのコンジュゲートの使用に関すると共に、代謝性疾患を処置するための方法であって、本発明のオリゴヌクレオチドもしくはその

50

コンジュゲートまたは本発明の医薬組成物をその必要がある患者に投与することを含む方法に関する。

【0245】

本発明の好ましい一実施形態では、代謝性疾患が、アミロイドーシス、ビオチニダーゼ、OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)、クリグラー-ナジャー症候群、糖尿病、ファブリ病支援情報グループ (Fabry Support & Information Group)、脂肪酸酸化障害、ガラクトース血症、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PD) 欠損症、グルタル酸尿症、国際グルタル酸血症機構 (International Organization of Glutaric Acidemia)、グルタル酸血症I型、グルタル酸血症II型、グルタル酸血症I型、グルタル酸血症II型、F-HYPDRR - 家族性低リン酸血症、ビタミンD抵抗性くる病、クラッペ病、長鎖3-ヒドロキシアシルCoAデヒドロゲナーゼ欠損症 (LCHAD)、マンノシドーシス群、メープルシロップ尿症、ミトコンドリア障害、ムコ多糖症候群：ニーマンピック病、有機酸血症、PKU、ポンペ病、ポルフィリン症、メタボリック症候群、高脂質血症および遺伝性脂質障害、トリメチルアミン尿症：漁臭症候群、および尿素回路障害からなる群より選択される。

10

【0246】

(肝臓障害)

さらにもう一つの態様において、本発明は、肝臓障害を処置するための医薬を製造するための、本発明のオリゴヌクレオチドまたはそのコンジュゲートの使用に関すると共に、肝臓障害を処置するための方法であって、本発明のオリゴヌクレオチドもしくはそのコンジュゲート、または本発明の医薬組成物をその必要がある患者に投与することを含む方法

20

【0247】

本発明の好ましい一実施形態では、肝臓障害が、胆道閉鎖症、アラジール症候群、 α -1アンチトリプシン、チロシン血症、新生児肝炎、およびウィルソン病からなる群より選択される。

【0248】

(他の用途)

本発明のオリゴヌクレオチドは、診断、治療および予防のための研究試薬として利用することができる。研究では、細胞および実験動物におけるターゲット遺伝子の合成を特異的に阻害し、それによってそのターゲットの機能解析を容易にするために、または治療的介入のターゲットとしてのその有用性の査定を容易にするために、本オリゴヌクレオチドを使用することができる。診断においては、ノーザンブロット法、インサイチュールハイブリダイゼーションまたは同様の技法によって細胞および組織におけるターゲット発現を検出し定量するために、本オリゴヌクレオチドを使用することができる。治療においては、ターゲットの発現を調整することによって処置することができる疾患または障害を持つと疑われる動物またはヒトが、本発明に従ってオリゴヌクレオチド化合物を投与することによって処置される。さらに、ターゲットの発現に関連する疾患または状態を持つと疑われる、またはそのような疾患または状態に陥りやすいと疑われる、動物、特にマウスおよびラット、ならびにヒトを、治療的または予防的に有効な量の1つ以上の本発明のオリゴヌクレオチド化合物または組成物を投与することによって処置する方法も提供される。

30

40

【0249】

(miR-122aをターゲットとするオリゴヌクレオチドの治療的使用)

本発明者らは、miR-122aをターゲットとするLNA-アンチmiRが、血漿中コレステロールレベルを低下させることを証明した。それゆえ、本発明のもう一つの態様は、miR-122aをターゲットとする上記オリゴヌクレオチドの医薬品としての使用である。

【0250】

本発明のさらにもう一つの態様は、増加した血漿中コレステロールレベル (または高コレステロール血症および関連障害) を処置するための医薬を製造するための、miR-122aをターゲットとする上記オリゴヌクレオチドの使用である。増加した血漿中コレステロールレベルはさまざまな状態、例えばアテローム性動脈硬化のリスクを増加させるので、それ

50

が望ましくないことは、当業者には理解されるだろう。

【0251】

本発明のさらにもう一つの態様は、Nrdg3、Aldo A、BckdkまたはCD320のmRNAレベルをアップレギュレートするための、miR-122aをターゲットとする上記オリゴヌクレオチドの使用である。

【0252】

(実施形態)

本発明の以下の実施形態は、本明細書に記載する他の実施形態と組み合わせて使用することができる。

【0253】

1. 6~12ヌクレオチド長のオリゴマー、ここで、前記オリゴマーは全部で6~12ヌクレオチド単位、例えば6、7、8、9、10、11または12ヌクレオチド単位の連続ヌクレオチド配列を含み、オリゴマーの核酸塩基単位の少なくとも50%は高アフィニティーヌクレオチド類似体単位である、と、医薬上許容される希釈剤、担体、塩またはアジュバントとを含む医薬組成物。

10

【0254】

2. 連続ヌクレオチド配列が、哺乳動物、ヒトまたはウイルスのマイクロRNA(miRNA)配列の対応する領域に相補的である、実施形態1の医薬組成物。

【0255】

3. 連続ヌクレオチド配列が、表3、4または5のいずれか一つに列挙するmRNAの群から選択されるmiRNA配列の対応する領域に相補的である、実施形態2の医薬組成物。

20

【0256】

4. 連続ヌクレオチド配列が前記マイクロRNAのシード配列に相補的な配列からなる、または、それを含む、実施形態2または3の医薬組成物。

【0257】

5. 連続ヌクレオチド配列が、表3または4に列挙する配列のいずれか一つから選択される配列からなる、または、それを含む、実施形態2~4のいずれか一つの医薬組成物。

【0258】

6. シードマーの3'核酸塩基が、連続ヌクレオチド配列の最も3'側の核酸塩基を形成し、ここで、連続ヌクレオチド配列は、場合によっては、1個または2個のさらなる5'核酸塩基を含んでもよい、実施形態4または5の医薬組成物。

30

【0259】

7. 前記連続ヌクレオチド配列が、5'端から数えてマイクロRNA配列中に存在する1番目のヌクレオチドに対応するヌクレオチドを含まない、実施形態1~6のいずれか一つの医薬組成物。

【0260】

8. 連続ヌクレオチド配列が、表3または4または5に示すものから選択されるmiRNA中に存在する、対応するヌクレオチド配列に相補的である、実施形態1~7のいずれか一つの医薬組成物。

【0261】

9. 前記miRNAが、miR-1、miR-10b、miR-17-3p、miR-18、miR-19a、miR-19b、miR-20、miR-21、miR-34a、miR-93、miR-106a、miR-106b、miR-122、miR-133、miR-134、miR-138、miR-155、miR-192、miR-194、miR-221、miR-222、およびmiR-375からなる群より選択される、実施形態8の医薬組成物。

40

【0262】

10. 連続ヌクレオチド配列の核酸塩基単位の少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはすべてがヌクレオチド類似体単位である、実施形態1~9のいずれか一つの医薬組成物。

【0263】

11. ヌクレオチド類似体単位が、2'-O-アルキル-RNA単位、2'-OMe-RNA単位、2'-アミノ

50

-DNA単位、2'-フルオロ-DNA単位、LNA単位、PNA単位、HNA単位、INA単位、および2'MOE RNA単位からなる群より選択される、実施形態10の医薬組成物。

【0264】

12. 連続ヌクレオチド配列の核酸塩基単位の少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはすべてがロック核酸(LNA)核酸塩基単位である、実施形態10または11の医薬組成物。

【0265】

13. 連続ヌクレオチド配列の核酸塩基単位のすべてがLNA核酸塩基単位である、実施形態12の医薬組成物。

【0266】

14. 連続ヌクレオチド配列が7、8、9または10個の、好ましくは連続した、LNA核酸塩基単位を含む、または、それからなる、実施形態1~13のいずれか一つの医薬組成物。

【0267】

15. オリゴマーが7、8、9または10個の連続核酸塩基単位からなり、少なくとも7個の核酸塩基単位がヌクレオチド類似体単位である、実施形態1~14のいずれか一つの医薬組成物。

【0268】

16. ヌクレオチド類似体単位がロック核酸(LNA)核酸塩基単位である、実施形態15の医薬組成物。

【0269】

17. 分子中のヌクレオチド類似体単位が少なくとも50%のLNA単位と50%までの他のヌクレオチド類似体単位との混合物からなる、実施形態15の医薬組成物。

【0270】

18. 連続ヌクレオチド配列の核酸塩基単位間に存在するヌクレオシド間結合の少なくとも75%、例えば80%または85%または90%または95%またはすべてが、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、実施形態1~17のいずれか一つの医薬組成物。

【0271】

19. 前記オリゴマーが1つ以上の非核酸塩基化合物とコンジュゲートされる、実施形態1~18のいずれか一つの医薬組成物。

【0272】

20. 連続ヌクレオチド配列が、少なくとも2個のmiRNA配列、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のmiRNA配列の、対応する配列に相補的である、実施形態1~19のいずれか一つの医薬組成物。

【0273】

21. 連続ヌクレオチド配列が、少なくとも2個のmiRNAシード領域配列、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のmiRNAシード領域配列の配列に相補的である配列からなる、または、から構成される、実施形態1~20のいずれか一つの医薬組成物。

【0274】

22. 連続ヌクレオチド配列がmiR-221とmiR-222の両方の対応する領域に相補的である、実施形態20または21のいずれか一つの医薬組成物。

【0275】

23. 連続ヌクレオチド配列が、5'GCUACAU3'に相補的な配列からなる、または、から構成される、実施形態22の医薬組成物。

【0276】

24. オリゴマーがプロドラッグとして構成される、実施形態1~23のいずれか一つの医薬組成物。

【0277】

25. 連続ヌクレオチド配列がhas-miR-122の対応する領域に相補的である、実施形態1~24のいずれか一つの医薬組成物。

【0278】

10

20

30

40

50

26. C型肝炎ウイルス感染ならびに高コレステロール血症および関連障害からなる群より選択される医学的障害または疾患の処置に使用するための、実施形態25の医薬組成物。

【0279】

27. 組成物が、VLDLアセンブリー経路の阻害剤、例えばApoB阻害剤、またはMTP阻害剤である、第2の独立した活性成分をさらに含む、実施形態25または26の医薬組成物。

【0280】

28. 実施形態25または26の医薬組成物と、VLDLアセンブリー経路の阻害剤、例えばApoB阻害剤、またはMTP阻害剤である第2の独立した活性成分とを含むキット。

【0281】

29. マイクロRNAの存在または過剰発現と関連する疾患または医学的障害を処置するための方法であって、実施形態1~28のいずれか一つの医薬組成物を、前記疾患または医学的障害を患っている、または患いそうな、患者に投与することを含む方法。

10

【0282】

30. 実施形態1~25のいずれか一つに記載されているオリゴマー。

【0283】

31. 実施形態30のオリゴマーと、少なくとも1つの非核酸塩基化合物とを含むコンジュゲート。

【0284】

32. マイクロRNAの存在または過剰発現に関連する疾患または医学的障害を処置するための医薬を製造するための、実施形態30~31のいずれか一つに記載されているオリゴマーまたはコンジュゲートの使用。

20

【0285】

33. 細胞におけるmiRNAの量または有効量を減少させるための方法であって、上記実施形態のいずれか一つのオリゴマー、コンジュゲートまたは医薬組成物を、前記miRNAを発現させている細胞に、その細胞におけるそのmiRNAの量または有効量が減少するように投与することを含む方法。

【0286】

34. ある細胞においてあるmiRNAによってその発現が抑制されるmRNAを抑制解除するための方法であって、上記実施形態のいずれか一つのオリゴマー、コンジュゲートまたは医薬組成物を、前記mRNAと前記miRNAの両方を発現させる細胞に、そのmRNAの発現が抑制解除されるように投与することを含む方法。

30

【0287】

(参考文献) 参考文献の詳細は優先権文書に記載されている。

【0288】

(実施例)

LNAモノマーおよびオリゴヌクレオチド合成は、WO2007/112754の実施例1および2で言及されている方法を使って行なった。ヒトまたはラット血漿におけるLNAオリゴヌクレオチドの安定性は、WO2007/112754の実施例4で言及されている方法を使って測定される。LNAアンチmiRアンチセンスオリゴヌクレオチド(miR-122をターゲットとするもの)によるインビトロ細胞の処置は、WO2007/112754の実施例6で言及されている方法を使って行なわれる。マイクロRNA特異的定量PCRによるmiR発現のオリゴヌクレオチド阻害の解析は、インビトロモデルでもインビボモデルでも、WO2007/112754の実施例7で言及されている方法を使って行なわれる。miRNAマイクロアレイ発現プロファイリングを使ったLNAアンチmirノックダウン特異性の評価は、WO2007/112754の実施例8で言及されている方法を使って行なわれる。インサイチューハイブリダイゼーションによるマイクロRNAの検出は、WO2007/112754の実施例9で言及されている方法を使って行なわれる。単離およびmRNA発現の解析(mRNA解析のための全RNA単離およびcDNA合成)は、インビトロモデルでもインビボモデルでも、WO2007/112754の実施例10で言及されている方法を使って行なわれる。マイクロRNA-122をターゲットとする本発明のオリゴマーを使ったインビボ実験と、その後の解析は、WO2007/112754の実施例11~27に開示されている方法を使って行なわれる。上で言及したWO2

40

50

007/112754の実施例は、特に、参照により本明細書に組み込まれる。

【実施例 1】

【0289】

LNAアンチmiRオリゴヌクレオチドのデザインおよび融解温度

(表2) - 実施例および図面で使用されるオリゴマー。SEQ#は、実施例および図面の全体を通して使用される識別子である。配列表で使用される配列番号も記載する。

【表2 - 1】

実施例/図面SEQ#	配列番号	化合物配列	コメント
#3204	1	TcAGtCTGaTaAgC T	
#3205	2	GATAAGCT	
#3206	3	TcAcAATtaGCAtT A	
#3207	4	TAGCATT	
#4	5	CcAttGTcaCaCtCC	
#3208	6	CACACTCC	
#3209	7	TAAGCT	
#3210	8	ATAAGCT	
#3211	9	TGATAAGCT	
#3212	10	CTGATAAGCT	
#3213	11	GTCTGATAAGCT	
#2114	12	CAGTCTGATAAG CT	
#3215	13	TCTGATAA	
#3216	14	ATCAGTCT	
#3217	15	TCAACATC	
#3218/#3230	16	GGTAA <u>ACT</u>	下線部 = ミスマッチ
#3219	17	<u>CGTAATGA</u>	下線部 = ミスマッチ
#3220	18	TCAgctgataaGCTa	5'蛍光ラベル (FAM)
#3221	19	AGCACTTT	
#3222	20	ATTTGCAC	

10

20

30

40

【表 2 - 2】

#3223	21	AgCagACaaTgTaG C	5'蛍光ラベル (FAM)
#3224	22	GtAgcCagaTgTaGC	5'蛍光ラベル (FAM)
#3225	23	ATGTAGC	
#3226	24	ACaAcCTacTaCcT C	
#3227	25	ACTACCTC	
#3228	26	CaCtgTCagCaCtTT	
#3229	27	TgCatAGatTtGcAC	
#3231	28	GTAGACT	
#3232	29	TACCTC	
#3233	30	CTACCTC	
#3234	31	TNCTACCTC	N=ユニバーサル塩基
#3235	32	TNCTACCTC	N=ユニバーサル塩基
#3236	33	GCaAcCTacTaCcT C	
#3237	34	ACaAcCTccTaCcT C	
#3238	35	ACaAaCTacTaCcT C	
#3239	36	CTACCTC	
#3240	37	CTAACTC	
#3241	38	TTAGCATTA	
#3242	39	CGATTAGCATTA	
#3243	977	CACGATTAGCATT A	
#3244	978	GCATTA	
#3245	979	AGCATTA	
#3246	980	ATTAGCATTA	

10

20

大文字および小文字はそれぞれLNAおよびDNAを表す。

LNAシトシンは、好ましくは、メチルシトシン/5'メチル-シトシン^{*}である。

ヌクレオシド間結合はすべて、好ましくはホスホロチオエート^{*}である。

LNAはすべて、例えば -D-オキシLNA^{*}であることができる。

30

^{*} 特定の実施例で使用。

【実施例 2】

【0290】

インビトロモデル：細胞培養

ターゲット核酸発現（量）に対するLNAオリゴヌクレオチドの影響は、ターゲット核酸が測定可能なレベルで存在する限り、さまざまな細胞タイプのどれにおいても試験することができる。ターゲットは、内在性に発現されるか、前記核酸をコードする核酸の一過性または安定トランスフェクションによって発現される。

【0291】

ターゲット核酸の発現レベルは、例えばノーザンプロット解析（マイクロRNAノーザンを含む）、定量PCR（マイクロRNA qPCRを含む）、リボヌクレアーゼ保護アッセイなどを使って、定型的に決定することができる。以下の細胞タイプは例示であり、選択した細胞タイプ中でターゲットが発現される限り、他の細胞タイプも定型的に使用することができる。

40

【0292】

細胞は、以下に述べる適当な培地中で培養し、37℃、湿度95~98%および5%CO₂で維持した。細胞は通例、週に2~3回継代した。

【0293】

15PC3：ヒト前立腺がん細胞株15PC3はF. Baas博士（AMC神経感覚研究所（Neurozintuigen Laboratory）、オランダ）から寄贈され、DMEM（Sigma）+10%ウシ胎仔血清（FBS）+G

50

Iutamax I + ゲンタマイシンで培養した。

PC3: ヒト前立腺がん細胞株PC3はATCCから購入し、グルタミン (Gibco) + 10% FBS + ゲンタマイシンを含むF12 Coon's培地で培養した。

518A2: ヒト黒色腫がん細胞株518A2はB. Jansen博士 (ウィーン大学臨床薬理学科分子薬理学実験腫瘍学部門 (Section of experimental Oncology, Molecular Pharmacology, Department of Clinical Pharmacology, University of Vienna)) から寄贈され、DMEM (Sigma) + 10% ウシ胎仔血清 (FBS) + Glutamax I + ゲンタマイシンで培養した。

HeLa: 子宮頸癌細胞株HeLaは、10% ウシ胎仔血清およびゲンタマイシンを含有するMEM (Sigma) 中、37 °C、湿度95%および5% CO₂で培養した。

MPC-11: マウス多発性骨髄腫細胞株MPC-11はATCCから購入し、4mM Glutamax + 10% ウマ血清を含むDMEMで維持した。 10

DU-145: ヒト前立腺がん細胞株DU-145はATCCから購入し、Glutamax + 10% FBSを含むRPMIで維持した。

RCC-4+/-VHL: VHLを発現させるプラスミドまたは空プラスミドで安定にトランスフェクトされたヒト腎がん細胞株RCC4はECACCから購入し、製造者の指示に従って維持した。

786-0: ヒト腎細胞癌細胞株786-0はATCCから購入し、製造者の指示に従って維持した。

HUVEC: ヒト臍静脈内皮細胞株HUVECはCamrexから購入し、EGM-2培地で維持した。

K562: ヒト慢性骨髄性白血病細胞株K562はECACCから購入し、Glutamax + 10% FBSを含むRPMIで維持した。

U87MG: ヒト膠芽腫細胞株U87MGはATCCから購入し、製造者の指示に従って維持した。 20

B16: マウス黒色腫細胞株B16はATCCから購入し、製造者の指示に従って維持した。

LNCap: ヒト前立腺がん細胞株LNCapはATCCから購入し、Glutamax + 10% FBSを含むRPMIで維持した。

Huh-7: 10% FBS、2mM Glutamax I、1× 非必須アミノ酸、ゲンタマイシン25 µg/mlを含むイーグルMEMで培養されたヒト肝臓、上皮様。

L428: (Deutsche Sammlung fuer Mikroorganismen (DSM、ドイツ・ブラウンシュヴァイク)) : 10% FCS、L-グルタミンおよび抗生物質を補足したRPMI 1640で維持されたヒトB細胞リンパ腫。

L1236: (Deutsche Sammlung fuer Mikroorganismen (DSM、ドイツ・ブラウンシュヴァイク)) : 10% FCS、L-グルタミンおよび抗生物質を補足したRPMI 1640で維持されたヒトB細胞リンパ腫。 30

【実施例3】

【0294】

miRBaseマイクロRNAデータベース中のすべてのヒトマイクロRNA配列に対するLNAアンチmiRライブラリーのデザイン

使用したmiRBaseバージョンは、Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A., Enright, A.J. 2006 "miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature" Nucleic Acids Res. 34 : D140-4に報告されたバージョン12であり、<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>を通して利用することができる。

【0295】

表1は、miRBaseマイクロRNAデータベースによるマイクロRNAのシードマー配列を含む、7、8および9マーヌクレオチド配列を表す。シードマー配列はマイクロRNAシード領域の逆相補配列を含む。いくつかの実施形態では、本発明のオリゴマーが、これらの7マー、8マーまたは9マー配列から選択される連続ヌクレオチド配列を持つ。これらの7マー、8マーおよび9マー配列に関して、いくつかの実施形態では、ヌクレオチド間結合がすべてホスホロチオエートである。これらの7マー、8マーおよび9マーヌクレオチド配列は、本明細書に記載するヌクレオチド類似体 (例えばLNAヌクレオチド類似体) の配列からなりうる。LNAシトシンはメチル-シトシン (5'メチル-シトシン) であることができる。いくつかの実施形態では、LNAが -D-オキシ-LNAである。

【0296】

10

20

30

40

50

表3は、同じシードマーオリゴマー（例えば本明細書に記載の7、8または9マー（表1参照））によってターゲットとされうるものにグループ分けしたマイクロRNAの一覧表である。

（表3）

【表3 - 1】

hsa-let-7a*, hsa-let-7f-1*	
hsa-let-7a, hsa-let-7b, hsa-let-7c, hsa-let-7d, hsa-let-7f, hsa-miR-98, hsa-let-7g, hsa-let-7i	
hsa-miR-1, hsa-miR-206	
hsa-miR-103, hsa-miR-107	10
hsa-miR-10a, hsa-miR-10b	
hsa-miR-125b, hsa-miR-125a-5p	
hsa-miR-129*, hsa-miR-129-3p	
hsa-miR-130a, hsa-miR-301a, hsa-miR-130b, hsa-miR-454, hsa-miR-301b	
hsa-miR-133a, hsa-miR-133b	
hsa-miR-135a, hsa-miR-135b	
hsa-miR-141, hsa-miR-200a	
hsa-miR-146a, hsa-miR-146b-5p	
hsa-miR-152, hsa-miR-148b	
hsa-miR-154*, hsa-miR-487a	20
hsa-miR-15a, hsa-miR-16, hsa-miR-15b, hsa-miR-195, hsa-miR-497	
hsa-miR-17, hsa-miR-20a, hsa-miR-93, hsa-miR-106a, hsa-miR-106b, hsa-miR-20b, hsa-miR-526b*	
hsa-miR-181a, hsa-miR-181c	
hsa-miR-181b, hsa-miR-181d	
hsa-miR-18a, hsa-miR-18b	
hsa-miR-190, hsa-miR-190b	
hsa-miR-192, hsa-miR-215	
hsa-miR-196a, hsa-miR-196b	
hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-199b-3p	30
hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-199b-5p	
hsa-miR-19a*, hsa-miR-19b-1*, hsa-miR-19b-2*	
hsa-miR-19a, hsa-miR-19b	
hsa-miR-200b, hsa-miR-200c	
hsa-miR-204, hsa-miR-211	
hsa-miR-208a, hsa-miR-208b	
hsa-miR-212, hsa-miR-132	
hsa-miR-23a*, hsa-miR-23b*	
hsa-miR-23a, hsa-miR-23b, hsa-miR-130a*	
hsa-miR-24-1*, hsa-miR-24-2*	40
hsa-miR-25, hsa-miR-92a, hsa-miR-367, hsa-miR-92b	
hsa-miR-26a, hsa-miR-26b	
hsa-miR-26a-1*, hsa-miR-26a-2*	
hsa-miR-27a, hsa-miR-27b	
hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-29c	
hsa-miR-302a, hsa-miR-302b, hsa-miR-302c, hsa-miR-302d, hsa-miR-373, hsa-miR-520e, hsa-miR-520a-3p, hsa-miR-520b, hsa-miR-520c-3p, hsa-miR-520d-3p	
hsa-miR-302b*, hsa-miR-302d*	

【表 3 - 2】

hsa-miR-30a*, hsa-miR-30d*, hsa-miR-30e*
hsa-miR-30a, hsa-miR-30c, hsa-miR-30d, hsa-miR-30b, hsa-miR-30e
hsa-miR-330-5p, hsa-miR-326
hsa-miR-34a, hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-449a, hsa-miR-449b
hsa-miR-362-3p, hsa-miR-329
hsa-miR-374a, hsa-miR-374b
hsa-miR-376a, hsa-miR-376b
hsa-miR-378, hsa-miR-422a
hsa-miR-379*, hsa-miR-411*
hsa-miR-381, hsa-miR-300
hsa-miR-509-5p, hsa-miR-509-3-5p
hsa-miR-515-5p, hsa-miR-519e*
hsa-miR-516b*, hsa-miR-516a-3p
hsa-miR-517a, hsa-miR-517c
hsa-miR-518a-5p, hsa-miR-527
hsa-miR-518f, hsa-miR-518b, hsa-miR-518c, hsa-miR-518a-3p, hsa-miR-518d-3p
hsa-miR-519c-3p, hsa-miR-519b-3p, hsa-miR-519a
hsa-miR-519c-5p, hsa-miR-519b-5p, hsa-miR-523*, hsa-miR-518f*, hsa-miR-526a, hsa-miR-520c-5p, hsa-miR-518e*, hsa-miR-518d-5p, hsa-miR-522*, hsa-miR-519a* hsa-miR-519e, hsa-miR-33b*
hsa-miR-520a-5p, hsa-miR-525-5p
hsa-miR-520g, hsa-miR-520h
hsa-miR-524-5p, hsa-miR-520d-5p
hsa-miR-525-3p, hsa-miR-524-3p
hsa-miR-548b-5p, hsa-miR-548a-5p, hsa-miR-548c-5p, hsa-miR-548d-5p
hsa-miR-7-1*, hsa-miR-7-2*
hsa-miR-99a, hsa-miR-100, hsa-miR-99b

10

20

30

【 0 2 9 7 】

本発明者らは、完全にLNA修飾されホスホロチオレート化された、miR-21、miR-155およびmiR-122に対する8マーLNA-アンチmiR（本明細書では、これをマイクロmiR（micromiR）と呼ぶ）を構築した（図1および表6参照）。miR-21、miR-155およびmiR-122用のルシフェラーゼセンサープラスミドを使ったMCF-7、HeLa、RawおよびHuh-7細胞での反復実験から我々が得た結果は、完全にLNA修飾された短いLNA-アンチmiRが、マイクロRNAを極めて強力で拮抗することを証明している。

【 0 2 9 8 】

（表4）LNAアンチmiRおよびマイクロmiR配列ならびに予想 T_m

40

【表4】

SEQ ID #	マイクロRNA	配列	T _m (°C)
3204	miR-21	T c A G t C T G a T a A g C T	73
3205		G A T A A G C T	33
3206	miR-155	T c A c A A T t a G C A t T A	63
3207		T A G C A T T A	45
4	miR-122	C c A t t G T c a C a C t C C	73
3208		C A C A C T C C	62

10

大文字は -D-オキシLNAなどのLNA単位である。小文字はDNA単位である。ヌクレオシド間結合は好ましくはホスホロチオエートである。LNAシトシンはすべて、好ましくは、メチル化/5-メチルシトシンである。

【0299】

融解温度は、合成マイクロRNAオリゴヌクレオチド（典型的にはホスホジエステルバックボーンを持つRNAヌクレオチドからなるもの）を使って、成熟マイクロRNA配列に対して評価することができる。典型的に測定されるT_mは、RNAターゲットに対してLNAオリゴマーを使った場合、予想されるT_mよりも高い。

20

【実施例4】

【0300】

ルシフェラーゼセンサーアッセイを使った、MCF-7細胞における、SEQ ID #3205 LNA-アンチmiRによるmiR-21拮抗作用の評価

miR-21をターゲットとしてそれを拮抗する、完全にLNA修飾された8マーLNA-アンチmiR (SEQ ID #3205) の効率を評価するために、成熟miR-21用の完全マッチターゲット部位および対照としてシード内に2つの突然変異を持つターゲット部位を含有するルシフェラーゼセンサーコンストラクトを作製した(図6)。マイクロRNA-21阻害をモニターするために、乳癌細胞株MCF-7に、異なるルシフェラーゼコンストラクトを、さまざまな濃度のmiR-21アンタゴニストSEQ ID #3205と共にトランスフェクトし、miR-21に対する15マーLNA-アンチmiR SEQ ID #3204と比較した。24時間後に、ルシフェラーゼ活性を測定した。

30

【0301】

(結果) 図2に示すように、新しい完全にLNA修飾された8マーLNA-アンチmiR (SEQ ID #3205) は、ルシフェラーゼ活性の抑制解除によって示されるように、SEQ ID #3204と比較して2倍高い力価を示した。これに対して、miR-21シード中に2つのミスマッチを持つ対照miR-21センサーコンストラクトはホタルルシフェラーゼ活性の抑制解除を何も示さなかったことから、細胞中のmiR-21活性のモニタリングにおける完全マッチmiR-21センサーの特異性が証明された。8マーLNA-アンチmiRによるルシフェラーゼ活性の抑制解除は明確に用量依存的であり、そのような用量依存性はSEQ ID #3204では見られなかった。そのうえ、この新しい8マーは、SEQ ID #3204より低い用量で、はるかに強力でもあった。

40

【0302】

結論として、8マーLNA-アンチmiR (SEQ ID #3205) は、インビトロでのmiR-21の阻害に関して、miR-21をターゲットとする15マーLNA-アンチmiR SEQ ID #3204と比較して、著しく改善された力価を示す。

【0303】

(材料と方法)

細胞株：乳癌細胞株MCF-7はATCCから購入した(#HTB-22(商標))。MCF-7細胞は、10% ウシ胎仔血清、2mM Glutamax、1×NEAAおよび25 μg/mlゲンタマイシンを補足したEMEM培地で培養した。

50

トランスフェクション：トランスフェクションの前日に、6穴プレートに、1ウェルあたり400,000個の細胞を播種して、翌日には50~70%コンフルエントになるようにした。トランスフェクションの日に、MCF-7細胞に、0.8 µgのmiR-21完全マッチ/psiCHECK2、miR-21.m2/psiCHECK2または空psiCHECK2ベクター（SDS Promega）を、1 µlのLipofectamine2000（Invitrogen）と共に、製造者の指示に従ってトランスフェクトした。24時間後に、ルシフェラーゼ測定のために細胞を収集した。

ルシフェラーゼアッセイ：細胞をPBSで洗浄し、セルスクレーパーで収集した後、細胞を10,000rpmで5分間遠心分離した。上清を捨て、50 µlの1×Passive Lysis Buffer（Promega）を細胞ペレットに加えてから、細胞を氷上に30分間置いた。溶解した細胞を10,000rpmで30分間遠心した後、20 µlを96穴プレートに移し、製造者の指示（Promega）に従ってルシフェラーゼ測定を行なった。

【実施例 5】

【0304】

ルシフェラーゼセンサーアッセイを使った、HeLa細胞における、SEQ ID #3205 LNA-アンチmiRによるmiR-21拮抗作用の評価

miR-21をターゲットとする完全にLNA修飾された8マーLNA-アンチmiR SEQ ID #3205の効率をさらに評価するために、子宮頸癌細胞株HeLaにも、上述のmiR-21ルシフェラーゼセンサーコンストラクトを、上記の項で説明したように、さまざまな濃度のSEQ ID #3205と共にトランスフェクトした（図3）。

【0305】

（結果）SEQ ID #3204が最も高い用量（50nM）まで完全な抑制解除を示さなかったのと比較して、SEQ ID #3205は、HeLa細胞では、早くも5nMで、miR-21ルシフェラーゼセンサーコンストラクトの完全な抑制解除を示す。さらにまた、8マーSEQ ID #3205 LNA-アンチmiRによるmiR-21の拮抗作用は、用量依存的である。miR-21ルシフェラーゼセンサーアッセイの特異性を証明するために、ミスマッチmiR-21ターゲット部位（シード中に2つのミスマッチ）もHeLa細胞にトランスフェクトしたが、ホタルルシフェラーゼ活性の抑制解除は示さなかった。

【0306】

結論として、完全にLNA修飾されたSEQ ID #3205は、インビトロでのmiR-21の阻害において、MCF-7細胞でも、HeLa細胞でも、15マーLNA-アンチmiR SEQ ID #3204と比較して、著しく改善された力価を示す。

【0307】

（材料と方法）

細胞株：ヒト子宮頸癌細胞株HeLaはECACCから購入した（#93021013）。HeLa細胞は、10%ウシ胎仔血清、2mM Glutamax、1×NEAAおよび25 µg/mlゲンタマイシンを補足したEMEM培地で培養した。

トランスフェクション：トランスフェクションの前日に、24穴プレートに、1ウェルあたり60,000個の細胞を播種して、翌日には50~70%コンフルエントになるようにした。トランスフェクションの日に、HeLa細胞に、0.2 µgのmiR-21完全マッチ/psiCHECK2、miR-21.m2/psiCHECK2または空psiCHECK2ベクターを、0.7 µlのLipofectamine2000（Invitrogen）と共に、製造者の指示に従ってトランスフェクトした。24時間後に、ルシフェラーゼ測定のために細胞を収集した。

ルシフェラーゼアッセイ：細胞をPBSで洗浄し、100 µlの1×Passive Lysis Buffer（Promega）を各ウェルに加えた後、その24穴プレートをオービタルシェーカー上に30分間置いた。細胞を集め、エッペンドルフチューブに移し、10,000rpmで30分間遠心分離した後、10 µlを96穴プレートに移し、製造者の指示（Promega）に従ってルシフェラーゼ測定を行なった。

【実施例 6】

【0308】

ルシフェラーゼセンサーアッセイを使った、マウスRAW細胞における、SEQ ID #3207 LNA-

アンチmiRによるmiR-155拮抗作用の評価

完全にLNA修飾された8マーLNA-アンチmiRがmiR-155を効果的に拮抗できるかどうかを調べるために、miR-155用の完全マッチターゲット部位を同じルシフェラーゼベクター (psiCHECK2) にクローニングし、マウス白血病単球マクロファージRAW細胞株にトランスフェクトした。miR-155の内在性レベルはRAW細胞株では低いので、miR-155蓄積を誘発するために、細胞を100ng/ml LPSで24時間処理した。

【0309】

(結果) ルシフェラーゼ測定により、miR-155をターゲットとする完全にLNA修飾された8マーLNA-アンチmiR SEQ ID #3207は、15マーLNA-アンチmiR SEQ ID #3206と比較して、同じように有効にmiR-155を拮抗することが証明された(図4)。どちらのLNA-アンチmiRも、0.25nMで、miR-155ルシフェラーゼセンサーの>50%抑制解除を示し、miR-155を用量依存的に阻害した。

10

【0310】

(結論) これらのデータは、実施例1および2で示したmiR-21の拮抗から得られた結果をさらに裏付けて、完全にチオレート化された(thiolated) 8マーLNA-アンチmiRがマイクロRNAターゲティングに関して極めて強力であることを証明している。

【0311】

(材料と方法)

細胞株: マウス白血病単球マクロファージRAW 264.7はATCCから購入した(TIB-71)。RAW細胞は、10%ウシ胎仔血清、4mM Glutamaxおよび25 µg/ml ゲンタマイシンを補足したDMEM培地で培養した。

20

トランスフェクション: トランスフェクションの前日に、6穴プレートに、1ウェルあたり500,000個の細胞を播種して、翌日には50%コンフルエントになるようにした。トランスフェクションの日に、MCF-7細胞に、0.3 µgのmiR-155または空psiCHECK2ベクターを、10 µlのLipofectamine2000 (Invitrogen) と共に、製造者の指示に従ってトランスフェクトした。miR-155蓄積を誘発するために、トランスフェクション複合体と共に4時間インキュベートしてから、LPS (100ng/ml) をRAW細胞に加えた。さらに24時間の後、ルシフェラーゼ測定のために細胞を収集した。

ルシフェラーゼアッセイ: 細胞をPBSで洗浄し、セルスクレーパーで収集した後、細胞を2,500rpmで5分間遠心分離した。上清を捨て、50 µlの1×Passive Lysis Buffer (Promega) を細胞ペレットに加えてから、細胞を氷上に30分間置いた。溶解した細胞を10,000rpmで30分間遠心した後、20 µlを96穴プレートに移し、製造者の指示(Promega)に従ってルシフェラーゼ測定を行なった。

30

【実施例7】

【0312】

ルシフェラーゼセンサーアッセイを使った、HuH7細胞における、SEQ ID #3208 LNA-アンチmiRによるmiR-122拮抗作用の評価

miR-122に対する完全に修飾された8マーLNA-アンチmiR SEQ ID #3208の力価を、ヒトヘパトーマ細胞株HuH-7で評価した。HuH-7細胞に、完全マッチmiR-122ターゲット部位を含有するルシフェラーゼセンサーコンストラクトをトランスフェクトした。24時間後にルシフェラーゼ測定を行なった(図5)。

40

【0313】

(結果) 完全にLNA修飾された8マーLNA-アンチmiR SEQ ID #3208は、miR-122ルシフェラーゼセンサーの抑制解除によって示されるとおり、低濃度では、15マーLNA-アンチmiR SEQ ID #4より強力である。どちらのLNA-アンチmiRも、miR-122を用量依存的に阻害する(図5)。

【0314】

(結論) miR-122をターゲットとする完全にLNA修飾された8マーLNA-アンチmiR SEQ ID #3208は、インビトロでのmiR-122の阻害において、改善された力価を示す。

【0315】

50

(材料と方法)

細胞株：ヒトヘパトーマ細胞株HuH-7は、R. Bartenschlager (ハイデルベルク) から寄贈された。Huh-7細胞は、10%ウシ胎仔血清、2mM Glutamax、1×NEAAおよび25 μg/mlゲンタマイシンを補足したEMEM培地で培養した。

トランスフェクション：トランスフェクションの前日に、96穴プレートに、1ウェルあたり8,000個の細胞を播種して、翌日には50~70%コンフルエントになるようにした。トランスフェクションの日に、HuH-7細胞に、57ngのmiR-122または空psiCHECK2ベクターを、1 μlのLipofectamine2000 (Invitrogen) と共にトランスフェクトした。24時間後に、ルシフェラーゼ測定のために細胞を収集した。

ルシフェラーゼアッセイ：50 μlの1×Passive Lysis Buffer (Promega) を各ウェルに加えた後、その96穴プレートをオービタルシェーカー上に30分間置いた。各ウェルに、Dual-luciferase Reporterアッセイシステム (Promega) を加え、ルシフェラーゼ測定を製造者の指示 (Promega) に従って行なった。

【実施例 8】

【0316】

ヒト前立腺癌細胞 (PC3) において8マー (SEQ ID #3205) と15マー (SEQ ID #3204) のLNA-アンチmiRを比較することによる、miR-21拮抗作用の評価

本発明者らは、完全にLNA修飾されホスホロチオレート化された8マーLNA-アンチmiRが、ヒト子宮頸癌細胞株HeLaにおいてmiR-21ルシフェラーゼレポーターレベルを完全に抑制解除することができ、ヒト乳癌細胞株MCF-7においてmiR-21ルシフェラーゼレポーターレベルを部分的に抑制解除することができるということを、先に示した (特許出願1051)。本発明者らは次にこのスクリーニングアプローチをヒト前立腺がん細胞株PC3に拡張した。miR-21に対する異なるLNA-アンチmiRオリゴヌクレオチドの効率を評価するために、成熟miR-21用の完全マッチターゲット部位およびシード中に2つのミスマッチを持つターゲット部位がウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子の3'UTR中にクローニングされたルシフェラーゼレポーターコンストラクトを作製した (図7)。miR-21阻害をモニターするために、PC3細胞に、異なるルシフェラーゼコンストラクトを、さまざまな濃度のmiR-21アンタゴニストSEQ ID #3205 (8マー) および比較のための15マーLNA-アンチmiR完全マッチSEQ ID #3204と共にトランスフェクトした。24時間後に、ルシフェラーゼ活性を測定した。

【0317】

(結果) ルシフェラーゼレポーター実験は、miR-21に対する15マーLNA-アンチmiR (SEQ ID #3204) によるルシフェラーゼmiR-21レポーター活性の用量依存的抑制解除を示した。しかし、ルシフェラーゼレポーターの完全な抑制解除は、最も高い濃度でさえ得られなかった (図7)。対照的に、8マーの完全にLNA置換されたLNA-アンチmiRをトランスフェクトした細胞は、1nMで早くも完全な抑制解除を見せて、15マーLNA-アンチmiRと比較して著しく改善された力価を示した。miR-21に関してミスマッチターゲット部位を保持するルシフェラーゼ対照レポーターは、どちらのLNA-アンチmiRによる影響も受けなかったことから、両LNA-アンチmiRの高い特異性が証明された。

【0318】

(結論) このマイクロマー (micromer) は、miR-21のターゲティングに関して、15マーLNA-アンチmiRよりも、はるかに強力であり、今のところ、前立腺癌細胞において最も強力であることを示した。

【0319】

(材料と方法)

細胞株：ヒト前立腺癌PC3細胞株はECACCから購入した (#90112714)。PC3細胞は、10%ウシ胎仔血清、2mM Glutamaxおよび25 μg/mlゲンタマイシンを補足したDMEM培地で培養した。

トランスフェクション：トランスフェクションの前日に、12穴プレートに、1ウェルあたり100,000個の細胞を播種して、翌日には50%コンフルエントになるようにした。トランスフェクションの日に、PC3細胞に、0.3 μgのmiR-21または空psiCHECK2ベクターを、1.2

10

20

30

40

50

μlのLipofectamine2000 (Invitrogen) と共に、製造者の指示に従ってトランスフェクトした。さまざまな濃度のLNA-アンチmiRもトランスフェクトした。24時間後に、ルシフェラーゼ測定のために細胞を収集した。

ルシフェラーゼアッセイ：細胞をPBSで洗浄し、250 μlの1×Passive Lysis Buffer (Promega) をウェルに加えた。プレートを振盪機上に30分間置いた後、細胞溶解物をエッペンドルフチューブに移した。細胞溶解物を2,500rpmで10分間遠心分離した後、20 μlを96穴プレートに移し、製造者の指示 (Promega) に従ってルシフェラーゼ測定を行なった。

【実施例 9】

【0320】

8マー-LNA-アンチmiRによるmiR-21拮抗作用の特異性評価

10

miR-21をターゲットとする、本発明者らの短いLNA-アンチmiRの特異性を調べるために、シード認識配列中に2つのミスマッチを含有する8マーのミスマッチ対照LNA-アンチmiR (SEQ ID #3218) を設計した (図8参照)。実施例1で説明したルシフェラーゼレポーターコンストラクトを、ヒト子宮頸癌細胞株HeLaに、LNAミスマッチ対照オリゴSEQ ID #3218と共にトランスフェクトし、その効力を、miR-21をターゲットとする8マー-LNA-アンチmiR (SEQ ID #3205) と比較した。24時間後に、ルシフェラーゼ活性を測定した。

【0321】

(結果) 図8に示すように、完全にLNA修飾された8マー-LNA-アンチmiRをHeLa細胞にトランスフェクトすると、5nMで早くも、ルシフェラーゼmiR-21レポーターの完全な抑制解除が起こった。対照的に、細胞に8マー-LNAミスマッチ対照オリゴをトランスフェクトした場合、miR-21シード中に2つのミスマッチを持つ対照miR-21ルシフェラーゼレポーターで得られる結果と合わせて、これらのデータは、HeLa細胞におけるmiR-21のターゲティングに関して、完全にLNA置換された8マー-LNA-アンチmiRの高い特異性を証明している。

20

【0322】

miRBaseマイクロRNA配列データベースを解析したところ、LNA-アンチmiR SEQ ID #3205のmiR-21認識配列はマイクロRNA-21にユニークであることが示された。しかし、マイクロマーの長さを7ntに減らすと、ath-miR-844、mmu-miR-590-3pおよびhas-miR-590-3pもターゲットになるので、miR-21だけに特異的ではなくなる。

【0323】

(結論) 2つのミスマッチヌクレオチドを持つ8マー-LNA-アンチmiR内での2つのヌクレオチド位置の交換は、miR-21に対するLNA-アンチmiRの拮抗活性を完全に消滅させた。

30

【0324】

(材料と方法)

細胞株：ヒト子宮頸癌細胞株HeLaはECACCから購入した (#93021013)。HeLa細胞は、10% ウシ胎仔血清、2mM Glutamax、1×NEAAおよび25 μg/mlゲンタマイシンを補足したEMEM培地で培養した。

トランスフェクション：トランスフェクションの前日に、24穴プレートに、1ウェルあたり60,000個の細胞を播種して、翌日には50~70%コンフルエントになるようにした。トランスフェクションの日に、HeLa細胞に0.2 μgのmiR-21完全マッチ/psiCHECK2、miR-21.mm2/psiCHECK2または空psiCHECK2ベクターを、0.7 μlのLipofectamine2000 (Invitrogen) と共に、製造者の指示に従ってトランスフェクトした。さまざまな濃度のLNA-アンチmiRもトランスフェクトした。24時間後に、ルシフェラーゼ測定のために細胞を収集した。

40

ルシフェラーゼアッセイ：細胞をPBSで洗浄し、100 μlの1×Passive Lysis Buffer (Promega) を各ウェルに加えた後、その24ウェルプレートをオービタルシェーカー上に30分間置いた。細胞を集め、エッペンドルフチューブに移し、10,000rpmで30分間遠心分離した後、10 μlを96穴プレートに移し、製造者の指示 (Promega) に従ってルシフェラーゼ測定を行なった。

【実施例 10】

【0325】

miR-21の効果的拮抗作用を媒介する完全にLNA修飾されたLNA-アンチmiRの、考えうる最も

50

短い長さの評価

LNA-アンチmiRの長さの要件をさらに調べるために、miR-21をターゲットとする、7マーおよび6マーのLNA-アンチmiR（どちらも完全にLNA修飾されホスホロチオレート化されたオリゴヌクレオチド）を設計した。miR-21ルシフェラーゼレポーターコンストラクトを、さまざまな濃度のLNA-アンチmiRと共に、HeLa細胞にトランスフェクトした。ルシフェラーゼ測定を24時間後に行なった。

【0326】

（結果）図9に示すように、7マーLNA-アンチmiRは、miR-21ルシフェラーゼレポータープラスミドの抑制解除を媒介するが、その力価は8マーLNA-アンチmiR（SEQ ID #3205）と比べて低い。それでもなお、用量依存的傾向は依然として観察することができる。対照的に、6マーLNA-アンチmiRは何の阻害活性も示さなかった。

【0327】

（結論）結論として、miR-21阻害を媒介することができるLNA-アンチmiRの、考える最短の長さは、7ヌクレオチドである。ただし、7マーLNA-アンチmiRは、miR-21に関して、8マーLNA-アンチmiRほど強力ではない。

【0328】

（材料と方法）

細胞株：ヒト子宮頸癌細胞株HeLaはECACCから購入した（#93021013）。HeLa細胞は、10%ウシ胎仔血清、2mM Glutamax、1×NEAAおよび25 μg/mlゲンタマイシンを補足したEMEM培地で培養した。

トランスフェクション：トランスフェクションの前日に、24穴プレートに、1ウェルあたり60,000個の細胞を播種して、翌日には50~70%コンフルエントになるようにした。トランスフェクションの日に、HeLa細胞に、0.2 μgのmiR-21完全マッチ/psiCHECK2、miR-21.m2/psiCHECK2または空psiCHECK2ベクターを、0.7 μlのLipofectamine2000（Invitrogen）と共に、製造者の指示に従ってトランスフェクトした。さまざまな濃度のLNA-アンチmiRもトランスフェクトした。24時間後に、ルシフェラーゼ測定のために細胞を収集した。

ルシフェラーゼアッセイ：細胞をPBSで洗浄し、100 μlの1×Passive Lysis Buffer（Promega）を各ウェルに加えた後、その24穴プレートをオービタルシェーカー上に30分間置いた。細胞を集めてエッペンドルフチューブに移し、10,000rpmで30分間遠心分離した後、100 μlを96穴プレートに移し、製造者の指示（Promega）に従ってルシフェラーゼ測定を行なった。

【実施例11】

【0329】

miR-21を拮抗する完全にLNA置換されたLNA-アンチmiRの長さ評価

次に、本発明者らは、完全にLNA置換されたLNA-アンチmiRの長さを9マーから14マーまで増加させることが、HeLa細胞におけるmiR-21の拮抗に及ぼす影響を調べた。得られたLNA-アンチmiRをHeLa細胞に、miR-21ルシフェラーゼレポーターコンストラクトと共にトランスフェクトした（図10）。ルシフェラーゼ測定を24時間後に行なった。

【0330】

（結果）9マーLNA-アンチmiR SEQ ID #3211（9マー）は、miR-21ルシフェラーゼレポーターの用量依存的な抑制解除を示したが、それは、7マーLNA-アンチmiR（SEQ ID #3210）について証明されたのと同様に、完全な抑制解除には達しなかった。長さを10マー~14マーまで増加させると（SEQ ID #3212、SEQ ID #3213およびSEQ ID #3214）、miR-21レポーターの抑制解除効率の低下によって示されるとおり、力価は低下した。

【0331】

（結論）図10に示すように、miR-21阻害を依然として媒介することができる最も長い完全にLNA修飾されホスホロチオレート化されたLNA-アンチmiRは、9マーLNA-アンチmiR SEQ ID #3211である。しかし、その効率は、7マーおよび8マーLNA-アンチmiRよりも、明らかに低い。

【0332】

10

20

30

40

50

(材料と方法)

細胞株：ヒト子宮頸癌細胞株HeLaはECACCから購入した(#93021013)。HeLa細胞は、10%ウシ胎仔血清、2mM Glutamax、1×NEAAおよび25 μg/mlゲンタマイシンを補足したEMEM培地で培養した。

トランスフェクション：トランスフェクションの前日に、24穴プレートに、1ウェルあたり60,000個の細胞を播種して、翌日には50~70%コンフルエントになるようにした。トランスフェクションの日に、HeLa細胞に、0.2 μgのmiR-21完全マッチ/psiCHECK2、miR-21.m2/psiCHECK2またはターゲット部位を持たない空psiCHECK2対照ベクターを、0.7 μlのLipofectamine2000 (Invitrogen)と共に、製造者の指示に従ってトランスフェクトした。さまざまな濃度のLNA-アンチmiRもトランスフェクトした。24時間後に、ルシフェラーゼ測定のために細胞を収集した。

ルシフェラーゼアッセイ：細胞をPBSで洗浄し、100 μlの1×Passive Lysis Buffer (Promega)を各ウェルに加えた後、その24ウェルプレートをオービタルシェーカー上に30分間置いた。細胞を集め、エッペンドルフチューブに移し、10,000rpmで30分間遠心分離した後、10 μlを96穴プレートに移し、製造者の指示 (Promega) に従ってルシフェラーゼ測定を行なった。

【実施例12】

【0333】

miRターゲット認識配列内で8マーLNA-アンチmiRにとって最適な位置の決定

本発明者らの実験により、最も強力な完全にLNA修飾されたホスホロチオレート化LNA-アンチmiRは、8ヌクレオチド長であることが示された。miRターゲット認識配列内で8マーLNA-アンチmiRにとって最適な位置を評価するために、図11に示すように、成熟miR21-配列の全体を覆う、4つの異なる完全にLNA修飾された8マーLNA-アンチmiRを設計した。異なるLNA-アンチmiRを、miR-21ルシフェラーゼレポーターコンストラクトと共に、HeLa細胞に同時トランスフェクトした。ルシフェラーゼ測定を24時間後に行なった。

【0334】

(結果)ルシフェラーゼレポーターによる測定で、miR-21の効率のよいサイレンシングを媒介した唯一のLNA-アンチmiRは、miR-21のシード領域をターゲットとするSEQ ID #3205だった。シードの3'端をカバーするように設計されたSEQ ID #3215 (50%シードターゲティング)には効果がなく、成熟miR-21の中央領域および3'端をそれぞれターゲットとするように配置された他の2つのLNA-アンチmiR、SEQ ID #3216またはSEQ ID #3217にも効果はなかった。

【0335】

(結論)miR-21の強力なサイレンシングを媒介する唯一の8マーLNA-アンチmiRは、miR-21のシードをターゲットとするものである。

【0336】

(材料と方法)

細胞株：ヒト子宮頸癌細胞株HeLaはECACCから購入した(#93021013)。HeLa細胞は、10%ウシ胎仔血清、2mM Glutamax、1×NEAAおよび25 μg/mlゲンタマイシンを補足したEMEM培地で培養した。

トランスフェクション：トランスフェクションの前日に、24穴プレートに、1ウェルあたり60,000個の細胞を播種して、翌日には50~70%コンフルエントになるようにした。トランスフェクションの日に、HeLa細胞に、0.2 μgのmiR-21完全マッチ/psiCHECK2、miR-21.m2/psiCHECK2または空psiCHECK2ベクターを、0.7 μlのLipofectamine2000 (Invitrogen)と共に、製造者の指示に従ってトランスフェクトした。さまざまな濃度のLNA-アンチmiRもトランスフェクトした。24時間後に、ルシフェラーゼ測定のために細胞を収集した。

ルシフェラーゼアッセイ：細胞をPBSで洗浄し、100 μlの1×Passive Lysis Buffer (Promega)を各ウェルに加えた後、その24穴プレートをオービタルシェーカー上に30分間置いた。細胞を集め、エッペンドルフチューブに移し、10,000rpmで30分間遠心分離した後、10 μlを96穴プレートに移し、製造者の指示 (Promega) に従ってルシフェラーゼ測定を行

10

20

30

40

50

なった。

【実施例 1 3】

【0 3 3 7】

8マー-SEQ ID #3205 LNA-アンチmiRを使った、Pdcd4-3'-UTR中のmiR-21ターゲット部位とmiR-21との相互作用の実証

腫瘍抑制因子タンパク質Pdcd4は、TPAが誘発する新生物トランスフォーメーション、腫瘍の促進および進行を阻害する。Pdcd4は、異なる誘導因子に呼応して起こるアポトーシスに際して、アップレギュレートされることも示されている。さらにまた、肺がんおよび結腸直腸がんにおけるPdcd4のダウンレギュレーションは、患者の予後不良とも関連づけられている。最近、AsanganiらとFrankelらは、Pdcd4-3'-UTRにはmiR-21用のターゲット部位が保存されていること、および細胞にアンチmiR-21をトランスフェクトすることにより、Pdcd4タンパク質の増加が起こることを示した。そこで本発明者らは、前述のmiR-21ターゲット部位を包含するPdcd4の3'UTR領域の313ntを保持しているルシフェラーゼレポータープラスミドを構築し、それを、異なるLNA-アンチmiRと共に、HeLa細胞に同時トランスフェクトした。異なるLNA-アンチmiRとは、SEQ ID #3205 (8マー、完全マッチ) またはSEQ ID #3218 (8マー、ミスマッチ) である。ルシフェラーゼ測定を24時間後に行なった。

10

【0 3 3 8】

(結果) 図12に示すように、Pdcd4 3'UTRルシフェラーゼレポーターおよびSEQ ID #3205をトランスフェクトした細胞では、ルシフェラーゼ活性の増加が観察され、Pdcd4 3'UTRとmiR-21の間の相互作用が示される。しかし、ミスマッチ化合物SEQ ID #3218を細胞にトランスフェクトしても、ルシフェラーゼ活性の変化は観察されなかった。この化合物はmiR-21を拮抗しないので、これは、予想されることだった。8マーLNA-アンチmiRを、2つのより長いデザインのLNA-アンチmiRと比較したところ、完全にLNA修飾されホスホロチオレート化された短いLNA-アンチmiRの方が著しく強力であり、先のルシフェラーゼアッセイデータが確認された。

20

【0 3 3 9】

(結論) これらのデータから、miR-21を拮抗するSEQ ID #3205は、Pdcd4 3'UTRとmiR-21の間の相互作用を調節することができる結論される。

【0 3 4 0】

(材料と方法)

細胞株：ヒト子宮頸癌細胞株HeLaはECACCから購入した(#93021013)。HeLa細胞は、10%ウシ胎仔血清、2mM Glutamax、1×NEAAおよび25 μg/mlゲンタマイシンを補足したEMEM培地で培養した。

トランスフェクション：トランスフェクションの前日に、24穴プレートに、1ウェルあたり60,000個の細胞を播種して、翌日には50~70%コンフルエントになるようにした。トランスフェクションの日に、HeLa細胞に、0.2 μgのPdcd4-3'UTR/psiCHECK2または空psiCHECK2ベクターを、0.7 μlのLipofectamine2000 (Invitrogen) と共に、製造者の指示に従ってトランスフェクトした。さまざまな濃度のLNA-アンチmiRオリゴヌクレオチドもトランスフェクトした。24時間後に、ルシフェラーゼ測定のために細胞を収集した。

40

ルシフェラーゼアッセイ：細胞をPBSで洗浄し、100 μlの1×Passive Lysis Buffer (Promega) を各ウェルに加えた後、その24穴プレートをオービタルシェーカー上に30分間置いた。細胞を集め、エッペンドルフチューブに移し、10,000rpmで30分間遠心分離した後、100 μlを96穴プレートに移し、製造者の指示 (Promega) に従ってルシフェラーゼ測定を行なった。

【実施例 1 4】

【0 3 4 1】

マウスRAW細胞における、miR-155の拮抗に関する、8マーLNA-アンチmiR (SEQ ID #3207) と15マーLNA-アンチmiR (SEQ ID #3206) の比較

短いLNA-アンチmiRを使用する本発明者らのアプローチを他のmiRNAのターゲティングに

50

適合させることができるかどうかを調べるために、マイクロRNA-155に対する完全にLNA修飾された8マーLNA-アンチmiRを設計した。miR-155用の完全マッチターゲット部位をレポータープラスミドpsiCHECK2中のルシフェラーゼ遺伝子の3'UTR内にクローニングし、それを、マウスRAWマクロファージ細胞株に、8マーまたは15マーのLNA-アンチmiRと共にトランスフェクトした。miR-155の内在性レベルはRAW細胞株では低いので、miR-155蓄積を誘発するために、細胞を100ng/ml LPSで24時間処理した。24時間後に、ルシフェラーゼ解析を行なった。

【0342】

(結果)ルシフェラーゼ測定により、完全にLNA修飾された8マーLNA-アンチmiR SEQ ID #3207は、miR-155のターゲティングに関して、15マーLNA-アンチmiR SEQ ID #3206と比較して同様に有効であることが示された(図13)。どちらのLNA-アンチmiRも、0.25nMの濃度で、miR-155ルシフェラーゼセンサーの>50%抑制解除を示し、miR-155を用量依存的に阻害した。

【0343】

miRBaseマイクロRNA配列データベースの解析により、LNA-アンチmiR SEQ ID #3207のmiR-155認識配列は、マイクロRNA-155にユニークであることが示された。しかし、LNA-アンチmiRの長さを7ntに減らすと、miR-155だけに特異的なわけではなくなり、mdv1-miR-M4およびkshv-miR-K12-11もターゲットになる。

【0344】

(結論)完全にLNA修飾されホスホロチオレート化された8マーLNA-アンチmiRは、miR-155の拮抗に関して、混成LNA/DNAデザインの15マーLNA-アンチmiRと比較して同等に強力である。したがって、短いLNA-アンチmiRを使用する本発明者らのアプローチは、他のmiRNAのターゲティングに、容易に適合させることができる。

【0345】

(材料と方法)

細胞株：マウスマクロファージRAW 264.7細胞株はATCCから購入した(TIB-71)。RAW細胞は、10%ウシ胎仔血清、4mM Glutamaxおよび25 µg/mlゲンタマイシンを補足したDMEM培地で培養した。

トランスフェクション：トランスフェクションの前日に、6穴プレートに、1ウェルあたり500,000個の細胞を播種して、翌日には50%コンフルエントになるようにした。トランスフェクションの日に、RAW 264.7細胞に、0.3 µgのmiR-155完全マッチ/psiCHECK2または空psiCHECK2ベクターを、10 µlのLipofectamine2000 (Invitrogen)と共に、製造者の指示に従ってトランスフェクトした。さまざまな濃度のLNA-アンチmiRもトランスフェクトした。miR-155蓄積を誘発するために、トランスフェクション複合体と共に4時間インキュベートしてから、LPS (100ng/ml)をRAW細胞に加えた。さらに24時間の後、ルシフェラーゼ測定のために細胞を収集した。

ルシフェラーゼアッセイ：細胞をPBSで洗浄し、セルスクレーパーで収集した後、細胞を2,500rpmで5分間遠心した。上清を捨て、50 µlの1x Passive Lysis Buffer (Promega)を細胞ペレットに加えてから、細胞を氷上に30分間置いた。溶解した細胞を10,000rpmで30分間遠心した後、20 µlを96穴プレートに移し、製造者の指示(Promega)に従ってルシフェラーゼ測定を行なった。

【実施例15】

【0346】

短いLNA-アンチmiR (SEQ ID #3207) によるmiR-155拮抗作用に関する機能的読出しとしてのc/EBP タンパク質レベルの評価

短いLNA-アンチmiR (SEQ ID #3207) によるmiR-155拮抗作用に関する機能的読出しとして、新規miR-155ターゲットc/EBP のタンパク質レベルを決定した。マウスマクロファージRAW細胞株に、8マー (SEQ ID #3207) または15マー (SEQ ID #3206) のLNA-アンチmiRを、プレ-miR-155の存在下または非存在下でトランスフェクトした。15マー用のミスマッチ対照として、miR-122をターゲットとするSEQ ID #4を使用し、8マー用には、miR-21を

10

20

30

40

50

ターゲットとするSEQ ID #3205を使用した。これら2つの対照miRNAはc/EBP 発現レベルを調節しない。LPSを使ってmiR-155蓄積を誘発し、LPSで16時間処理した後に、細胞を収集した。c/EBP は3つのアイソフォームLIP、LAPおよびLAP^{*}を持つ。それらをウェスタンブロット解析で検出し、同じメンブレンをローディングコントロールとしての β -チューブリンで再プローブした。

【0347】

(結果) 図14に示すように、c/EBP LIPと β -チューブリンについて、比を算出した。15マーLNA-アンチmiRをトランスフェクトしたRAW細胞およびプレ-miR-155をトランスフェクトしなかったRAW細胞はすべて、miR-155の障害がc/EBP LIPレベルを増加させるので、等しいc/EBP LIP/ β -チューブリン比を示した(図14、左パネル)。これに対し、RAW細胞へのプレ-miR-155のトランスフェクションは、LNAで処理されていないまたは mismatchで処理されたRAW細胞から得たタンパク質抽出物を含むレーンに示されるように、c/EBP がmiR-155ターゲットであるとすれば予想されるとおり、c/EBP LIPレベルを低下させた。しかし、miR-155に対するLNA-アンチmiRをトランスフェクトしたRAW細胞から得られるタンパク質抽出物は、c/EBP LIPレベルの増加を示した。同じ実験を8マーLNA-アンチmiR-155 (SEQ ID #3207)でも行ったところ、図14(右パネル)に示すように、15マーLNA-アンチmiR SEQ ID #3206の場合に匹敵する結果が得られた。

【0348】

(結論) 8マーまたは15マーのLNA-アンチmiRを使ったmiR-155の拮抗作用は、直接のターゲットc/EBP の抑制解除をもたらす。

【0349】

(材料と方法)

細胞株：マウスマクロファージRAW 264.7細胞株はATCCから購入した(TIB-71)。RAW細胞は、10%ウシ胎仔血清、4mM Glutamaxおよび25 μ g/mlゲンタマイシンを補足したDMEM培地で培養した。

トランスフェクション：トランスフェクションの前日に、6穴プレートに、1ウェルあたり500,000個の細胞を播種して、翌日には50%コンフルエントになるようにした。トランスフェクションの日に、RAW 264.7細胞に、5nmolのプレ-miR-155 (Ambion) および/または5 nM LNA-アンチmiRを、10 μ lのLipofectamine2000 (Invitrogen) と共に、製造者の指示に従ってトランスフェクトした。さまざまな濃度のLNA-アンチmiRもトランスフェクトした。miR-155蓄積を誘発するために、トランスフェクション複合体と共に4時間インキュベートしてから、LPS (100ng/ml) をRAW細胞に加えた。16時間後に、タンパク質抽出およびウェスタンブロット解析のために、細胞を収集した。

ウェスタンブロット：細胞をPBSで洗浄し、トリプシン処理し、エッペンドルフチューブに移し、250 μ lの溶解バッファー(1 \times RIPA)を加えた。細胞溶解物を氷上に20分間置き、10,000rpmで10分間遠心した。Coomassie Plusを使用し、製造者の指示に従って、タンパク質濃度を測定し、80 μ gを4-12%BIS-TRISゲルにのせた。メンブレンを1:100濃度の一次モノクローナルマウス抗体C/EBP (Santa Cruz) と共に4 時間で終夜インキュベートした。免疫活性バンドをECL Plus (Amersham) で可視化した。

【実施例16】

【0350】

完全にLNA修飾された8マー (SEQ ID #3221) LNA-アンチmiRによるmiR-106bの拮抗作用

短いLNA-アンチmiRを使用する本発明者らのアプローチを他のmiRNAのターゲティングに適合させることができることを確認するために、マイクロRNA-106bに対する完全にLNA修飾された8マーLNA-アンチmiRを設計した。miR-106b用の完全マッチターゲット部位を、ベクター (psiCHECK2) 中のルシフェラーゼ遺伝子の3'UTR内にクローニングし、それを、ヒト子宮頸癌HeLa細胞株に、さまざまな濃度の短いLNA-アンチmiR (SEQ ID #3221) または15マーLNA-アンチmiR (SEQ ID #3228) と共にトランスフェクトした。ルシフェラーゼ測定を24時間後に行なった。

【0351】

(結果) miR-106bに対する8マー-LNA-アンチmiR SEQ ID #3221のトランスフェクションは、1nM LNA-アンチmiRの濃度で完全に抑制解除されたルシフェラーゼレポーターの抑制解除によって示されるように、miR-106bの用量依存的阻害をもたらした(図15)。匹敵する結果が、15マー-LNA-アンチmiR SEQ ID #3228を使って得られたことから、8マー-LNA-アンチmiRは15マーと同様に強力であることが証明された。

【0352】

(結論) HeLa細胞におけるmiR-106bのターゲティングにより、8マーの完全にLNA修飾されホスホロチオレート化されたLNA-アンチmiRは、15マー-LNA/DNAミックスマー-LNA-アンチmiRと比較して、同等に強力であることが示される。

【0353】

(材料と方法)

細胞株：ヒト子宮頸癌細胞株HeLaはECACCから購入した(#93021013)。HeLa細胞は、10%ウシ胎仔血清、2mM Glutamax、1×NEAAおよび25 μg/mlゲンタマイシンを補足したEMEM培地で培養した。

トランスフェクション：トランスフェクションの前日に、96穴プレートに、1ウェルあたり5,200個の細胞を播種して、翌日には50~70%コンフルエントになるようにした。トランスフェクションの日に、HeLa細胞に、57ngのmiR-21完全マッチ/psiCHECK2、miR-21.mm2/psiCHECK2または空psiCHECK2ベクターを、0.14 μlのLipofectamine2000 (Invitrogen)と共に、製造者の指示に従ってトランスフェクトした。さまざまな濃度のLNA-アンチmiRもトランスフェクトした。24時間後に、ルシフェラーゼ測定のために細胞を収集した。

ルシフェラーゼアッセイ：細胞をPBSで洗浄し、30 μlの1×Passive Lysis Buffer (Promega)を各ウェルに加えた後、その24穴プレートをオービタルシェーカー上に30分間置いた。細胞を集め、エッペンドルフチューブに移し、10,000rpmで30分間遠心した後、ルシフェラーゼ測定を製造者の指示(Promega)に従って行なった。

【実施例17】

【0354】

完全にLNA修飾された8マー (SEQ ID #3222) LNA-アンチmiRによるmiR-19aの拮抗作用

短いLNA-アンチmiRを使用する本発明者らのアプローチを他のmiRNAのターゲティングに容易に適合させることができることをさらに確認するために、マイクロRNA-19aに対する完全にLNA修飾された8マー-LNA-アンチmiRを設計した。miR-19a用の完全マッチターゲット部位を、psiCHECK2ベクター中のルシフェラーゼ遺伝子の3'UTR内にクローニングした。そのレポータープラスミドを、ヒト子宮頸癌HeLa細胞株に、miR-19aをターゲットとするさまざまな濃度の短いLNA-アンチmiR (SEQ ID #3222) または15マー-LNA-アンチmiR (SEQ ID #3229)と共にトランスフェクトした。ルシフェラーゼ測定を24時間後に行なった。

【0355】

(結果) 図16に示すように、HeLaへの15マー-LNA-アンチmiR SEQ ID #3229のトランスフェクションは、1nM LNA-アンチmiRの濃度における完全な抑制解除によって証明されるように、miR-19aを効率よく拮抗する。これに対し、8マー-LNA-アンチmiR SEQ ID #3222のトランスフェクションは、0.5nM濃度で早くも効果的なmiR-19a拮抗作用をもたらし、この8マー-LNA-アンチmiRがHeLa細胞において15マー-LNA-アンチmiRと少なくとも同等に強力であることを示した。

【0356】

(結論) HeLa細胞におけるmiR-19aのターゲティングにより、8マーの完全にLNA修飾されホスホロチオレート化されたLNA-アンチmiRは、15マーのLNA/DNAミックスマー-LNA-アンチmiRと比較して少なくとも同等に強力であることが示される。

【0357】

(材料と方法)

細胞株：ヒト子宮頸癌細胞株HeLaはECACCから購入した(#93021013)。HeLa細胞は、10%ウシ胎仔血清、2mM Glutamax、1×NEAAおよび25 μg/mlゲンタマイシンを補足したEMEM培地で培養した。

トランスフェクション：トランスフェクションの前日に、96穴プレートに、1ウェルあたり5,200個の細胞を播種して、翌日には50~70%コンフルエントになるようにした。トランスフェクションの日に、HeLa細胞に、57ngのmiR-21完全マッチ/psiCHECK2、miR-21.mm2/psiCHECK2または空psiCHECK2ベクターを、0.14 μ lのLipofectamine2000 (Invitrogen)と共に、製造者の指示に従ってトランスフェクトした。さまざまな濃度のLNA-アンチmiRもトランスフェクトした。24時間後に、ルシフェラーゼ測定のために細胞を収集した。

ルシフェラーゼアッセイ：細胞をPBSで洗浄し、30 μ lの1×Passive Lysis Buffer (Promega)を各ウェルに加えた後、その24穴プレートをオービタルシェーカー上に30分間置いた。細胞を集め、エッペンドルフチューブに移し、10,000rpmで30分間遠心した後、ルシフェラーゼ測定を製造者の指示 (Promega) に従って行なった。

10

【実施例18】

【0358】

完全にLNA置換された短いLNA-アンチmiRを用いるマイクロRNAファミリーのターゲティング

次に、本発明者らは、すべてのファミリーメンバーに共通するシード配列に相補的な単一の短い7マーLNA-アンチmiRを使ってマイクロRNAファミリーをターゲットとすることが可能かどうかを調べた(図17参照)。この実験では、結腸、膵臓、前立腺および胃の固形腫瘍において過剰発現されるmiR-221およびmiR-222に的を絞った。miR-221とmiR-222は多形性神経膠芽腫において最も著しくアップレギュレートされるマイクロRNAであることも示されている。さらにまた、miR-221とmiR-222の過剰発現は、少なくとも一つには、腫瘍抑制因子タンパク質p27をブロックすることにより、前立腺癌の成長と進行の一因にもなりうる。それぞれmiR-221用およびmiR-222用である完全マッチターゲット部位を、どちらもルシフェラーゼ遺伝子の3'UTR内にクローニングして、2つのレポーターコンストラクトを得た。次に、これらのコンストラクトを、別々に、または組み合わせて、前立腺癌細胞株PC3にトランスフェクトした。miR-221とmiR-222の両方をターゲットとする7マーの他に、miR-221 (SEQ ID #3223) またはmiR-222 (SEQ ID #3224) のどちらか一方をターゲットとする15マーのLNA-アンチmiR (15マー) も、それぞれ別個に、または一緒に、同時トランスフェクトした(図18左参照)。

20

【0359】

(結果) 図18に示すように、miR-221に対するLNA-アンチmiR SEQ ID #3223によるPC3細胞のトランスフェクションは、1nMのLNA-アンチmiR濃度で、効率のよいmiR-221の阻害をもたらした。miR-222用のルシフェラーゼレポータープラスミドを使った場合にも、そしてまた、miR-221用とmiR-222用のルシフェラーゼレポーターを両方とも同時にPC3細胞に同時トランスフェクトした場合にも、阻害効果が観察される。この阻害効果は、おそらく、miR-221とmiR-222の間で共有されているシード配列によるものだろう。同様に、miR-222に対するLNA-アンチmiR SEQ ID #3224によるPC3細胞のトランスフェクションは、miR-222用ルシフェラーゼレポーターの完全な抑制解除によって示されるように、1nMのLNA-アンチmiR濃度で、効率のよいmiR-222の阻害をもたらした。miR-222用のルシフェラーゼレポータープラスミドを使った場合にも、そしてまた、miR-221用とmiR-222用のルシフェラーゼレポーターを両方とも同時にPC3細胞に同時トランスフェクトした場合にも、阻害効果が観察される。それぞれmiR-221およびmiR-222に対するLNA-アンチmiR化合物であるSEQ ID #3223とSEQ ID #3224を両方とも同時トランスフェクトすると(図18左参照)、PC3細胞に別々にトランスフェクトした場合にも、同時トランスフェクトした場合にも、ルシフェラーゼレポータープラスミドの完全な抑制解除によって示されるとおり、両miRNAの効果的な阻害が起こった。興味深いことに、miR-221とmiR-222のシード配列をターゲットとする単一の完全にLNA修飾された7マーLNA-アンチmiR (SEQ ID #3225) をPC3細胞にトランスフェクトすると、PC3細胞に別々にトランスフェクトした場合にも、同時トランスフェクトした場合にも、ルシフェラーゼレポータープラスミドの完全な抑制解除によって示されるとおり、miR-221およびmiR-222の効率のよい用量依存的拮抗作用がもたらされた。これは、単一の短いLNA置換LNA-アンチmiRが、シード配列を効果的にターゲットとし、それに

30

40

50

よってマイクロRNAファミリー全体を同時に拮抗することができるということを証明している。miRBaseマイクロRNA配列データベースの解析により、LNA-アンチmiR SEQ ID #3225のmiR-221/222シード認識配列は両miRNAにユニークであることが示された。

【0360】

(結論)本発明者らの結果は、マイクロRNAシード配列を効果的にターゲットとし、それによってマイクロRNAファミリー全体を同時に拮抗することができる完全にLNA置換された短いLNA-アンチmiRオリゴヌクレオチドのデザインおよび合成を、LNAが可能にすることを証明している。

【0361】

(材料と方法)

細胞株：ヒト前立腺癌PC3細胞株はECACCから購入した(#90112714)。PC3細胞は、10%ウシ胎仔血清、2mM Glutamaxおよび25 µg/mlゲンタマイシンを補足したDMEM培地で培養した。

トランスフェクション：トランスフェクションの前日に、12穴プレートに、1ウェルあたり100,000個の細胞を播種して、翌日には50%コンフルエントになるようにした。トランスフェクションの日に、PC3細胞に、0.3 µgのmiR-221用もしくはmiR-222用のルシフェラーゼレポータープラスミド、または対照としてmiRNAターゲット部位を持たない空psiCHECK2ベクターを、1.2 µlのLipofectamine2000 (Invitrogen)と共に、製造者の指示に従ってトランスフェクトした。24時間後に、ルシフェラーゼ測定のために細胞を収集した。

ルシフェラーゼアッセイ：細胞をPBSで洗浄し、250 µlの1×Passive Lysis Buffer (Promega)をウェルに加えた。プレートを振盪機上に30分間置いた後、細胞溶解物をエッペンドルフチューブに移した。細胞溶解物を2,500rpmで10分間遠心した後、20 µlを96穴プレートに移し、製造者の指示(Promega)に従ってルシフェラーゼ測定を行なった。

【実施例19】

【0362】

7マーSEQ ID #3225 LNA-アンチmiRによるmiR-221/222ファミリーの拮抗作用に関する機能的読出しとしてのp27タンパク質レベルの評価

先の研究(Le Sageら 2007、Galardiら, 2007)により、miR-221とmiR-222は、細胞周期調節に關与する腫瘍抑制因子遺伝子p27の発現を、転写後調節することが示されている。これらの研究では、miR-221およびmiR-222のダウンレギュレーションが、p27の発現レベルを増加させることが示された。そこで、7マーSEQ ID #3225 LNA-アンチmiRによるmiR-221/222ファミリーの拮抗作用に関する機能的読出しとして、本発明者らは、PC3細胞へのLNA-アンチmiR SEQ ID #3225のトランスフェクション後に、p27のタンパク質レベルを決定し、8マーLNAミスマッチ対照と比較した。24時間後に、ウェスタンブロット解析のために細胞を収集した(図19)。

【0363】

(結果)図19に示すように、miR-221およびmiR-222中のシード配列をターゲットとする7マーLNA-アンチmiR SEQ ID #3225のトランスフェクションは、非トランスフェクトPC3細胞またはLNAミスマッチ対照トランスフェクトPC3細胞と比較して、p27タンパク質レベルの用量依存的増加をもたらした。これらの結果は、7マーLNA-アンチmiRが、miR-221/222ファミリーを効果的に拮抗して、直接のターゲットp27の抑制解除をタンパク質レベルでもたらすことができるということを明確に証明している。

【0364】

(結論)miR-221/222ファミリー中のシード配列をターゲットとする完全にLNA修飾された7マーLNA-アンチmiRは、両方のmiRNAを効果的に拮抗して、直接のターゲットp27の抑制解除をタンパク質レベルでもたらした。

【0365】

(材料と方法)

細胞株：ヒト前立腺癌PC3細胞株はECACCから購入した(#90112714)。PC3細胞は、10%ウシ胎仔血清、2mM Glutamaxおよび25 µg/mlゲンタマイシンを補足したDMEM培地で培養した

10

20

30

40

50

。 トランスフェクション：トランスフェクションの前日に、6穴プレートに、1ウェルあたり250,000個の細胞を播種して、翌日には50%コンフルエントになるようにした。トランスフェクションの日に、PC3細胞に、さまざまな濃度のLNA-アンチmiRを、Lipofectamine 2000と共にトランスフェクトした。24時間後に、タンパク質抽出およびウェスタンブロット解析のために細胞を収集した。

ウェスタンブロット：細胞をPBSで洗浄し、トリプシン処理し、エッペンドルフチューブに移し、250 μ lの溶解バッファー（1×RIPA）を加えた。細胞溶解物を氷上に20分間置いてから、10,000rpmで10分間遠心した。Coomassie Plusを使用し、製造者の指示に従って、タンパク質濃度を測定し、100 μ gを4-12%BIS-TRISゲルにのせた。メンブレンを1：100希釈の一次モノクローナルマウス抗体p27（BD Biosciences）と共に4で終夜インキュベートした。免疫活性バンドをECL Plus（Amersham）で可視化した。

【実施例20】

【0366】

LNA-アンチmiRの二重鎖融解温度（ T_m ）

表5に示すように、完全に修飾された短いLNA-アンチmiRの長さが増加するに連れて、 T_m 値は増加する（表7のSEQ ID #3205、SEQ ID #3209～3214の T_m 値を参照）。最適な阻害効果がmiR-21に対する8マーLNA-アンチmiR SEQ ID #3205によって達成されたのに対し、6マーSEQ ID #3209の極めて低い T_m は、おそらく、miR-21ターゲットの拮抗作用を媒介するには十分でないだろう。一方、10マー（SEQ ID #3212）を上回る長さにすると T_m は著しく増加するが、それと同時に、ルシフェラーゼmiR-21レポーターを使って測定される阻害活性も減少する。これはおそらく、完全に修飾された12マーおよび14マーのLNA-アンチmiRは、ホモ二量体を形成する傾向が高いからだろう。miR-21認識配列の全体にわたる完全にLNA修飾された8マーLNA-アンチmiRのスライディングウインドウ（sliding window）を使った実験により、miRNA機能にとっては、LNA-アンチmiRの十分な T_m 値に加えて、シード領域が、したがってLNA-アンチmiRによってターゲットとされる最適な領域が、最も重要であることが、明確に証明される。

（表5）相補的RNAオリゴヌクレオチドに対して測定されたmiR-21 LNA-アンチmiRの T_m 値

【表5】

SEQ ID #	マイクロRNA	長さ (bp)	配列	T_m 測定値 (RNA) (°C)
3205	miR-21	8	5'-GATAAGCT-3'	64.0
3209	miR-21	6	5'-TAAGCT-3'	32.0
3210	miR-21	7	5'-ATAAGCT-3'	45.0
3211	miR-21	9	5'-TGATAAGCT-3'	65.0
3212	miR-21	10	5'-CTGATAAGCT-3'	63.0
3213	miR-21	12	5'-GTCTGATAAGCT-3'	86.8
3214	miR-21	14	5'-CAGTCTGATAAGCT-3'	89.9
3215	miR-21	8	5'-TCTGATAA-3'	56.0
3216	miR-21	8	5'-ATCAGTCT-3	72.0
3217	miR-21	8	5'-TCAACATC-3	48.0

【0367】

（結論） T_m 値は、ルシフェラーゼレポーターを使って得られた実験データと共に、LNA-アンチmiRによる強力な拮抗作用が、 T_m に依存するだけでなく、マイクロRNA認識配列内でのLNA-アンチmiRの位置決めにも依存することを示している。

【0368】

（材料と方法）

T_m 測定：オリゴヌクレオチド：miR-21 RNA二重鎖を500 μ lのRNaseフリー-H₂Oに希釈して3 μ Mにし、500 μ lの2× T_m -バッファー（200mM NaCl、0.2mM EDTA、20mM Na-リン酸、pH 7.

0)と混合した。その溶液を95℃に3分間加熱してから、室温で30分間アニールさせた。二重鎖融解温度(T_m)は、Peltier温度プログラマーPTP6を装備したLambda 40 UV/VIS分光測光器で、PE Templabソフトウェア(Perkin Elmer)を使って測定した。260nmでの吸収を記録しながら、温度を20℃から95℃まで昇温し、次に25℃まで降温させた。融解およびアニーリングの両方の一次導関数および極大を使って、二重鎖融解温度を評価した。

【実施例21】

【0369】

ヒト肝細胞細胞株HepG2において、8マー(SEQ ID #3205)と15マー(SEQ ID #3204)のLNA-A-アンチmiRを比較することによる、miR-21拮抗作用の評価

本発明者らは、本願において、完全にLNA修飾されホスホロチオレート化された8マーLNA-A-アンチmiRが、ヒト子宮頸癌細胞株HeLa、ヒト乳癌細胞株MCF-7およびヒト前立腺がん細胞株PC3において、miR-21を効果的に拮抗することを、先に示した。本発明者らは、このスクリーニングアプローチを、ヒト肝細胞がん細胞株HepG2に拡張した。miR-21に対する8マーLNA-A-アンチmiRオリゴヌクレオチドの効率を評価するために、成熟miR-21用の完全マッチターゲット部位がウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子の3'UTR内にクローニングされたルシフェラーゼレポーターコンストラクトを作製した。miR-21阻害をモニターするために、HepG2細胞に、ルシフェラーゼコンストラクトを、さまざまな濃度のmiR-21アンタゴニストSEQ ID #3205(8マー)ならびに特異性を比較するための8マーLNA-A-アンチmiRミスマッチ(SEQ ID #3218)および力価を比較するための15マー(SEQ ID #3204)と共に、トランスフェクトした。24時間後に、ルシフェラーゼ活性を測定した。

【0370】

(結果)ルシフェラーゼレポーター実験は、miR-21に対する15マーLNA-A-アンチmiR(SEQ ID #3204)によるルシフェラーゼmiR-21レポーター活性の用量依存的抑制解除を示した。しかし、ルシフェラーゼレポーターの完全な抑制解除は、高濃度でさえ得られなかった(図20)。対照的に、8マーの完全にLNA修飾されたLNA-A-アンチmiR(SEQ ID #3205)をトランスフェクトした細胞は、5nMで早くも、完全な抑制解除を見せて、15マーLNA-A-アンチmiRと比較して著しく改善された力価を示した。8マー完全マッチと8マーミスマッチの特異性を比較すると、ミスマッチLNA-A-アンチmiR(SEQ ID #3218)は、抑制解除を全く示さなかったことから、miR-21に対するLNA-A-アンチmiR化合物の高い特異性が証明された。

【0371】

(結論)8マー(SEQ ID #3205)は、miR-21のターゲティングに関して、15マーLNA-A-アンチmiRよりも強力であり、SEQ ID #3205によるmiR-21の拮抗作用は特異的である。

【0372】

(材料と方法)

細胞株:ヒト肝細胞HepG2細胞株はECACCから購入した(#85011430)。HepG2細胞は、10%ウシ胎仔血清、2mM Glutamaxおよび25μg/mlゲンタマイシンを補足したEMEM培地で培養した。

トランスフェクション:6穴プレートに1ウェルあたり650,000個の細胞を播種し、リバーストランスフェクションを行なった。HepG2細胞に、0.6μgのmiR-21または空psiCHECK2ベクターを、2.55μlのLipofectamine2000(Invitrogen)と共に、製造者の指示に従ってトランスフェクトした。さまざまな濃度のLNA-A-アンチmiRもトランスフェクトした。24時間後に、ルシフェラーゼ測定のために細胞を収集した。

ルシフェラーゼアッセイ:細胞をPBSで洗浄し、300μlの1×Passive Lysis Buffer(Promega)をウェルに加えた。プレートを振盪機上に30分間置いた後、細胞溶解物をエッペンドルフチューブに移した。細胞溶解物を2,500rpmで10分間遠心分離した後、50μlを96穴プレートに移し、製造者の指示(Promega)に従ってルシフェラーゼ測定を行なった。

【実施例22】

【0373】

ヒト肝細胞細胞株Huh-7における、8マーSEQ ID #3205 LNA-A-アンチmiRを使った、Pdcd4 3'UTR中のmiR-21ターゲット部位とmiR-21との相互作用の実証

10

20

30

40

50

腫瘍抑制因子タンパク質Pdc4は腫瘍の促進および進行を阻害する。さらにまた、肺がんおよび直腸結腸がんにおけるPdc4のダウンレギュレーションは、患者の予後不良とも関連づけられている。最近、Asanganiら (Oncogene 2007) およびFrankelら (J Biol Chem 2008) は、Pdc4 3'-UTRにはmiR-21用のターゲット部位が保存されていること、および細胞にアンチmiR-21をトランスフェクトすることにより、Pdc4タンパク質の増加が起こることを示した。そこで本発明者らは、前述のmiR-21ターゲット部位を包含するPdc4の3'UTR領域の313ntを保持しているルシフェラーゼレポータープラスミドを構築し、それを、異なるLNA-アンチmiRおよびプレ-miR-21 (10nM) と共に、Huh-7細胞に同時トランスフェクトした。異なるLNA-アンチmiRとは、SEQ ID #3205 (8マー、完全マッチ)、SEQ ID #3218 (8マー、ミスマッチ) およびSEQ ID #3204 (15マー、DNA/LNAミックスマー) である。ルシフェラーゼ測定を24時間後に行なった。

【0374】

(結果) 図21に示すように、Pdc4 3'UTRルシフェラーゼレポーターおよびSEQ ID #3205をトランスフェクトした細胞では、ルシフェラーゼ活性の増加が観察されたことから、Pdc4 3'UTRとmiR-21の間の相互作用が示される。しかし、ミスマッチ化合物SEQ ID #3218を細胞にトランスフェクトしても、ルシフェラーゼ活性の変化は観察されなかった。この化合物はmiR-21を拮抗しないので、これは予想されることだった。8マーLNA-アンチmiRを15マーLNA-アンチmiR (SEQ ID #3204) と比較したところ、完全にLNA修飾されホスホロチオレート化された短いLNA-アンチmiRの方が著しく強力であり、先のデータが確認された。

【0375】

(材料と方法)

細胞株：ヒトヘパトーマ細胞株Huh-7は、R. Bartinschlager (ハイデルベルク大学分子ウイルス学科) から寄贈された。Huh-7細胞は、10% ウシ胎仔血清、2mM Glutamax、1×NEAA および25 µg/ml ゲンタマイシンを補足したDMEM培地で培養した。

トランスフェクション：トランスフェクションの前日に、96ウェルプレートに、1ウェルあたり11,000個の細胞を播種して、翌日には50~70% コンフルエントになるようにした。トランスフェクションの日に、Huh-7細胞に、20ngのPdc4 3'UTR/psiCHECK2または空psiCHECK2ベクターを、10nMプレ-miR-21 (Ambion) および0.14 µlのLipofectamine2000 (Invitrogen) と共に、製造者の指示に従ってトランスフェクトした。さまざまな濃度のLNA-アンチmiRオリゴヌクレオチドもトランスフェクトした。24時間後に、ルシフェラーゼ測定のために細胞を収集した。

ルシフェラーゼアッセイ：細胞を洗浄し、30 µlの1×Passive Lysis Buffer (Promega) を各ウェルに加えた後、その96ウェルプレートをオービタルシェーカー上に置いた。30分後に、Luciferase Assay Buffer II (Promega製のDual-Luciferase Reporter Assay System、カタログ番号E1910) に溶解した50 µlのルシフェラーゼ基質を、溶解した細胞を含むウェルに加え、ルシフェラーゼ測定を製造者の指示 (Promega) に従って行なった。

【実施例23】

【0376】

8マーLNA-アンチmiR (SEQ ID #3205) によるmiR-21拮抗作用の機能的読出しとしてのPdc4タンパク質レベルの評価

さらに本発明者らは、HeLa細胞にSEQ ID #3205 (完全マッチ)、SEQ ID #3218 (ミスマッチ)、SEQ ID #3219 (スクランブル) をトランスフェクトし、24時間後のPdc4タンパク質レベルをウェスタンブロットで解析するというも行なった (図22)。図示するように、SEQ ID #3205が添加された細胞から得られるタンパク質抽出物では、SEQ ID #3205によるmiR-21の拮抗作用ゆえに、2つの対照LNAオリゴヌクレオチドとは対照的に、Pdc4タンパク質レベルが増加する。

【0377】

(結論) 8マー (SEQ ID #3205) を使ったmiR-21の拮抗作用は、miR-21の直接ターゲットPdc4拮抗作用の抑制解除につながる。

【 0 3 7 8 】

(材料と方法)

細胞株：ヒト子宮頸癌細胞株HeLaはECACCから購入した(#93021013)。HeLa細胞は、10%ウシ胎仔血清、2mM Glutamax、1×NEAAおよび25 μg/mlゲンタマイシンを補足したEMEM培地で培養した。

トランスフェクション：トランスフェクションの前日に、6穴プレートに、1ウェルあたり200,000個の細胞を播種して、翌日には50~70%コンフルエントになるようにした。トランスフェクションの日に、HeLa細胞に、5nMのLNAオリゴヌクレオチドおよび2.5 μg/mlのLipofectamine2000 (Invitrogen)を、製造者の指示に従ってトランスフェクトした。24時間後に、ウェスタンブロット解析のために細胞を収集した。

ウェスタンブロット：細胞をPBSで洗浄し、トリプシン処理し、エッペンドルフチューブに移し、50 μlの溶解バッファー(1×RIPA)を加えた。細胞溶解物を氷上に20分間置き、10,000rpmで10分間遠心した。等量(15 μlの細胞溶解物)を4-12%BIS-TRISゲルにのせた。iBlot (Invitrogen)を使用し、製造者の指示に従って、タンパク質をニトロセルロースメンブレンに転写した。そのメンブレンを、1:2000濃度の一次アフィニティー精製ウサギ血清抗体Pdcd4 (Rockland)と共に、4で終夜インキュベートした。対照として、抗-チューブリン抗体(Thermo Scientific)を1:5000希釈で使用した。免疫活性バンドをECL Plus (Amersham)で可視化した。

【 実施例 2 4 】

【 0 3 7 9 】

8マー完全マッチLNA-アンチmiR SEQ ID #3205およびLNAミスマッチ対照SEQ ID #3218の潜在的肝毒性の評価

各化合物を、雌NMRIマウスに、25mg/kg、5mg/kgおよび1mg/kgの用量で、1日おきに2週間注射した。動物を屠殺し、ALTおよびAST分析のために、血清を全身から集めた。図23に示すように、ALTおよびASTレベルは、食塩水またはSEQ ID #3218(ミスマッチ対照)と比較して、SEQ ID #3205では、上昇しなかった。ただし1匹のマウスは、血漿と比較して6~8倍高レベルのALTおよびASTを含有する赤血球が血清試料に混入したため、増加したレベル(赤色で示す)を示した。5mg/kgおよび1mg/kgを投与されたマウスも、ALTおよびASTレベルについて分析され、食塩水処置対照動物との比較で変化を示さなかった(データ未掲載)。

【 0 3 8 0 】

(材料と方法)

実験計画：

【 表 6 】

群番号	動物ID番号	マウスの数	1日あたりの化合物用量レベル	投与体積10ml/kgでの濃度	投与経路	投薬
1	1-10	10	NaCl 0.9%	-	i.v	0、2、4、7、9
2	11-15	5	SEQ ID # 3205 25mg/kg	2.5mg/ml	i.v	0、2、4、7、9
3	16-20	5	SEQ ID # 3205 5mg/kg	0.5mg/ml	i.v	0、2、4、7、9
4	21-25	5	SEQ ID # 3205 1mg/kg	0.1mg/ml	i.v	0、2、4、7、9
5	26-30	5	SEQ ID # 3230 25mg/kg	2.5mg/ml	i.v	0、2、4、7、9
6	31-35	5	SEQ ID # 3230 5mg/kg	0.5mg/ml	i.v	0、2、4、7、9

屠殺：動物は頸椎脱臼によって屠殺した。

ALT/AST用の血清試料採取：動物を70%CO₂-30%O₂で麻酔してから、後眼窩静脈洞(retro

10

20

30

40

50

orbital sinus) 血を集めた。血液はS-monovette Serum-Gelバイアルに集めた。血清試料を個々のマウスから収集し、保存した。血液試料は室温で2時間保存した後、3000rpm、室温で10分間遠心分離した。血清画分を湿った氷 (wet ice) 上のエッペンドルフチューブ中に収集した。

ALTおよびAST測定 : ALTおよびAST測定は、96穴プレートで、ABX Pentra製のALT試薬およびAST試薬 (A11A01627-ALT、A11A01629-AST) を使って、製造者の指示に従って行なった。簡単に述べると、血清試料をH₂Oで2.5倍に希釈し、各試料を二重にアッセイした。50 μlの希釈試料または標準 (ABX Pentraのmultical-A11A01652) を各ウェルに加えた後、200 μlの37 ASTまたはALT試薬ミックスを各ウェルに加えた。速度論的測定を、340nm、37において、30秒間隔で5分間行なった。

【実施例 25】

【0381】

短いLNA-アンチmiR (SEQ ID #3207) によるmiR-155拮抗作用に関する機能的読出しとしてのPU.1タンパク質レベルの評価

本発明者らは、miR-155を拮抗する8マー (SEQ ID #3207) が、マウスマクロファージRAW細胞において、miR-155ターゲットc/EBPベータの抑制解除をもたらすことを、先に示した。SEQ ID #3207の力価をさらに実証するために、もう一つのmiR-155ターゲットPU.1のタンパク質レベルを決定した。短いLNA-アンチmiR (SEQ ID #3207) によるmiR-155拮抗作用に関する機能的読出しとして、ウェスタンブロットを行なった。拮抗作用は、8マー (SEQ ID #3207) 完全マッチまたは8マー対照LNAのどちらか一方を、プレ-miR-155の存在下または非存在下でトランスフェクトしたヒト単球THP-1細胞株で実証した。LPSを使ってmiR-155蓄積を誘発し、24時間後に細胞を収集した。

【0382】

(結果) プレ-miR-155をトランスフェクトしたTHP-1細胞はPU.1レベルの低下を示す (図24)。完全にLNA修飾されホスホロチオレート化されたSEQ ID #3207を細胞にトランスフェクトすると、miR-155が効果的に拮抗され、PU.1タンパク質のレベルは変化しないことになる。これと比較して、細胞に8マーLNA対照をトランスフェクトすると、PU.1レベルが低下したことから、SEQ ID #3207 LNA-アンチmiRによるmiR-155の拮抗作用は特異的であることが示された。

【0383】

(結論) 8マーを使ったmiR-155の拮抗作用は、ヒトTHP-1細胞において、直接のターゲットPU.1の抑制解除をもたらす。

【0384】

(材料と方法)

細胞株 : ヒト単球THP-1細胞株はECACCから購入した (#88081201)。THP-1細胞は、10% ウシ胎仔血清を補足したL-グルタミン含有RPMIで培養した。

トランスフェクション : 前日に、12穴プレートに、1ウェルあたり200,000個の細胞を播種した。トランスフェクションの日に、THP-1細胞に、5nmolのプレ-miR-155 (Ambion) および/または5nMのLNA-アンチmiRを、Lipofectamine2000 (Invitrogen) と共に、製造者の指示に従ってトランスフェクトした。トランスフェクション複合体と共に4時間インキュベートしてから、LPS (100ng/ml) を細胞に加えた。24時間後に、タンパク質抽出およびウェスタンブロット解析のために細胞を収集した。

ウェスタンブロット : 細胞をPBSで洗浄し、トリプシン処理し、エッペンドルフチューブに移し、50 μlの溶解バッファー (1×RIPA) を加えた。細胞溶解物を氷上に20分間置き、10,000rpmで10分間遠心した。等量 (15 μlの細胞溶解物) を4-12%BIS-TRISゲルにのせた。iBlot (Invitrogen) を使用し、製造者の指示に従って、タンパク質をニトロセルロースメンブレンに転写した。メンブレンを1:2000濃度のウサギモノクローナルPU.1抗体 (Cell Signaling) と共に4で終夜インキュベートした。イコールローディングコントロールとして、チューブリン (Thermo Scientific) を1:5000希釈で使用した。免疫活性バンドをECL Plus (Amersham) で可視化した。

10

20

30

40

50

【実施例 26】

【0385】

7マーSEQ ID #3225 LNA-アンチmiRによるmiR-221/222ファミリーの拮抗作用に関する機能的読出しとしてのp27タンパク質レベルの評価

先の研究 (le Sageら 2007、Galardiら, 2007) により、miR-221とmiR-222は、細胞周期調節に關与する腫瘍抑制因子遺伝子p27の発現を、転写後調節することが示されている。これらの研究では、miR-221およびmiR-222のダウンレギュレーションが、p27の発現レベルを増加させることが示された。そこで、7マーSEQ ID #3225 LNA-アンチmiRによるmiR-221/222ファミリーの拮抗作用に関する機能的読出しとして、本発明者らは、PC3細胞へのLNA-アンチmiR SEQ ID #3225のトランスフェクション後に、p27のタンパク質レベルを

10

【0386】

(結果) 図25に示すように、miR-221およびmiR-222のシード配列をターゲットとする7マーLNA-アンチmiR SEQ ID #3225のトランスフェクションは、非トランスフェクトPC3細胞または本発明者らのLNAスクランブル対照トランスフェクトPC3細胞と比較して、p27タンパク質レベルの用量依存的増加をもたらした。これらの結果は、7マーLNA-アンチmiRが、miR-221/222ファミリーを効果的に拮抗して、わずか5nMの濃度で直接のターゲットp27の抑制解除をタンパク質レベルでもたらしうことができるということを明確に証明している。

【0387】

(結論) miR-221/222ファミリー中のシード配列をターゲットとする完全にLNA修飾された7マーLNA-アンチmiRは、5nMで、両方のmiRNAを効果的に拮抗して、直接のターゲットp27の抑制解除をタンパク質レベルでもたらしうことができる。

20

【0388】

(材料と方法)

細胞株：ヒト前立腺癌PC3細胞株はECACCから購入した(#90112714)。PC3細胞は、10%ウシ胎仔血清、2mM Glutamaxおよび25 μg/mlゲンタマイシンを補足したDMEM培地で培養した。

トランスフェクション：トランスフェクションの前日に、6穴プレートに、1ウェルあたり250,000個の細胞を播種して、翌日には50%コンフルエントになるようにした。トランスフェクションの日に、PC3細胞に、さまざまな濃度のLNA-オリゴヌクレオチド(図25参照)をLipofectamine2000と共にトランスフェクトした。24時間後に、タンパク質抽出およびウェスタンブロット解析のために、細胞を収集した。

30

ウェスタンブロット：細胞をPBSで洗浄し、トリプシン処理し、エッペンドルフチューブに移し、50 μlの溶解バッファー(1×RIPA)を加えた。細胞溶解物を氷上に20分間置いてから、10,000rpmで10分間遠心した。等量(15 μlの細胞溶解物)を4-12%BIS-TRISゲルにのせた。iBlot (Invitrogen)を使用し、製造者の指示に従って、タンパク質をニトロセルロースメンブレンに転写した。メンブレンを1:1000希釈の一次モノクローナルマウス抗体p27 (BD Biosciences)と共に4で終夜インキュベートした。ローディングコントロールとして、チューブリン(Thermo Scientific)を1:5000希釈で使用した。免疫活性バンドをECL Plus (Amersham)で可視化した。

40

【実施例 27】

【0389】

7マーSEQ ID #3225 LNA-アンチmiRによるmiR-221/222のノックダウンはPC3細胞のコロニー形成を減少させる

細胞トランスフォーメーションの特徴は、半固形培地で足場非依存的に成長するという腫瘍細胞の能力である。そこで本発明者らは、がんに関連する表現型アッセイである軟寒天アッセイで腫瘍細胞の減少が測定されることから、このアッセイを行なった。本発明者らは、SEQ ID #3225(完全マッチ)およびSEQ ID #3231(スクランブル)をPC3細胞にトランスフェクトし、24時間後に、細胞を軟寒天にプレーティングした。12日後にコロニー

50

を計数した。SEQ ID #3225によるmiR-221およびmiR-222の阻害は、スクランブル対照LNA-アンチmiRと比較して、軟寒天中で成長するコロニーの量を減少させる（これは腫瘍細胞の減少を示す）ことができるということを、図26に示す。

【0390】

（結論）miR-221/222ファミリーをターゲットとする7マー（SEQ ID #3225）は、軟寒天におけるコロニーの数を減少させ、それは、PC3細胞の増殖停止を示す。

【0391】

（材料と方法）

細胞株：ヒト前立腺癌PC3細胞株はECACCから購入した（#90112714）。PC3細胞は、10%ウシ胎仔血清、2mM Glutamaxおよび25 μg/ml ゲンタマイシンを補足したDMEM培地で培養した

10

トランスフェクション：トランスフェクションの前日に、6穴プレートに、1ウェルあたり250,000個の細胞を播種して、翌日には50%コンフルエントになるようにした。トランスフェクションの日に、PC3細胞に25nMの異なるLNAオリゴヌクレオチドをLipofectamine 2000と共にトランスフェクトした。

軟寒天におけるクローン増殖：0.5%寒天を含有する基層上の0.35%寒天に 2.5×10^3 個のPC3細胞を播種した。トランスフェクションの24時間後に細胞をプレーティングした。プレートを湿潤培養器中、37℃、5%CO₂で12日間インキュベートし、0.005%クリスタルバイオレットで1時間染色した後、細胞を計数した。アッセイは3重に行なった。

【実施例28】

20

【0392】

let-7a前駆体miRNAおよびルシフェラーゼセンサーアッセイをトランスフェクトしたHuh-7細胞における6~9マーのLNA-アンチmiRによるlet-7拮抗作用の評価

miRNAのlet-7ファミリーのターゲットングおよび拮抗に関して、完全にLNA修飾された6~9マーのオリゴヌクレオチドの効率を評価するために、HMGA2 3'UTRのおよそ800bpを含有するルシフェラーゼセンサーコンストラクトを作製した。ベクターにクローニングされた配列は、Mayrら（Science, 2007）ならびにLeeおよびDutta（Genes Dev, 2007）が先に証明したとおり、7つの機能的let-7結合部位のうち4つ（部位2~5）を含有する。let-7阻害をモニターするために、肝細胞癌細胞株Huh-7（内在性let-7のレベルは低~非存在）に、ルシフェラーゼセンサーコンストラクト、let-7a前駆体miRNA、および増加する一連の濃度の6~9マーlet-7アンタゴニスト（SEQ ID #3232、-3233、-3227、-3234、-3235；図27参照）をトランスフェクトした。6~9マーLNA-アンチmiRを、陽性対照としての、let-7aに対する15マーであるSEQ ID #3226と比較した。24時間後に、ルシフェラーゼ活性を測定した。

30

【0393】

（結果）図28に示すように、完全にLNA修飾された8マーおよび9マーのLNA-アンチmiR（SEQ ID #3227、SEQ ID #3234、およびSEQ ID #3235）は、このルシフェラーゼアッセイにおけるlet-7ターゲットの抑制解除に関して、陽性対照15マーSEQ ID #3226と同様の力価を示す。これらの極めて強力な化合物では、完全なターゲット抑制解除が、1~5nMで早くも達成されるのに対し、7マーのSEQ ID #3233は、同じ効果を生み出すのにわずかに高い濃度（10nM）で存在する必要がある。しかし、6マーのSEQ ID #3232は、50nMという高濃度でさえ、効果を示さない。7~9マーおよび15マーのLNA-アンチmiRによるルシフェラーゼ活性の抑制解除は用量依存的であり、わずかに力価の低いSEQ ID #3233の場合は、それが特に明確である。

40

【0394】

（結論）結論として、8~9マーのLNA-アンチmiR（SEQ ID #3227、SEQ ID #3234、およびSEQ ID #3235）は、インビトロでのlet-7a阻害に関し、let-7aをターゲットとする15マーLNA-アンチmiR SEQ ID #3226と比較して、同等なアンタゴニスト力価を示す。強力な効果が、わずかに高濃度においてはああるが、7マーSEQ ID #3233でも見られたのに対し、6マーは試験した濃度では効果を持たない。

50

【 0 3 9 5 】

(材料と方法)

細胞株：肝細胞癌細胞株Huh-7は、R. Bartinschlager (ハイデルベルク大学分子ウイルス学科) から寄贈された。Huh-7細胞は、10% ウシ胎仔血清、2mM Glutamax、1×NEAAおよび25 μg/ml ゲンタマイシンを補足したDMEM培地で培養した。

トランスフェクション：トランスフェクションの前日に、96穴プレートに、1ウェルあたり8,000個の細胞を播種して、翌日には60~80%コンフルエントになるようにした。トランスフェクションの日に、各ウェル中のHuh-7細胞に、20ngのHMGA2 3'UTR/psiCHECK2プラスミド、let-7a前駆体miRNA (Dharmacon; 最終濃度10nM)、LNA-アンチmiR SEQ ID #3232、-3233、-3227、-3234、-3235、-3226; 最終濃度0~50nM) を、0.17 μlのLipofectamine 2000 (Invitrogen) と共に、製造者の指示に従ってトランスフェクトした。24時間後に、ルシフェラーゼ測定のために細胞を収集した。

ルシフェラーゼアッセイ：成長培地を捨て、30 μlの1×Passive Lysis Buffer (Promega) を各ウェルに加えた。オービタルシェーカー上で15~30分インキュベートした後、ウミシイタケおよびホタルルシフェラーゼ測定を、製造者の指示 (Promega) に従って行なった。

【実施例 2 9】

【 0 3 9 6 】

ルシフェラーゼセンサーアッセイをトランスフェクトしたHuh-7細胞における8マーおよび15マーのLNA-アンチmiRによる全let-7ファミリー拮抗作用の評価

miRNAの全let-7ファミリーの拮抗に関して、完全にLNA修飾された8マーオリゴヌクレオチドの効率を評価するために、先の実施例で述べたものと同じルシフェラーゼセンサーコンストラクトを使用した。ここでも、Huh-7細胞 (内在性let-7のレベルは低~非存在) に、センサーコンストラクト、ファミリーを代表するlet-7a、let-7d、let-7e、またはlet-7i前駆体の一つ、および増加する一連の濃度のアンタゴニストSEQ ID #3227をトランスフェクトした。8マーLNA-アンチmiRを、強力な陽性対照としての、let-7aに対する15マーであるSEQ ID #3226と比較した。24時間後に、ルシフェラーゼ活性を測定した。

【 0 3 9 7 】

(結果) 図29に示すように、完全にLNA修飾された8マーLNA-アンチmiR (SEQ ID #3227) は、ルシフェラーゼセンサーアッセイにおけるさまざまなlet-7ターゲットの抑制解除に関して、陽性対照15マーSEQ ID #3226と同様の力価を示す。8マーでは、ほぼ完全なターゲット抑制解除が、0.5~1nMで早くも達成される。ただし、let-7eプレmiR (図29C) は例外であって、この場合は、SEQ ID #3227の8つのヌクレオチドのうち7つがターゲットにハイブリダイズする。しかし、この場合は末端ミスマッチが存在するにもかかわらず、SEQ ID #3227は、5nMで完全なターゲット抑制解除をもたらす。陽性対照15マーは、すべての前駆体の強力な拮抗作用を示し、0.5nMでほぼ完全な抑制解除をもたらす。8マーおよび15マーのLNA-アンチmiRによるルシフェラーゼ活性の抑制解除は、4つのパネル (図29A~D) のすべてで認められるとおり、明確に用量依存的である。

【 0 3 9 8 】

(結論) 結論として、8マーLNA-アンチmiR (SEQ ID #3227) は、4つの代表的let-7ファミリーメンバーに対して、したがっておそらくはファミリー全体に対して、インビトロで強力なアンタゴニストである。15マーの陽性対照アンタゴニストであるSEQ ID #3226と比較して、8マーは、4つのターゲットのうち3つに関して、同等に強力であり、残る1つのlet-7eについては、力価がわずかに低かったが、これは、この場合における末端ミスマッチによって説明される。

【 0 3 9 9 】

(材料と方法)

細胞株：肝細胞癌細胞株Huh-7は、R. Bartinschlager (ハイデルベルク大学分子ウイルス学科) から寄贈された。Huh-7細胞は、10% ウシ胎仔血清、2mM Glutamax、1×NEAAおよび25 μg/ml ゲンタマイシンを補足したDMEM培地で培養した。

トランスフェクション：トランスフェクションの前日に、96穴プレートに、1ウェルあたり8,000個の細胞を播種して、翌日には60～80%コンフルエントになるようにした。トランスフェクションの日に、各ウェル中のHuh-7細胞に、20ngのHMGA2 3'UTR/psiCHECK2プラスミド、let-7a、-7d、-7e、または-7i前駆体miRNA (Dharmacon；最終濃度10nM)、およびLNA-アンチmiR (SEQ ID #3227およびSEQ ID #3226；最終濃度0～50nM)を、0.17 μlのLipofectamine2000 (Invitrogen)と共に、製造者の指示に従ってトランスフェクトした。24時間後に、ルシフェラーゼ測定のために細胞を収集した。

ルシフェラーゼアッセイ：成長培地を捨て、30 μlの1×Passive Lysis Buffer (Promega)を各ウェルに加えた。オービタルシェーカー上で15～30分インキュベートした後、ウミシイタケおよびホタルルシフェラーゼ測定を、製造者の指示 (Promega) に従って行なった。

10

【実施例30】

【0400】

ルシフェラーゼセンサーアッセイをトランスフェクトしたHeLa細胞における、8マー-LNA-アンチmiR SEQ ID #3227による、内在性let-7拮抗作用の評価

内在性let-7のターゲティングおよび拮抗に関する、完全にLNA修飾された8マーオリゴヌクレオチドの効率を決定するために、先の2つの実施例で述べたものと同じルシフェラーゼセンサーコンストラクトを、SEQ ID #3227と共に、子宮頸がん細胞株HeLa (これは、Q-PCRで決定すると、中～高レベルのlet-7を発現させている；データ未掲載) にトランスフェクトした。空psiCHECK-2ベクターを陰性対照として含めた。

20

【0401】

(結果) 図30に示すように、完全にLNA修飾された8マー-LNA-アンチmiR SEQ ID #3227は、内在性let-7の強力な拮抗作用を示し、5～10nMの濃度で完全なターゲット抑制解除をもたらす。ルシフェラーゼ活性の抑制解除は用量依存的であり、1nM付近で始まり、約10nMでプラトーに達する。

【0402】

(結論) 結論として、8マー-LNA-アンチmiR (SEQ ID #3227) は、インビトロで内在性let-7に対しても強力なアンタゴニストであり、したがってmiRNAファミリー全体を、短い完全にLNA修飾されたアンタゴニストでうまくターゲティングすることができるという決定的証拠になる。

30

【0403】

(材料と方法)

細胞株：子宮頸がん細胞株HeLaはATCCから購入した (#CCL-2 (商標))。HeLa細胞は10%ウシ胎仔血清、2mM Glutamax、1×NEAAおよび25 μg/mlゲンタマイシンを補足したイーグルMEM培地で培養した。

トランスフェクション：トランスフェクションの前日に、96穴プレートに1ウェルあたり8,000個の細胞を播種して、翌日には50～70%コンフルエントになるようにした。トランスフェクションの日に、各ウェル中のHeLa細胞に、20ngのHMGA2 3'UTR/psiCHECK2プラスミドまたはpsiCHECK-2 (空ベクター)、およびLNA-アンチmiR SEQ ID #3227 (最終濃度0～50nM)を、0.17 μlのLipofectamine2000 (Invitrogen)と共に、製造者の指示に従って同時トランスフェクトした。24時間後に、ルシフェラーゼ測定のために細胞を収集した。

40

ルシフェラーゼアッセイ：成長培地を捨て、30 μlの1×Passive Lysis Buffer (Promega)を各ウェルに加えた。オービタルシェーカー上で15～30分インキュベートした後、ウミシイタケおよびホタルルシフェラーゼ測定を、製造者の指示 (Promega) に従って行なった。

【実施例31】

【0404】

ヒト大腸癌細胞株HCT116における、8マー-LNA-アンチmiR-21 (#3205) と8マー (#3219) スクランブル対照LNAによる、miR-21拮抗作用の評価

本発明者らは、本願において、完全にLNA修飾されホスホロチオレート化された8マー-LN

50

A-アンチmiRがヒト子宮頸癌細胞株HeLa、ヒト乳癌細胞株MCF-7、ヒト前立腺がん細胞株PC3およびヒト肝細胞癌HepG2細胞株において、miR-21を効果的に拮抗することを、先に示した。本発明者らは、このスクリーニングアプローチをヒト大腸癌細胞株HCT116に拡張した。miR-21に対する8マーLNA-アンチmiRオリゴヌクレオチドの効率を評価するために、成熟miR-21用の完全マッチターゲット部位がウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子の3'UTR中にクローニングされたルシフェラーゼレポーターコンストラクトを作製した。miR-21阻害をモニターするために、HCT116細胞に、そのルシフェラーゼコンストラクトを、miR-21アンタゴニスト#3205（8マー）および特異性を比較するための8マーLNAスクランブル対照（#3219）と共にトランスフェクトした。24時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。

【0405】

（結果）ルシフェラーゼレポーター実験は、miR-21に対する8マーLNA-アンチmiR（#3205）によるルシフェラーゼmiR-21レポーター活性の用量依存的な抑制解除を示し、5nMで完全な抑制解除が得られた（図31）。8マー完全マッチと8マースクランブル対照の特異性を比較すると、スクランブル対照LNA-アンチmiR（#3219）は抑制解除を全く示さなかったことから、miR-21に対するLNA-アンチmiR化合物の高い特異性が証明された。

【0406】

（結論）8マー（#3205）はmiR-21のターゲティングに関して強力であり、#3205によるmiR-21の拮抗作用は特異的である。

【0407】

（材料と方法）

細胞株：ヒト大腸癌HCT116細胞株はATCCから購入した（CCL-247）。HCT116細胞は、10%ウシ胎仔血清および25 μg/mlゲンタマイシンを補足したRPMI培地で培養した。

トランスフェクション：12穴プレートに、1ウェルあたり110,000個の細胞を播種し、トランスフェクションを行なった。HCT116細胞に、0.3 μgのmiR-21ルシフェラーゼセンサープラスミドまたは空psiCHECK2ベクターを、1.2 μlのLipofectamine2000（Invitrogen）と共に、製造者の指示に従ってトランスフェクトした。さまざまな濃度のLNA-アンチmiRおよび対照オリゴヌクレオチドもトランスフェクトした。24時間後に、ルシフェラーゼ測定のために細胞を収集した。

ルシフェラーゼアッセイ：細胞をPBSで洗浄し、250 μlの1×Passive Lysis Buffer（Promega）をウェルに加えた。プレートを振盪機上に30分間置いた後、細胞溶解物をエッペンドルフチューブに移した。細胞溶解物を2,500rpmで10分間遠心分離した後、50 μlを96穴プレートに移し、製造者の指示（Promega）に従ってルシフェラーゼ測定を行なった。

【実施例32】

【0408】

8マー#3205 LNA-アンチmiRによるmiR-21のノックダウンはPC3細胞のコロニー形成を減少させる

細胞トランスフォーメーションの特徴は、半固形培地で足場非依存的に成長するという腫瘍細胞の能力である。そこで本発明者らは、がんに関連する表現型アッセイである軟寒天アッセイで腫瘍細胞の減少が測定されることから、このアッセイを行なった。本発明者らは、#3205（完全マッチLNA-アンチmiR-21）および#3219（LNAスクランブル対照）をPC3細胞にトランスフェクトし、24時間後に、細胞を軟寒天にプレーティングした。12日後にコロニーを計数した。#3205によるmiR-21の阻害は、スクランブル対照LNA処理対照または無処理対照（トランスフェクトはするが、LNAを添加しないもの）と比較して、軟寒天中で成長するコロニーの量を減少させる（これは腫瘍細胞の減少を示す）ことができるということを、図32に示す。

【0409】

（結論）miR-21ファミリーをターゲットとする8マー（#3205）は、軟寒天におけるコロニーの数を減少させ、それは、PC3細胞の増殖停止を示す。

【0410】

（材料と方法）

10

20

30

40

50

細胞株：ヒト前立腺癌PC3細胞株はECACCから購入した（#90112714）。PC3細胞は、10%ウシ胎仔血清、2mM Glutamaxおよび25 μg/ml ゲンタマイシンを補足したDMEM培地で培養した。

トランスフェクション：トランスフェクションの前日に、6穴プレートに、1ウェルあたり250,000個の細胞を播種して、翌日には50%コンフルエントになるようにした。トランスフェクションの日に、PC3細胞に、25nMの異なるLNAオリゴヌクレオチドをLipofectamine 2000と共にトランスフェクトした。

軟寒天におけるクローン増殖：0.5%寒天を含有する基層上の0.35%寒天に 2.5×10^3 個のPC3細胞を播種した。トランスフェクションの24時間後に細胞をプレーティングした。プレートを湿潤培養器中、37℃、5%CO₂で12日間インキュベートし、0.005%クリスタルバイオレットで1時間染色した後、細胞を計数した。アッセイは3重に行なった。

【実施例33】

【0411】

8マー-#3205 LNA-アンチmiRによるmiR-21のサイレンシングはHepG2細胞のコロニー形成を減少させる

ヒト肝細胞癌細胞株HepG2ではmiR-21が過剰発現される。これらの細胞では#3205を使ってmiR-21センサープラスミドのルシフェラーゼ活性を調節できることを、本発明者らは先に示した。HepG2細胞に#3205および#3219（スクランブル8マー）をトランスフェクトし、24時間後に軟寒天中にプレーティングした。17日後に顕微鏡でコロニーを計数した。

【0412】

（結果）#3205によるmiR-21の阻害は、軟寒天中で成長するコロニーの量を減少させる（これは増殖停止が起こったことを示す）ことができるということを、図33に示す。また、本発明者らのスクランブル8マー対照#3219はコロニーの数に有意な効果を持たなかった。

【0413】

（結論）miR-21をターゲットとする8マー（#3205）は、軟寒天におけるコロニーの数を減少させ、それは、HepG2細胞の増殖停止を示す。

【0414】

（材料と方法）

細胞株：ヒト肝細胞HepG2細胞株はECACCから購入した（#85011430）。HepG2細胞は、10%ウシ胎仔血清、2mM Glutamaxおよび25 μg/ml ゲンタマイシンを補足したEMEM培地で培養した。

トランスフェクション：6穴プレートに1ウェルあたり650,000個の細胞を播種し、リバーストランスフェクションを行なった。HepG2細胞に、0.6 μgのmiR-21ルシフェラーゼセンサープラスミドまたは空psiCHECK2ベクターを、2.55 μlのLipofectamine2000（Invitrogen）と一緒に、製造者の指示に従ってトランスフェクトした。LNA-アンチmiRおよび対照オリゴヌクレオチドもさまざまな濃度でトランスフェクトした。24時間後に、ルシフェラーゼ測定のために細胞を収集した。

軟寒天におけるクローン増殖：0.5%寒天を含有する基層上の0.35%寒天に 2.0×10^3 個のHepG2細胞を播種した。トランスフェクションの24時間後に細胞をプレーティングした。プレートを湿潤培養器中、37℃、5%CO₂で17日間インキュベートし、0.005%クリスタルバイオレットで1時間染色した後、細胞を計数した。アッセイは3重に行なった。

【実施例34】

【0415】

8マー-#3205 LNA-アンチmiRによるmiR-21のサイレンシングは、PC3細胞において、細胞移動を阻害する

細胞移動は、創傷治癒アッセイ（=引っ掻き傷アッセイ）を行なうことによってモニターすることができる。このアッセイでは、「引っ掻き傷」を細胞単層に作り、画像を最初にキャプチャすると共に、細胞移動中も定期的にキャプチャする。画像を比較することにより、細胞の移動速度を定量化することができる。これをヒト前立腺がん細胞株PC3で行

10

20

30

40

50

なった。細胞を播種し、3日目に、細胞にトランスフェクトし、翌日、100%コンフルエントに達したら、引っ掻き傷(=創傷)を作った。引っ掻き傷を作ったら、初期の創傷を記録するために写真撮影をした。その後、異なる時点において、フリーソフトウェアプログラムImage Jで、創傷閉鎖の面積を測定した。図34Aに示すように、PC3細胞は、25nMの#3205(完全マッチ、miR-21)、または対照#3219で処理されていたか、トランスフェクトされていなかった。24時間後に写真を撮影し、各時点における創傷閉鎖に関して、面積を計算した。非トランスフェクト細胞および対照#3219の場合、miR-21に対する本発明者らのLNA-アンチmiR、#3205と比較して、創傷閉鎖が速かったことから、#3205はmiR-21を阻害し、細胞の移動を妨げることが示された(図34B)。

【0416】

(結論)miR-21をターゲットとする8マー(#3205)は、非トランスフェクト細胞および対照トランスフェクト細胞と比較して、PC3細胞の細胞移動を阻害する。

【0417】

(材料と方法)

細胞株：ヒト前立腺癌PC3細胞株はECACCから購入した(#90112714)。PC3細胞は、10%ウシ胎仔血清、2mM Glutamaxおよび25 μg/mlゲンタマイシンを補足したDMEM培地で培養した。

引っ掻き傷アッセイ：トランスフェクションの3日前に、6穴プレートに、1ウェルあたり150,000個の細胞を播種して、翌日には100%コンフルエントになるようにした。トランスフェクションの24時間後に、細胞単層に200 μlチップで引っ掻き傷を作った。0時間時点および24時間後に、顕微鏡に接続したデジタルカメラを使って、写真を撮影した。ソフトウェアプログラムImage Jを使って創傷閉鎖を決定した。

【実施例35】

【0418】

miR-155を拮抗する完全にLNA置換されたLNA-アンチmiRの長さ評価

本発明者らは、先に、miR-21について、完全にLNA置換されたLNA-アンチmiRに関する長さ評価を示し、最も強力なLNA-アンチmiRが7nt、8ntまたは9nt長であることを示した。同じ実験をmiR-155で繰り返した。miR-155用の完全マッチターゲット部位を、レポータープラスミドpsiCHECK2中のルシフェラーゼ遺伝子の3'UTR内にクローニングし、それを、マウスRAWマクロファージ細胞株に、異なる長さの完全にLNA置換されたLNA-アンチmiRと一緒にトランスフェクトした。RAW細胞株ではmiR-155の内在性レベルが低いので、miR-155蓄積を誘発するために、細胞を100ng/ml LPSで24時間処理した。24時間後に、ルシフェラーゼ解析を行なった。

【0419】

(結果)図35に示すように、最も強力なLNA-アンチmiRは#3207(8nt)および#3241(9nt)であり、わずか0.25nMのLNA濃度で、ほぼ80%の抑制解除に達する。6マー(#3244)は有意な抑制解除を示さない。長さを12マー~14マー(#3242および#3243)に増加させると、miR-155レポーターの抑制解除の効率が下がることによって示されるとおり、力価が減少した。

【0420】

(結論)miR-155をターゲットとする最も強力な完全にLNA置換されたLNA-アンチmiRは8マーおよび9マー(#3207および#3241)だった。

【0421】

(材料と方法)

細胞株：マウスマクロファージRAW 264.7細胞株はATCCから購入した(TIB-71)。RAW細胞は、10%ウシ胎仔血清、4mM Glutamaxおよび25 μg/mlゲンタマイシンを補足したDMEM培地で培養した。

トランスフェクション：トランスフェクションの前日に、6穴プレートに、1ウェルあたり500,000個の細胞を播種して、翌日には50%コンフルエントになるようにした。トランスフェクションの日に、RAW 264.7細胞に、0.3 μgのmiR-155完全マッチ/psiCHECK2または空

10

20

30

40

50

psiCHECK2ベクターを、10 μ lのLipofectamine2000 (Invitrogen)と共に、製造者の指示に従ってトランスフェクトした。さまざまな濃度のLNA-アンチmiRもトランスフェクトした。miR-155蓄積を誘発するために、トランスフェクション複合体と共に4時間インキュベートしてから、LPS (100ng/ml)をRAW細胞に加えた。さらに24時間の後、ルシフェラーゼ測定のために細胞を収集した。

ルシフェラーゼアッセイ：細胞をPBSで洗浄し、セルスクレーパーで収集した後、細胞を2,500rpmで5分間遠心した。上清を捨て、50 μ lの1×Passive Lysis Buffer (Promega)を細胞ペレットに加えてから、細胞を氷上に30分間置いた。溶解した細胞を10,000rpmで30分間遠心した後、20 μ lを96穴プレートに移し、製造者の指示 (Promega)に従ってルシフェラーゼ測定を行なった。

【実施例36】

【0422】

miR-21をターゲットとする完全にLNA置換された8マー#3205 (LNA-アンチmiR-21)に関する血漿タンパク質結合

図36Aに示す実験における血漿中濃度において、血漿タンパク質は#3205で飽和されない。図36Bにおいて、広範囲にわたる血漿中#3205濃度で、タンパク質結合は#3205 LNA-アンチmiR-21の約95%である。50.1 μ M (174 μ g/mL)の#3205濃度では、FAM標識#3205に関して、血漿タンパク質の結合能は飽和されていなかった。

【0423】

(材料と方法)マウス血漿 (100 μ L)に、FAM標識#3205を、濃度が0.167、1.67、5.01、10.02、16.7、25.05および50.1 μ Mになるようにスパイクした。その溶液を37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。その溶液をMicrocon Ultracel YM-30フィルター (再生セルロース30,000MWCO)に移した。フィルターを微量遠心機中、2000g、室温で、20分間遠心した。濾液を5、10および20倍に希釈し、100 μ Lの試料をマイクロタイタープレート (Polystyrene Black NUNC-237108)に移した。FLUOstar Optima elisaリーダーを使って、励起波長458nmおよび蛍光波長520nmで蛍光を検出した。結合していないFAM標識#3205の量を、12の異なる濃度 (0.45~1000nM)でFAM標識#3205をスパイクした濾過血漿から作成した標準曲線から算出した。濾過血漿中0.167、1.67、5.01、10.02、16.7、25.05および50.1 μ Mの#3205濃度を使った濾過実験から確定された回収率の数値で、数値を補正した。FAM標識#3205の回収率は86%だった。

【実施例37】

【0424】

³⁵S標識#3205 LNA-アンチmiR-21の単回静脈内投与後の雌有色マウスにおける定量的全身オートラジオグラフィ試験

完全にLNA修飾された短いLNA-アンチmiR (#3205、8マー)の体内分布を決定するために、放射標識化合物の全身組織分布をマウスで調べた。³⁵S標識#3205を単回静脈内投与でマウスに投与し、5分から21日まで異なる時点で屠殺した。

【0425】

(表6(i))雌有色マウスにおける³⁵S標識#3205の単回静脈内投与後の個々の組織での濃度 (μ g#3205/g組織)。数字は各組織および比に関する3回の測定の平均値である。変動係数 (CV) は一般に約10%である。

10

20

30

40

【表 7】

組織	オリゴの最大濃度 (μg #3205/g 組織)	最大濃度到達時間 (時間)	$T_{1/2}$ (時間)
副腎	13.6	0.083	374
胆汁	4	1	
骨髄	7.2	0.083	411
脳	0.4	0.083	
褐色脂肪	8.8	0.083	
胃粘膜	10.1	0.083	
心臓血	26.2	0.083	10.3
腎臓皮質	58.7	24	104
肝臓	11.8	0.083	588
	10.7	24	
肺	13.2	0.083	289
リンパ節	5	0.083	262
	2.4	48	
リンパ	18.8	4	
	20.8	168	
心筋	8.1	0.083	662
卵巣	13	0.083	198
膵臓	5	0.083	
下垂体	6.7	0.083	
唾液腺	8.6	0.083	405
	5.5	168	
骨格筋	4.8	0.083	
皮膚色素	5.4	0.25	
脾臓	9.8	0.083	564
胸腺	3.8	0.083	185
甲状腺	10.9	0.083	592
尿	328.9	0.083	
子宮	9.6	0.25	177
ぶどう膜	13.6	0.083	
LOQ	0.045	0.083	
	0.033	24	
	0.03	168	

10

20

30

【0426】

(表6(ii)) 雌有色マウスにおける³⁵S標識#3205の単回静脈内投与後の組織対肝臓比

40

【表 8】

³⁵ S-#3205									
動物番号	10	11	12	13	14	15	16	17	18
生存時間 (時間)	0.083	0.25	1時間	4時間	24時間	48時間	96時間	168	504
臓器									
副腎	肝臓	肝臓	肝臓	肝臓	肝臓	肝臓	肝臓	肝臓	肝臓
胆汁	1.15	1.08	0.52	0.27	0.24	0.26	0.23	0.18	0.17
骨髄	0.03	0.11	0.55	0.10	0.03	0.07	0.04	0.03	0.04
脳	0.61	0.81	0.55	0.45	0.40	0.48	0.43	0.42	0.34
褐色脂肪	0.03	0.03	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
胃粘膜	0.75	0.57	0.29	0.12	0.07	0.12	0.08	0.10	0.07
心臓血	0.86	0.71	0.31	0.22	0.10	0.21	0.15	0.16	0.12
腎臓皮質	2.23	1.91	0.74	0.11	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
肝臓	2.87	3.94	6.45	6.95	5.51	6.68	3.92	2.24	0.40
肺	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
リンパ節	1.12	0.97	0.63	0.09	0.04	0.04	0.03	0.02	0.02
リンパ	0.43	0.30	0.25	0.19	0.11	0.32	0.20	0.17	0.12
心筋	0.82	1.09	1.78	2.78	1.03	2.05	1.62	3.17	1.89
卵巣	0.69	0.63	0.30	0.13	0.10	0.15	0.09	0.11	0.12
膵臓	1.10	1.40	0.61	0.31	0.27	0.28	0.21	0.21	0.08
下垂体	0.42	0.37	0.22	0.18	0.12	0.17	0.12	0.15	0.11
唾液腺	0.57	0.54	0.28	0.11	0.15	0.16	0.12	0.10	0.08
骨格筋	0.73	0.81	0.38	0.25	0.25	0.42	0.23	0.85	0.24
皮膚色素	0.40	0.28	0.14	0.04	0.02	0.04	0.03	0.03	0.03
脾臓	0.34	0.69	0.65	0.36	0.20	0.26	0.20	0.19	0.13
胸腺	0.83	0.86	0.44	0.32	0.24	0.34	0.35	0.29	0.31
甲状腺	0.32	0.31	0.14	0.07	0.09	0.08	0.05	0.04	0.02
尿	0.9	1.2	0.43	0.28	0.25	0.34	0.19	0.26	0.25
子宮	27.96	39.48	9.90	5.44	0.24	0.39	0.12	0.15	0.03
ぶどう膜	0.56	1.23	0.65	0.30	0.30	0.07	0.27	0.16	0.08

10

20

30

【0427】

(結論) #3205は、消失半減期が8~10時間という放射能の血中クリアランスを示す。高レベルの放射能が、腎臓皮質、リンパ、肝臓、骨髄、脾臓、卵巣および子宮で記録された。最も高レベルの放射能は腎臓皮質で記録され、#3205の場合、肝臓より5倍高いレベルを示した。#3205 LNA-アンチmiR-21の場合、腎臓皮質、リンパ、肝臓、骨髄および脾臓に、放射能の強い保持が見られた。

【0428】

(材料と方法)

投薬：投与前にすべてのマウスの重量を測定した。9匹の雌マウスに10mg/kgの³⁵S-#3205を尾静脈に静脈内投与した。各動物に与える体積は10mL/kgの試験製剤とした。比活性75.7 μCi/mg。個々のマウスを、#3205の投与の5分後、15分後、1時間後、4時間後、24時間後、2日後、4日後、7日後および21日後に屠殺した。全身オートラジオグラフィ：マウスをセボフルランで麻酔した後、直ちにヘプタンに浸漬し、ドライアイスで-80℃に冷却した(ABR-SOP-0130)。標準的方法ABR-SOP-0131に従って、凍結屠殺体を水性カルボキシメチルセルロース(CMC)のゲルに包埋し、エタノール中で凍結し、ドライアイス(-80℃)で冷却し、全身オートラジオグラフィ用矢状断切片を作成した。クリオミクロトーム(Leica CM 3600)を使って、約-20℃の温度で、各動物から20 μm切片を異なるレベルで切

40

50

り取った。得られた切片をテープ (Minnesota Mining and Manufacturing Co., No. 810) 上に捕捉し、放射性インクで連番を付した。-20 で約24時間凍結乾燥した後、選択した切片をマイラーホイルの薄層で覆い、イメージングプレート (富士、日本) 上に置いた。露光は、イメージングプレートを環境放射線から保護するために、-20 において、鉛遮蔽箱中の遮光カセットで行なった。露光後に、イメージングプレートを50 μmの画素サイズでスキャンし、生体イメージング解析システム (Bas 2500、富士、日本) を使用する、ABR-SOP-0214に記載のラジオルミノグラフィによって解析した。³⁵S放射能の水溶性標準試験溶液を全血と混合して、校正スケールの作成に使用した (ABR-SOP-0251)。ただし、異なる血液標準を500 μLのSoluene-35に溶解した。次に、溶解した試料に4.5mLのUltima Goldを加えた。³⁵Sと¹⁴Cは極めてよく似たエネルギースペクトルを持つので、異なる血液試料の放射能を決定する際には、標準的¹⁴C-プログラム (Packard 2200CA) を使用した。

10

【0429】

薬物動態計算：全血および組織において測定された³⁵S放射能を、nCi/g組織として表現し、薬物動態評価のために、nmol equiv/g組織へと再計算した。薬物動態パラメータ C_{max} 、 $t_{1/2}$ およびAUCを、WinNonlin Professional (Pharsight Corporation、米国カリフォルニア州マウンテンビュー) を使った非コンパートメント解析により、全血および組織について決定した。静脈内投与後に、濃度をゼロまで外挿し、これを(C_0)と表した。消失速度定数は、対数血漿中濃度-時間曲線の終末相の傾き (terminal slope) の線形回帰分析によって推定した。消失半減期 $t_{1/2}$ は、式： $t_{1/2} = \ln 2 /$ を使って計算した。別段の明記がない限り、消失半減期の計算には、LOQを上回る最後の3時点を使用した。

20

【実施例38】

【0430】

マウスの肺および腎臓におけるRasタンパク質定量によって決定される8マーLNA-アンチmiRによるインビボでのlet-7阻害の評価

インビボで豊富に発現されるlet-7ファミリーを拮抗する可能性を調べ得るために、マウスに8マーLNA-アンチmiRアンタゴニストまたは食塩水を静脈内 (i.v.) 注射した。処置効果を測定するために、タンパク質を肺および腎臓から単離した。タンパク質のRasファミリー (N-Ras、K-Ras、およびH-Ras)、特にN-RasおよびK-Rasはlet-7ファミリーによる調節 (抑制) を受けることが、Johnsonら (Cell, 2005) によって先に示されているので、目標は、これらのlet-7ターゲットがインビボで抑制解除されうるかどうかを解析することだった。

30

【0431】

(結果) 図37に示すように、8マーLNA-アンチmiRは、処置されたマウスの腎臓におけるRasタンパク質レベル (食塩水対照に対して標準化したもの) を強力に抑制解除した。この臓器におけるアップレギュレーションは3倍を上回り、明確なインビボ効果を示した。しかし肺では、わずかな (1.2倍の) Ras抑制解除しか観察されず (図1B)、この臓器に導入したLNA-アンチmiRの量は、Johnsonら (Cancer Research, 2007) が先に記載したようにその大量のlet-7を阻害するには、不十分であったことが示唆される。

【0432】

(結論) 8マーLNA-アンチmiRは、処置マウスおよび対照マウスにおけるRasタンパク質レベルの対比に基づいて評価すると、ターゲットlet-7 miRNAのインビボでの調節に、明確な効果を示す。効果は肺ではより小さく見えるものの、腎臓でのRasレベルは、アンチmiR-処置後の実質的アップレギュレーションを示す。

40

【0433】

(材料と方法) 動物および投薬：C57BL/6雌マウスを10mg/kgのLNA-アンチmiRまたは食塩水で3日間連続して処置し (0日目、1日目、および2日目)、4日目に屠殺した。肺および腎臓から得た組織試料を瞬間凍結し、さらなる加工を行なうまで-80 で保存した。ウェスタンブロット解析：食塩水処置マウスおよびLNA-アンチmiR処置マウスから得た肺および腎臓タンパク質を、1試料あたり100 μgを使って、NuPAGE Bis Tris 4-12% (Invit

50

rogen)で分離した。iBlot (Invitrogen)を使用し、製造者の指示に従って、タンパク質をニトロセルロースメンブレンに転写した。ブロッキング、抗体希釈および検出は、製造者の説明書に従って行なった。Ras検出には、一次ウサギ抗Ras抗体 (SC-3339, Santa Cruz Biotechnology) および二次HRPコンジュゲートブタ抗ウサギ抗体 (P0399, Dako) を使用し、チューブリン検出には、一次チューブリンアルファ (MS-581-P1, Neomarkers) および二次HRPコンジュゲートヤギ抗マウス抗体 (P0447, Dako) を使用した。

【実施例39】

【0434】

マウス腎臓におけるPdcd4タンパク質アップレギュレーションによって決定したmiR-21のターゲティングに関する8マーLNA-アンチmiR (#3205)のインビボ効力評価

10

本発明者らは、完全にLNA修飾された8マーLNA-アンチmiRがmiR-21を拮抗し、miR-21ターゲットPdcd4のタンパク質レベルをインビトロで調節する能力を持つことを示した。そこで本発明者らは、インビボでのLNA-アンチmiRの効果を決定するために、LNA-アンチmiRをマウスに注射した。マウスには、25mg/kgの#3205をi.v.注射により、1日おきに14日間(全部で5回)投与した。14日目にマウスを屠殺し、腎臓を摘出し、タンパク質を単離した。ターゲット調節を決定するために、ウェスタンブロット解析を行なった。

【0435】

(結果) 図37に示すように、#3205によるマウスの処置は、食塩水対照と比較して著しく増加したPdcd4タンパク質レベルを示した。標準化したPdcd4対Gapdh比は両方の食塩水試料で合致したが、2匹のLNA-アンチmiR処置(#32059マウスにおけるタンパク質アップレギュレーションは、それぞれ3.3倍および6.3倍と測定され、#3205 8マーLNA-アンチmiRのインビボ薬理効果が証明された。

20

【0436】

(結論) 完全にLNA修飾された8マーLNA-アンチmiR #3205は、実証されたmiR-21ターゲットであるPdcd4のマウス腎臓レベルを抑制解除(アップレギュレート)するその能力によって証明されるとおり、インビボでmiR-21を拮抗する。

【0437】

(材料と方法)

動物および投薬：初回投薬時の体重が平均20gのC57BL/6雌マウスをすべての実験で使用し、マウスには通常飼料(Altromin no 1324, Brogaarden, デンマーク・ゲントフトテ)を与えた。物質は生理食塩水(0.9%NaCl)中に製剤した。動物には、25mg/kgを1日おきに14日間、全部で5回注射することにより、LNA-アンチmiRまたは食塩水(0.9%NaCl)を投与した。14日目に動物を屠殺した。

30

ウェスタンブロット解析：食塩水処置マウスまたはLNA処置マウスから得た80µgの腎臓組織を、NuPAGE Bis Tris 4-12% (Invitrogen)で分離した。iBlot (Invitrogen)を使用し、製造者の指示に従って、タンパク質をニトロセルロースメンブレンに転写した。メンブレンをPdcd4抗体(Bethyl Laboratories)と共にインキュベートした後、HRP-コンジュゲートブタ抗ウサギ抗体(Dako)と共にインキュベートした。イコールローディングコントロールとして、GAPDH (Abcam)を使用し、続いてHRP-コンジュゲートブタ抗マウス抗体を使用した。メンブレンを化学ルミネセンス(ECL, Amersham)で可視化した。

40

【0438】

(表1)

【表 9 - 1】

マイクロRNA	マイクロRNA配列	配列番号	9マー	配列番号	8マー	配列番号	7マー	配列番号
ebv-miR-BART1-3p	UAGCACCGCUAUCCACUAUGUC	40	AGCGGTG CT	977	GCGGTGC T	1914	CGGTGC T	2851
ebv-miR-BART1-5p	UCUUAGUGGAAGUGACGUGCUGUG	41	TCCACTA AG	978	CCACTAA G	1915	CACTAA G	2852
ebv-miR-BART10	UACAUAACCAUGGAGUUGGCUUGU	42	TGGTTAT GT	979	GGTTATG T	1916	GTTATG T	2853
ebv-miR-BART10*	GCCACCUCUUUGGUUCUGUAC	43	AAGAGGT GG	980	AGAGGTG G	1917	GAGGTG G	2854
ebv-miR-BART11-3p	ACGCACACCAGGCUGACUGCC	44	TGGTGTG CG	981	GGTGTGC G	1918	GTGTGC G	2855
ebv-miR-BART11-5p	UCAGACAGUUUGGUGCGCUAGUUG	45	AACTGTC TG	982	ACTGTCT G	1919	CTGTCT G	2856
ebv-miR-BART12	UCCUGUGGUGUUUGGUGUGG	46	CACCACA GG	983	ACCACAG G	1920	CCACAG G	2857
ebv-miR-BART13	UGUAACUUGCCAGGGACGGCU	47	GCAAGTT AC	984	CAAGTTA C	1921	AAGTTA C	2858
ebv-miR-BART13*	AACCGGCUCGUGGCUCGUACA	48	CGAGCCG GT	985	GAGCCGG T	1922	AGCCGG T	2859
ebv-miR-BART14	UAAAUGCUGCAGUAGUAGGGA	49	GCAGCAT TT	986	CAGCATT T	1923	AGCATT T	2860

10

20

30

40

50

【表 9 - 2】

ebv-miR-BART14*	UACCCUACGCUGCCGAUUUAC A	50	GCGTAGG GT	987	CGTAGGG T	1924	GTAGGG T	2861
ebv-miR-BART15	GUCAGUGGUUUUGUUUCCUU GA	51	AACCACT GA	988	ACCACTG A	1925	CCACTG A	2862
ebv-miR-BART16	UUAGAUAGAGUGGGUGUGUGC UCU	52	CTCTATC TA	989	TCTATCTA T	1926	CTATCT A	2863
ebv-miR-BART17-3p	UGUAUGCCUGGUGUCCUUU AGU	53	CAGGCAT AC	990	AGGCATA C	1927	GGCATA C	2864
ebv-miR-BART17-5p	UAAGAGGACGCAGGCAUACAA G	54	CGTCCTC TT	991	GTCCTCT T	1928	TCCTCT T	2865
ebv-miR-BART18-3p	UAUCGGAAGUUUGGGCUUCGU C	55	ACTTCCG AT	992	CTTCCGA T	1929	TTCCGA T	2866
ebv-miR-BART18-5p	UCAAGUUCGCACUCCUUAUAC A	56	GCGAACT TG	993	CGAACTT G	1930	GAACTT G	2867
ebv-miR-BART19-3p	UUUUGUUUGCUUGGGAAUGCU C	57	GCAAACA AA	994	CAAACAA A	1931	AAACAA A	2868
ebv-miR-BART19-5p	ACAUUCCCCGCAAACAUGACA UG	58	CGGGGAA TG	995	GGGGAAT G	1932	GGAAT G	2869
ebv-miR-BART2-3p	AAGGAGCGAUUUGGAGAAAAU AAA	59	ATCGCTC CT	996	TCGCTCC T	1933	CGCTCC T	2870
ebv-miR-BART2-5p	UAUUUUCUGCAUUCGCCUUG C	60	GCAGAAA AT	997	CAGAAA T	1934	AGAAA T	2871
ebv-miR-BART20-3p	CAUGAAGGCACAGCCUGUUAC C	61	TGCCTTC AT	998	GCCTTCA T	1935	CCTTCA T	2872

10

20

30

40

50

【表 9 - 3】

ebv-miR-BART20-5p	UAGCAGGCAUGUCUUCAUUC	62	ATGCCTG CT	999	TGCCTGC T	1936	GCCTGC T	2873
ebv-miR-BART3	CGCACCACUAGUCACCAGGUG U	63	TAGTGGT GC	1000	AGTGGTG C	1937	GTGGTG C	2874
ebv-miR-BART3*	ACCUAGUGUUAGUGUUGUGCU	64	AACACTA GG	1001	ACACTAG G	1938	CACTAG G	2875
ebv-miR-BART4	GACCUGAUGCUGCUGGUGUG CU	65	GCATCAG GT	1002	CATCAGG T	1939	ATCAGG T	2876
ebv-miR-BART5	CAAGGUGAAUAGCUGCCCA UCG	66	ATTACCC TT	1003	TTCACCT T	1940	TCACCT T	2877
ebv-miR-BART6-3p	CGGGGAUCGGACUAGCCUAG A	67	CCGATCC CC	1004	CGATCCC C	1941	GATCCC C	2878
ebv-miR-BART6-5p	UAAGGUUGGUCCAAUCCAUAG G	68	ACCAACC TT	1005	CCAACCT T	1942	CAACCT T	2879
ebv-miR-BART7	CAUCAUAGUCCAGUGUCCAGG G	69	GACTATG AT	1006	ACTATGA T	1943	CTATGA T	2880
ebv-miR-BART7*	CCUGGACCUUGACUAUGAAAC A	70	AAGGTCC AG	1007	AGGTCCA G	1944	GGTCCA G	2881
ebv-miR-BART8	UACGGUUUCCUAGAUUGUACA G	71	GGAAACC GT	1008	GAAACCG T	1945	AAACCG T	2882
ebv-miR-BART8*	GUCACAAUCUAUGGGGUCGUA GA	72	AGATTGT GA	1009	GATTGTG A	1946	ATTGTG A	2883
ebv-miR-BART9	UAACACUUCAUGGGUCCCGUA GU	73	TGAAGTG TT	1010	GAAGTGT T	1947	AAGTGT T	2884
ebv-miR-BART9*	UACUGGACCCUGAAUUGGAAA C	74	GGGTCCA GT	1011	GGTCCAG T	1948	GTCCAG T	2885
ebv-miR-BHRF1-1	UAACCUGAUCAGCCCCGGAGU U	75	GATCAGG TT	1012	ATCAGGT T	1949	TCAGGT T	2886
ebv-miR-BHRF1-2	UAUCUUUUGCGGCAGAAUUG A	76	GCAAAAAG AT	1013	CAAAAAGA T	1950	AAAAGA T	2887
ebv-miR-BHRF1-2*	AAAUUCUGUUGCAGCAGAUAG C	77	AACAGAA TT	1014	ACAGAAT T	1951	CAGAAT T	2888
ebv-miR-BHRF1-3	UAACGGGAAGUGUGUAAGCAC A	78	CTTCCCG TT	1015	TTCCCGT T	1952	TCCCGT T	2889

10

20

30

40

50

【表 9 - 4】

hcmv-miR-UL112	AAGUGACGGUGAGAUC CAGGC U	79	ACCGTCA CT	1016	CCGTCAC T	1953	CGTCAC T	2890
hcmv-miR-UL148D	UCGUCCUCCCCUUCUUCACC G	80	GGGAGGA CG	1017	GGAGGAC G	1954	GAGGAC G	2891
hcmv-miR-UL22A	UAACUAGCCUUC CCGUGAGA U	81	AGGCTAG TT	1018	GGCTAGT T	1955	GCTAGT T	2892
hcmv-miR-UL22A*	UCACCAGAAUGCUAGUUUGUA G	82	ATTCTGG TG	1019	TTCTGGT G	1956	TCTGGT G	2893
hcmv-miR-UL36	UCGUUGAAGACACCUGGAAAG A	83	TCTTCAA CG	1020	CTTCAAC G	1957	TTCAAC G	2894
hcmv-miR-UL36*	UUUCCAGGUGUUUUCAACGUG C	84	CACCTGG AA	1021	ACCTGGA A	1958	CCTGGA A	2895
hcmv-miR-UL70-3p	GGGGAUGGGCUGGCGCGCGG G	85	GCCCATC CC	1022	CCCATCC C	1959	CCATCC C	2896
hcmv-miR-UL70-5p	UGCGUCUCGGCCUCGUCCAG A	86	CCGAGAC GC	1023	CGAGACG C	1960	GAGACG C	2897
hcmv-miR-US25-1	AACCGCUCAGUGGCUCGGACC C	87	CTGAGCG GT	1024	TGAGCGG T	1961	GAGCGG T	2898
hcmv-miR-US25-1*	UCCGAACGCUAGGUCGGUUCU C	88	AGCGTTC GG	1025	GCGTTCG G	1962	CGTTCG G	2899
hcmv-miR-US25-2-3p	AUCCACUUGGAGAGCUCCCGC GG	89	CCAAGTG GA	1026	CAAGTGG A	1963	AAGTGG A	2900
hcmv-miR-US25-2-5p	AGCGGUCUGUUCAGGUGGAU GA	90	ACAGACC GC	1027	CAGACCG C	1964	AGACCG C	2901
hcmv-miR-US33-3p	UCACGGUCCGAGCACAUCCA U	91	CGGACCG TG	1028	GGACCGT G	1965	GACCGT G	2902
hcmv-miR-US33-5p	GAUUGUGCCCGGACCGUGGG CG	92	GGGCACA AT	1029	GGCACAA T	1966	GCACAA T	2903
hcmv-miR-US4	CGACAUGGACGUGCAGGGGG AU	93	GTCCATG TC	1030	TCCATGT C	1967	CCATGT C	2904
hcmv-miR-US5-1	UGACAAGCCUGACGAGAGCGU U	94	AGGCTTG TC	1031	GGCTTGT C	1968	GCTTGT C	2905

10

20

30

40

50

【表 9 - 5】

hcmv-miR-US5-2	UUAUGAUAGGUGUGACGAUGU C	95	CCTATCA TA	1032	CTATCAT A	1969	TATCAT A	2906
hsa-let-7a	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGU U	96	TACTACC TC	1033	ACTACCT C	1970	CTACCT C	2907
hsa-let-7a*	CUAUACAAUCUACUGUCUUUC C	97	GATTGTA TA	1034	ATTGTATA A	1971	TTGTAT A	2908
hsa-let-7b	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGG UU	98	TACTACC TC	1035	ACTACCT C	1972	CTACCT C	2909
hsa-let-7b*	CUAUACAACCUACUGCCUUC C	99	GGTTGTA TA	1036	GTTGTAT A	1973	TTGTAT A	2910
hsa-let-7c	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGU U	100	TACTACC TC	1037	ACTACCT C	1974	CTACCT C	2911
hsa-let-7c*	UAGAGUUACACCCUGGGAGUU A	101	TGTAACCT CT	1038	GTAACCTC T	1975	TAACCTC T	2912
hsa-let-7d	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGU U	102	TACTACC TC	1039	ACTACCT C	1976	CTACCT C	2913
hsa-let-7d*	CUAUACGACCUGCUGCCUUC U	103	GGTCGTA TA	1040	GTCGTAT A	1977	TCGTAT A	2914
hsa-let-7e	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGU U	104	TCCTACC TC	1041	CCTACCT C	1978	CTACCT C	2915
hsa-let-7e*	CUAUACGGCCUCCUAGCUUC C	105	GGCCGTA TA	1042	GCCGTAT A	1979	CCGTAT A	2916
hsa-let-7f	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGU U	106	TACTACC TC	1043	ACTACCT C	1980	CTACCT C	2917
hsa-let-7f-1*	CUAUACAAUCUAAUUGCCUUC C	107	GATTGTA TA	1044	ATTGTATA A	1981	TTGTAT A	2918
hsa-let-7f-2*	CUAUACAGUCUACUGUCUUUC C	108	GACTGTA TA	1045	ACTGTAT A	1982	CTGTAT A	2919
hsa-let-7g	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGU U	109	TACTACC TC	1046	ACTACCT C	1983	CTACCT C	2920

10

20

30

40

50

【表 9 - 6】

hsa-let-7g*	CUGUACAGGCCACUGCCUUGC	110	GCCTGTA CA	1047	CCTGTAC A	1984	CTGTAC A	2921
hsa-let-7i	UGAGGUAGUAGUUUGUGCUGU U	111	TACTACC TC	1048	ACTACCT C	1985	CTACCT C	2922
hsa-let-7i*	CUGCGCAAGCUACUGCCUUGC U	112	GCTTGCG CA	1049	CTTGCGC A	1986	TTGCGC A	2923
hsa-miR-1	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA U	113	TTACATTC C	1050	TACATTC C	1987	ACATTC C	2924
hsa-miR-100	AACCCGUAGAUCCGAACUUGU G	114	TCTACGG GT	1051	CTACGGG T	1988	TACGGG T	2925
hsa-miR-100*	CAAGCUUGUAUCUAUAGGUAU G	115	TACAAGC TT	1052	ACAAGCT T	1989	CAAGCT T	2926
hsa-miR-101	UACAGUACUGUGUAACUGAA U	116	CAGTACT GT	1053	AGTACTG T	1990	GTA CTG T	2927
hsa-miR-101*	CAGUUAUCACAGUGCUGAUGC U	117	GTGATAA CT	1054	TGATAAC T	1991	GATAAC T	2928
hsa-miR-103	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAU GA	118	CAATGCT GC	1055	AATGCTG C	1992	ATGCTG C	2929
hsa-miR-103-as	UCAUAGCCCUGUACAAUGCUG CU	119	AGGGCTA TG	1056	GGGCTAT G	1993	GGCTAT G	2930
hsa-miR-105	UCAA AUGCUCAGACUCCUGUG GU	120	GAGCATT TG	1057	AGCATT T G	1994	GCATT T G	2931
hsa-miR-105*	ACGGAUGUUUGAGCAUGUGCU A	121	AAACATC CG	1058	AACATCC G	1995	ACATCC G	2932
hsa-miR-106a	AAAAGUGCUUACAGUGCAGGU AG	122	AAGCACT TT	1059	AGCACTT T	1996	GCACTT T	2933
hsa-miR-106a*	CUGCAAUGUAAGCACUUCUUA C	123	TACATTG CA	1060	ACATTGC A	1997	CATTGC A	2934
hsa-miR-106b	UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU U	124	CAGCACT TT	1061	AGCACTT T	1998	GCACTT T	2935
hsa-miR-106b*	CCGCACUGUGGGUACUUGCU GC	125	CACAGTG CG	1062	ACAGTGC G	1999	CAGTGC G	2936
hsa-miR-107	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAU CA	126	CAATGCT GC	1063	AATGCTG C	2000	ATGCTG C	2937

10

20

30

40

50

【表 9 - 7】

hsa-miR-10a	UACCCUGUAGAUCCGAAUUUG UG	127	CTACAGG GT	1064	TACAGGG T	2001	ACAGGG T	2938
hsa-miR-10a*	CAAAUUCGUUUCUAGGGGAU A	128	TACGAAT TT	1065	ACGAATT T	2002	CGAATT T	2939
hsa-miR-10b	UACCCUGUAGAACCGAAUUUG UG	129	CTACAGG GT	1066	TACAGGG T	2003	ACAGGG T	2940
hsa-miR-10b*	ACAGAUUCGAUUCUAGGGGAA U	130	TCGAATC TG	1067	CGAATCT G	2004	GAATCT G	2941
hsa-miR-1178	UUGCUCACUGUUCUCCCUAG G	131	CAGTGAG CA	1068	AGTGAGC A	2005	GTGAGC A	2942
hsa-miR-1179	AAGCAUUCUUUCAUUGGUUG G	132	AAGAATG CT	1069	AGAATGC T	2006	GAATGC T	2943
hsa-miR-1180	UUUCCGGCUCGCGUGGGUGU GU	133	GAGCCGG AA	1070	AGCCGGA A	2007	GCCGGA A	2944
hsa-miR-1181	CCGUCGCCGCCACCCGAGCC G	134	GCGGCGA CG	1071	CGGCGAC G	2008	GGCGAC G	2945
hsa-miR-1182	GAGGGUCUUGGGAGGGAUGU GAC	135	CAAGACC CT	1072	AAGACCC T	2009	AGACCC T	2946
hsa-miR-1183	CACUGUAGGUGAUGGUGAGAG UGGGCA	136	ACCTACA GT	1073	CCTACAG T	2010	CTACAG T	2947
hsa-miR-1184	CCUGCAGCGACUUGAUGGCUU CC	137	TGGCTGC AG	1074	CGCTGCA G	2011	GCTGCA G	2948
hsa-miR-1185	AGAGGAUACCCUUUGUAUGUU U	138	GGTATCC TC	1075	GTATCCT C	2012	TATCCT C	2949
hsa-miR-1197	UAGGACACAUGGUCUACUUCU U	139	ATGTGTC CT	1076	TGTGTCC T	2013	GTGTCC T	2950
hsa-miR-1200	CUCCUGAGCCAUUCUGAGCCU C	140	GGCTCAG GA	1077	GCTCAGG A	2014	CTCAGG A	2951
hsa-miR-1201	AGCCUGAUUAAACACAUGCUC UGA	141	TAATCAG GC	1078	AATCAGG C	2015	ATCAGG C	2952
hsa-miR-1202	GUGCCAGCUGCAGUGGGGGA G	142	CAGCTGG CA	1079	AGCTGGC A	2016	GCTGGC A	2953
hsa-miR-1203	CCCGGAGCCAGGAUGCAGCU C	143	TGGCTCC GG	1080	GGCTCCG G	2017	GCTCCG G	2954

10

20

30

40

50

【表 9 - 8】

hsa-miR-1204	UCGUGGCCUGGUCUCCAUA U	144	CAGGCCA CG	1081	AGGCCAC G	2018	GGCCAC G	2955
hsa-miR-1205	UCUGCAGGGUUUGCUUUGAG	145	ACCCTGC AG	1082	CCCTGCA G	2019	CCTGCA G	2956
hsa-miR-1206	UGUUCAUGUAGAUGUUUAAGC	146	TACATGA AC	1083	ACATGAA C	2020	CATGAA C	2957
hsa-miR-1207-3p	UCAGCUGGCCCUCAUUUC	147	GGCCAGC TG	1084	GCCAGCT G	2021	CCAGCT G	2958
hsa-miR-1207-5p	UGGCAGGGAGGCUGGGAGGG G	148	CTCCCTG CC	1085	TCCCTGC C	2022	CCCTGC C	2959
hsa-miR-1208	UCACUGUUCAGACAGGCGGA	149	TGAACAG TG	1086	GAACAGT G	2023	AACAGT G	2960
hsa-miR-122	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUU G	150	TCACACT CC	1087	CACACTC C	2024	ACACTC C	2961
hsa-miR-122*	AAGCCAUUAUCACACUAAU A	151	TAATGGC GT	1088	AATGGCG T	2025	ATGGCG T	2962
hsa-miR-1224-3p	CCCCACCUCCUCUCUCCUCAG	152	GGAGGTG GG	1089	GAGGTGG G	2026	AGGTGG G	2963
hsa-miR-1224-5p	GUGAGGACUCGGGAGGUGG	153	GAGTCCT CA	1090	AGTCCTC A	2027	GTCCTC A	2964
hsa-miR-1225-3p	UGAGCCCCUGUGCCGCCCCC AG	154	CAGGGGC TC	1091	AGGGGCT C	2028	GGGGCT C	2965
hsa-miR-1225-5p	GUGGGUACGGCCAGUGGGG GG	155	CCGTACC CA	1092	CGTACCC A	2029	GTACCC A	2966
hsa-miR-1226	UCACCAGCCCUGUGUCCCUA G	156	GGGCTGG TG	1093	GGCTGGT G	2030	GCTGGT G	2967
hsa-miR-1226*	GUGAGGGCAUGCAGGCCUGG AUGGGG	157	ATGCCCT CA	1094	TGCCCTC A	2031	GCCCTC A	2968
hsa-miR-1227	CGUGCCACCCUUUCCCCAG	158	GGGTGGC AC	1095	GGTGGCA C	2032	GTGGCA C	2969
hsa-miR-1228	UCACACCUGCCUCGCCCCC U	159	GCAGGTG TG	1096	CAGGTGT G	2033	AGGTGT G	2970

10

20

30

40

50

【表 9 - 9】

hsa-miR-1228*	GUGGGCGGGGGCAGGUGUGU G	160	CCCCGCC CA	1097	CCCGCCC A	2034	CCGCC A	2971
hsa-miR-1229	CUCUCACCACUGCCCUCCAC AG	161	GTGGTGA GA	1098	TGGTGAG A	2035	GGTGAG A	2972
hsa-miR-1231	GUGUCUGGGGGACAGCUGC	162	GCCCAGA CA	1099	CCCAGAC A	2036	CCAGAC A	2973
hsa-miR-1233	UGAGCCUGUCCUCCCGCAG	163	ACAGGGC TC	1100	CAGGGCT C	2037	AGGGCT C	2974
hsa-miR-1234	UCGGCCUGACCACCCACCCCA C	164	GTCAGGC CG	1101	TCAGGCC G	2038	CAGGCC G	2975
hsa-miR-1236	CCUCUCCCCUUGUCUCUCCA G	165	GGGGAAG AG	1102	GGGAAGA G	2039	GGAAGA G	2976
hsa-miR-1237	UCCUUCUGCUCCGUCCCCCA G	166	AGCAGAA GG	1103	GCAGAAG G	2040	CAGAAG G	2977
hsa-miR-1238	CUUCCUCGUCUGUCUGCCCC	167	GACGAGG AA	1104	ACGAGGA A	2041	CGAGGA A	2978
hsa-miR-124	UAAGGCACGCGGUGAAUGCC	168	GCGTGCC TT	1105	CGTGCCT T	2042	GTGCCT T	2979
hsa-miR-124*	CGUGUUCACAGCGGACCUUGA U	169	TGTGAAC AC	1106	GTGAACA C	2043	TGAACA C	2980
hsa-miR-1243	AACUGGAUCAAUUAGGAGU G	170	TGATCCA GT	1107	GATCCAG T	2044	ATCCAG T	2981
hsa-miR-1244	AAGUAGUUGGUUGUAUGAGA UGGUU	171	CCAACTA CT	1108	CAACTAC T	2045	AACTAC T	2982
hsa-miR-1245	AAGUGAUCUAAAGGCCUACAU	172	TAGATCA CT	1109	AGATCAC T	2046	GATCAC T	2983
hsa-miR-1246	AAUGGAUUUUUGGAGCAGG	173	AAAATCC AT	1110	AAATCCA T	2047	AATCCA T	2984
hsa-miR-1247	ACCCGUCCCGUUCGUCCCCG GA	174	CGGGACG GG	1111	GGGACGG G	2048	GGACGG G	2985
hsa-miR-1248	ACCUUCUUGUAUAAGCACUGU GCUAAA	175	ACAAGAA GG	1112	CAAGAAG G	2049	AAGAAG G	2986
hsa-miR-1249	ACGCCUUCUUUUUUUUUU CA	176	GGAAGGG CG	1113	GAAGGGC G	2050	AAGGGC G	2987

10

20

30

40

50

【表 9 - 10】

hsa-miR-1250	ACGGUGCUGGAUGUGGCCUU U	177	CCAGCAC CG	1114	CAGCACC G	2051	AGCACC G	2988
hsa-miR-1251	ACUCUAGCUGCCAAAGGCGCU	178	CAGCTAG AG	1115	AGCTAGA G	2052	GCTAGA G	2989
hsa-miR-1252	AGAAGGAAAUUGAAUUCAUUU A	179	ATTCCTT C	1116	TTTCCTTC	2053	TTCCTT C	2990
hsa-miR-1253	AGAGAAGAAGAUCAGCCUGCA	180	CTTCTTCT C	1117	TTCTTCTC	2054	TCTTCT C	2991
hsa-miR-1254	AGCCUGGAAGCUGGAGCCUG CAGU	181	CTTCCAG GC	1118	TTCCAGG C	2055	TCCAGG C	2992
hsa-miR-1255a	AGGAUGAGCAAAGAAAGUAGA UU	182	TGCTCAT CC	1119	GCTCATC C	2056	CTCATC C	2993
hsa-miR-1255b	CGGAUGAGCAAAGAAAGUGGU U	183	TGCTCAT CC	1120	GCTCATC C	2057	CTCATC C	2994
hsa-miR-1256	AGGCAUUGACUUCUCACUAGC U	184	GTCAATG CC	1121	TCAATGC C	2058	CAATGC C	2995
hsa-miR-1257	AGUGAAUGAUGGGUUCUGACC	185	ATCATTC AC	1122	TCATTCA C	2059	CATTCA C	2996
hsa-miR-1258	AGUUAGGAUUAGGUCGUGGAA	186	AATCCTA AC	1123	ATCCTAA C	2060	TCCTAA C	2997
hsa-miR-1259	AUAUAUGAUGACUUAGCUUUU	187	CATCATA TA	1124	ATCATATA	2061	TCATAT A	2998
hsa-miR-125a-3p	ACAGGUGAGGUUCUUGGGAG CC	188	CCTCACC TG	1125	CTCACCT G	2062	TCACCT G	2999
hsa-miR-125a-5p	UCCCUGAGACCCUUUAACCUG UGA	189	GTCTCAG GG	1126	TCTCAGG G	2063	CTCAGG G	3000
hsa-miR-125b	UCCCUGAGACCCUAACUUGUG A	190	GTCTCAG GG	1127	TCTCAGG G	2064	CTCAGG G	3001
hsa-miR-125b-1*	ACGGGUUAGGCUCUUGGGAG CU	191	CCTAACC CG	1128	CTAACCC G	2065	TAACCC G	3002
hsa-miR-125b-2*	UCACAAGUCAGGCUCUUGGGA C	192	TGACTTG TG	1129	GACTTGT G	2066	ACTTGT G	3003

10

20

30

40

50

【表 9 - 1 1】

hsa-miR-126	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGC G	193	CACGGTA CG	1130	ACGGTAC G	2067	CGGTAC G	3004
hsa-miR-126*	CAUUUUUACUUUUGGUACGCCG	194	AGTAATA AT	1131	GTAATAAT	2068	TAATAA T	3005
hsa-miR-1260	AUCCCACCUCUGCCACCA	195	GAGGTGG GA	1132	AGGTGGG A	2069	GGTGGG A	3006
hsa-miR-1261	AUGGAUAAGGCUUUGGCUU	196	CCTTATC CA	1133	CTTATCC A	2070	TTATCC A	3007
hsa-miR-1262	AUGGGUGAAUUGUAGAAGGA U	197	ATTCACC CA	1134	TTCACCC A	2071	TCACCC A	3008
hsa-miR-1263	AUGGUACCCUGGCAUACUGAG U	198	AGGGTAC CA	1135	GGGTACC A	2072	GGTACC A	3009
hsa-miR-1264	CAAGUCUUUUUGAGCACCUG UU	199	ATAAGAC TT	1136	TAAGACT T	2073	AAGACT T	3010
hsa-miR-1265	CAGGAUGUGGUCAAGUGUUGU U	200	CCACATC CT	1137	CACATCC T	2074	ACATCC T	3011
hsa-miR-1266	CCUCAGGGCUGUAGAACAGGG CU	201	AGCCCTG AG	1138	GCCCTGA G	2075	CCCTGA G	3012
hsa-miR-1267	CCUGUUGAAGUGUAAUCCCCA	202	CTTCAAC AG	1139	TTCAACA G	2076	TCAACA G	3013
hsa-miR-1268	CGGGCGUGGUGGUGGGGG	203	ACCACGC CC	1140	CCACGCC C	2077	CACGCC C	3014
hsa-miR-1269	CUGGACUGAGCCGUGCUACU GG	204	CTCAGTC CA	1141	TCAGTCC A	2078	CAGTCC A	3015
hsa-miR-127-3p	UCGGAUCCGUCUGAGCUUGG CU	205	ACGGATC CG	1142	CGGATCC G	2079	GGATCC G	3016
hsa-miR-127-5p	CUGAAGCUCAGAGGGCUCUGA U	206	TGAGCTT CA	1143	GAGCTTC A	2080	AGCTTC A	3017
hsa-miR-1270	CUGGAGAUUUGGAAGAGCUGU GU	207	ATATCTC CA	1144	TATCTCC A	2081	ATCTCC A	3018
hsa-miR-1271	CUUUGCACCUCAGCAAGCACUC A	208	AGGTGCC AA	1145	GGTGCCA A	2082	GTGCCA A	3019
hsa-miR-1272	GAUGAUGAUGGCAGCAAUUC UGAAA	209	CATCATC AT	1146	ATCATCA T	2083	TCATCA T	3020
hsa-miR-1273	GGGCGACAAAGCAAGACUCUU UCUU	210	TTTGTCCG CC	1147	TTGTCCG C	2084	TGTCCG C	3021

10

20

30

40

50

【表 9 - 1 2】

hsa-miR-1274a	GUCCUGUUCAGGGCGCCA	211	GAACAGG GA	1148	AACAGGG A	2085	ACAGGG A	3022
hsa-miR-1274b	UCCUGUUCGGGGCGCCA	212	CGAACAG GG	1149	GAACAGG G	2086	AACAGG G	3023
hsa-miR-1275	GUGGGGGAGAGGCUGUC	213	TCTCCCC CA	1150	CTCCCCC A	2087	TCCCCC A	3024
hsa-miR-1276	UAAAGAGCCCUGUGGAGACA	214	GGGCTCT TT	1151	GGCTCTT T	2088	GCTCTT T	3025
hsa-miR-1277	UACGUAGAUUAUAUGUAUUU U	215	TATCTAC GT	1152	ATCTACG T	2089	TCTACG T	3026
hsa-miR-1278	UAGUACUGUGCAUAUCAUCUA U	216	CACAGTA CT	1153	ACAGTAC T	2090	CAGTAC T	3027
hsa-miR-1279	UCAUAUUGCUUCUUUCU	217	AGCAATA TG	1154	GCAATAT G	2091	CAATAT G	3028
hsa-miR-128	UCACAGUGAACCGGUCUUUU	218	TTCACTG TG	1155	TCACTGT G	2092	CACTGT G	3029
hsa-miR-1280	UCCCACCGCUGCCACCC	219	AGCGGTG GG	1156	GCGGTGG G	2093	CGGTGG G	3030
hsa-miR-1281	UCGCCUCCUCCUCUCCC	220	GAGGAGG CG	1157	AGGAGGC G	2094	GGAGGC G	3031
hsa-miR-1282	UCGUUUGCCUUUUUCUGCUU	221	AGGCAAA CG	1158	GGCAAAC G	2095	GCAAAC G	3032
hsa-miR-1283	UCUACAAAGGAAAGCGUUUC U	222	CCTTTGT AG	1159	CTTTGTA G	2096	TTTGTA G	3033
hsa-miR-1284	UCUAUACAGACCCUGGCUUUU C	223	TCTGTAT AG	1160	CTGTATA G	2097	TGTATA G	3034
hsa-miR-1285	UCUGGGCAACAAAGUGAGACC U	224	GTTGCCC AG	1161	TTGCCCA G	2098	TGCCCA G	3035
hsa-miR-1286	UGCAGGACCAAGAUGAGCCCU	225	TGGTCCT GC	1162	GGTCCTG C	2099	GTCTCTG C	3036
hsa-miR-1287	UGCUGGAUCAGUGGUUCGAG UC	226	TGATCCA GC	1163	GATCCAG C	2100	ATCCAG C	3037

10

20

30

40

50

【表 9 - 1 3】

hsa-miR-1288	UGGACUGCCCUGAUCUGGAGA	227	GGGCAGT CC	1164	GGCAGTC C	2101	GCAGTC C	3038
hsa-miR-1289	UGGAGUCCAGGAAUCUGCAUU UU	228	CTGGACT CC	1165	TGGACTC C	2102	GGACTC C	3039
hsa-miR-129*	AAGCCCUUACCCCAAAAAGUA U	229	GTAAGGG CT	1166	TAAGGGC T	2103	AAGGGC T	3040
hsa-miR-129-3p	AAGCCCUUACCCCAAAAAGCA U	230	GTAAGGG CT	1167	TAAGGGC T	2104	AAGGGC T	3041
hsa-miR-129-5p	CUUUUUGCGGUCUGGGCUUG C	231	CCGCAAA AA	1168	CGCAAAA A	2105	GCAAAA A	3042
hsa-miR-1290	UGGAUUUUUGGAUCAGGGA	232	CAAAAAT CC	1169	AAAAATC C	2106	AAAATC C	3043
hsa-miR-1291	UGGCCUGACUGAAGACCAGC AGU	233	GTCAGGG CC	1170	TCAGGGC C	2107	CAGGGC C	3044
hsa-miR-1292	UGGGAACGGGUUCCGGCAGA CGCUG	234	CCCGTTC CC	1171	CCGTTC C	2108	CGTTCC C	3045
hsa-miR-1293	UGGGUGGUCUGGAGAUUUGU GC	235	AGACCAC CC	1172	GACCACC C	2109	ACCACC C	3046
hsa-miR-1294	UGUGAGGUUGGCAUUGUUGU CU	236	CAACCTC AC	1173	AACCTCA C	2110	ACCTCA C	3047
hsa-miR-1295	UUAGGCCGCAGAUUGGGUGA	237	TGCGGCC TA	1174	GCGGCCT A	2111	CGGCCT A	3048
hsa-miR-1296	UUAGGGCCCUGGCUCCAUCU CC	238	AGGGCCC TA	1175	GGGCCT A	2112	GGCCCT A	3049
hsa-miR-1297	UUCAAGUAAUUCAGGUG	239	ATTACTT GA	1176	TTACTTGA A	2113	TACTTG A	3050
hsa-miR-1298	UUCAUUCGGCUGUCCAGAUGU A	240	GCCGAAT GA	1177	CCGAATG A	2114	CGAATG A	3051
hsa-miR-1299	UUCUGGAAUUCUGUGUGAGG GA	241	AATTCCA GA	1178	ATTCCAG A	2115	TTCCAG A	3052
hsa-miR-1300	UUGAGAAGGAGGCUGCUG	242	TCCTTCT CA	1179	CCTTCTC A	2116	CTTCTC A	3053
hsa-miR-1301	UUGCAGCUGCCUGGGAGUGA CUUC	243	GCAGCTG CA	1180	CAGCTGC A	2117	AGCTGC A	3054
hsa-miR-1302	UUGGGACAUACUUAUGCUAAA	244	TATGTCC CA	1181	ATGTCCC A	2118	TGTCCC A	3055

10

20

30

40

50

【表 9 - 1 4】

hsa-miR-1303	UUUAGAGACGGGGUCUUGCUC U	245	CGTCTCT AA	1182	GTCTCTA A	2119	TCTCTA A	3056
hsa-miR-1304	UUUGAGGCCUACAGUGAGAUGU G	246	TAGCCTC AA	1183	AGCCTCA A	2120	GCCTCA A	3057
hsa-miR-1305	UUUUCAACUCUAAUGGGAGAG A	247	GAGTTGA AA	1184	AGTTGAA A	2121	GTTGAA A	3058
hsa-miR-1306	ACGUUGGCUCUGGUGGUG G	248	GAGCCAA CG	1185	AGCCAAC G	2122	GCCAAC G	3059
hsa-miR-1307	ACUCGGCGUGGCGUCGGUCG UG	249	CACGCCG AG	1186	ACGCCGA G	2123	CGCCGA G	3060
hsa-miR-1308	GCAUGGGUGGUUCAGUGG G	250	CCACCCA TG	1187	CACCCAT G	2124	ACCCAT G	3061
hsa-miR-130a	CAGUGCAAUGUUAAAAGGGCA U	251	CATTGCA CT	1188	ATTGCAC T	2125	TTGCAC T	3062
hsa-miR-130a*	UUCACAUUGUGCUACUGUCUG C	252	ACAATGT GA	1189	CAATGTG A	2126	AATGTG A	3063
hsa-miR-130b	CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCA U	253	CATTGCA CT	1190	ATTGCAC T	2127	TTGCAC T	3064
hsa-miR-130b*	ACUCUUUCCCGUUGCACUAC C	254	GGGAAAG AG	1191	GGAAAGA G	2128	GAAAGA G	3065
hsa-miR-132	UACAGUCUACAGCCAUGGUC G	255	TAGACTG TT	1192	AGACTGT T	2129	GACTGT T	3066
hsa-miR-132*	ACCGUGGCUUUCGAUUGUUAC U	256	AAGCCAC GG	1193	AGCCACG G	2130	GCCACG G	3067
hsa-miR-1321	CAGGGAGGUGAAUGUGAU U	257	CACCTCC CT	1194	ACCTCCC T	2131	CCTCCC T	3068
hsa-miR-1322	GAUGAUGCUGCUGAUGCUG G	258	CAGCATC AT	1195	AGCATCA T	2132	GCATCA T	3069
hsa-miR-1323	UCAAACUGAGGGGCAUUUUC U	259	TCAGTTTT G	1196	CAGTTTT G	2133	AGTTTT G	3070
hsa-miR-1324	CCAGACAGAAUUCUAUGCACU UUC	260	TTCTGTCT G	1197	TCTGTCT G	2134	CTGTCT G	3071
hsa-miR-133a	UUUGGUCCCUUCAACCAGCU G	261	GGGACC AA	1198	GGGACCA A	2135	GGACCA A	3072

10

20

30

40

50

【表 9 - 1 5】

hsa-miR-133b	UUUGGUCCCCUUAACCAGCU A	262	GGGGACC AA	1199	GGGACCA A	2136	GGACCA A	3073
hsa-miR-134	UGUGACUGGUUGACCAGAGG GG	263	ACCAGTC AC	1200	CCAGTCA C	2137	CAGTCA C	3074
hsa-miR-135a	UAUGGCUUUUUUAUCCUAUGU GA	264	AAAAGCC AT	1201	AAAGCCA T	2138	AAGCCA T	3075
hsa-miR-135a*	UAUAGGGAUUGGAGCCGUGG CG	265	AATCCCT AT	1202	ATCCCTA T	2139	TCCCTA T	3076
hsa-miR-135b	UAUGGCUUUUCAUCCUAUGU GA	266	AAAAGCC AT	1203	AAAGCCA T	2140	AAGCCA T	3077
hsa-miR-135b*	AUGUAGGGCUAAAAGCCAUGG G	267	AGCCCTA CA	1204	GCCCTAC A	2141	CCCTAC A	3078
hsa-miR-136	ACUCCAUUUGUUUGAUGAUG GA	268	CAATGG AG	1205	AAATGGA G	2142	AATGGA G	3079
hsa-miR-136*	CAUCAUCGUCUCAAUGAGUC U	269	GACGATG AT	1206	ACGATGA T	2143	CGATGA T	3080
hsa-miR-137	UUUUUGCUUAAGAAUACGCGU AG	270	TAAGCAA TA	1207	AAGCAAT A	2144	AGCAAT A	3081
hsa-miR-138	AGCUGGUGUUGUGAAUCAGGC CG	271	AACACCA GC	1208	ACACCAG C	2145	CACCAG C	3082
hsa-miR-138-1*	GCUACUUCACAACACCAGGGC C	272	GTGAAGT AG	1209	TGAAGTA G	2146	GAAGTA G	3083
hsa-miR-138-2*	GCUAUUUCACGACACCAGGGU U	273	GTGAAAT AG	1210	TGAAATA G	2147	GAAATA G	3084
hsa-miR-139-3p	GGAGACGCGGCCUGUUGGA GU	274	CCGCGTC TC	1211	CGCGTCT C	2148	GCGTCT C	3085
hsa-miR-139-5p	UCUACAGUGCACGUGUCUCCA G	275	GCACTGT AG	1212	CACTGTA G	2149	ACTGTA G	3086

10

20

30

40

50

【表 9 - 1 6】

hsa-miR-140-3p	UACCACAGGGUAGAACCACGG	276	CCCTGTG GT	1213	CCTGTGG T	2150	CTGTGG T	3087
hsa-miR-140-5p	CAGUGGUUUUACCCUAUGGUA G	277	AAAACCA CT	1214	AAACCAC T	2151	AACCAC T	3088
hsa-miR-141	UAACACUGUCUGGAAAAGAUG G	278	GACAGTG TT	1215	ACAGTGT T	2152	CAGTGT T	3089
hsa-miR-141*	CAUCUUCCAGUACAGUGUUGG A	279	CTGGAAG AT	1216	TGGAAGA T	2153	GGAAGA T	3090
hsa-miR-142-3p	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUG GA	280	AAACACT AC	1217	AACACTA C	2154	ACACTA C	3091
hsa-miR-142-5p	CAUAAAAGUAGAAAGCACUACU	281	CTACTTTA T	1218	TACTTTAT	2155	ACTTTA T	3092
hsa-miR-143	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC	282	CTTCATC TC	1219	TTCATCT C	2156	TCATCT C	3093
hsa-miR-143*	GGUGCAGUGCUGCAUCUCUG GU	283	GCACTGC AC	1220	CACTGCA C	2157	ACTGCA C	3094
hsa-miR-144	UACAGUAUAGAUGAUGUACU	284	CTATACT GT	1221	TATACTGT	2158	ATACTG T	3095
hsa-miR-144*	GGUAUAUCAUAUACUGUAA G	285	GATGATA TC	1222	ATGATAT C	2159	TGATAT C	3096
hsa-miR-145	GUCCAGUUUCCCAGGAAUCC CU	286	AAAAC TG GA	1223	AAAAC TG A	2160	AACTGG A	3097
hsa-miR-145*	GGAUUCCUGGAAAUACUGUUC U	287	CCAGGAA TC	1224	CAGGAAT C	2161	AGGAAT C	3098
hsa-miR-1468	CUCCGUUUGCCUGUUUCGCU G	288	GCAAACG GA	1225	CAAACGG A	2162	AAACGG A	3099
hsa-miR-1469	CUCGGCGCGGGGCGGGGCU CC	289	CCGCGCC GA	1226	CGCGCCG A	2163	GCGCCG A	3100
hsa-miR-146a	UGAGAACUGAAUCCAUGGGU U	290	TCAGTTC TC	1227	CAGTTCT C	2164	AGTTCT C	3101
hsa-miR-146a*	CCUCUGAAAUUCAGUUCUUA G	291	ATTTAG AG	1228	TTTCAGA G	2165	TTCAGA G	3102

10

20

30

40

50

【表 9 - 17】

hsa-miR-146b-3p	UGCCCUGUGGACUCAGUUCU GG	292	CCACAGG GC	1229	CACAGGG C	2166	ACAGGG C	3103
hsa-miR-146b-5p	UGAGAACUGAAUCCAUAGGC U	293	TCAGTTC TC	1230	CAGTTCT C	2167	AGTTCT C	3104
hsa-miR-147	GUGUGUGGAAAUGCUUCUGC G	294	TTCCACA CA	1231	TCCACAC A	2168	CCACAC A	3105
hsa-miR-1470	GCCCUCCGCCCGUGCACCCC G	295	GGCGGAG GG	1232	GCGGAGG G	2169	CGGAGG G	3106
hsa-miR-1471	GCCCGCGUGUGGAGCCAGGU GU	296	ACACGCG GG	1233	CACGCGG G	2170	ACGCGG G	3107
hsa-miR-147b	GUGUGCGGAAAUGCUUCUGC A	297	TTCCGCA CA	1234	TCCGCAC A	2171	CCGCAC A	3108
hsa-miR-148a	UCAGUGCACUACAGAACUUUG U	298	AGTGCAC TG	1235	GTGCACT G	2172	TGCACT G	3109
hsa-miR-148a*	AAAGUUCUGAGACACUCCGAC U	299	TCAGAAC TT	1236	CAGAACT T	2173	AGAACT T	3110
hsa-miR-148b	UCAGUGCAUCACAGAACUUUG U	300	GATGCAC TG	1237	ATGCACT G	2174	TGCACT G	3111
hsa-miR-148b*	AAGUUCUGUUAUACACUCAGG C	301	AACAGAA CT	1238	ACAGAAC T	2175	CAGAAC T	3112
hsa-miR-149	UCUGGCUCGUGUCUUCACU CCC	302	CGGAGCC AG	1239	GGAGCCA G	2176	GAGCCA G	3113
hsa-miR-149*	AGGGAGGGACGGGGCUGUG C	303	GTCCCTC CC	1240	TCCCTCC C	2177	CCCTCC C	3114
hsa-miR-150	UCUCCCAACCCUUGUACCAGU G	304	GGTTGGG AG	1241	GTTGGGA G	2178	TTGGGA G	3115
hsa-miR-150*	CUGGUACAGGCCUGGGGGAC AG	305	CCTGTAC CA	1242	CTGTACC A	2179	TGTACC A	3116
hsa-miR-151-3p	CUAGACUGAAGCUCCUUGAGG G	306	TTCAGTC TA	1243	TCAGTCT A	2180	CAGTCT A	3117
hsa-miR-151-5p	UCGAGGAGCUCACAGUCUAGU G	307	AGCTCCT CG	1244	GCTCCTC G	2181	CTCCTC G	3118
hsa-miR-152	UCAGUGCAUGACAGAACUUGG G	308	CATGCAC TG	1245	ATGCACT G	2182	TGCACT G	3119
hsa-miR-153	UUGCAUAGUCACAAAAGUGAU C	309	GACTATG CA	1246	ACTATGC A	2183	CTATGC A	3120

10

20

30

40

50

【表 9 - 1 8】

hsa-miR-1537	AAAACCGUCUAGUUACAGUUG U	310	AGACGGT TT	1247	GACGGTT T	2184	ACGGTT T	3121
hsa-miR-1538	CGGCCCGGGCUGCUGCUGUU CCU	311	GCCCGGG CC	1248	CCCGGGC C	2185	CCGGGC C	3122
hsa-miR-1539	UCCUGCGCGUCCAGAUGCC C	312	ACGCGCA GG	1249	CGCGCAG G	2186	GCGCAG G	3123
hsa-miR-154	UAGGUUAUCCGUGUUGCCUUC G	313	GGATAAC CT	1250	GATAACC T	2187	ATAACC T	3124
hsa-miR-154*	AAUCAUACACGGUUGACCUAU U	314	GTGTATG AT	1251	TGTATGA T	2188	GTATGA T	3125
hsa-miR-155	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGG GU	315	TTAGCAT TA	1252	TAGCATT A	2189	AGCATT A	3126
hsa-miR-155*	CUCCUACAUAUUAGCAUUAAC A	316	TATGTAG GA	1253	ATGTAGG A	2190	TGTAGG A	3127
hsa-miR-15a	UAGCAGCACAUAAUGGUUUGU G	317	TGTGCTG CT	1254	GTGCTGC T	2191	TGCTGC T	3128
hsa-miR-15a*	CAGGCCAUUUUGUGCUGCCUC A	318	ATATGGC CT	1255	TATGGCC T	2192	ATGGCC T	3129
hsa-miR-15b	UAGCAGCACAUCAUGGUUUAC A	319	TGTGCTG CT	1256	GTGCTGC T	2193	TGCTGC T	3130
hsa-miR-15b*	CGAAUCAUUUUUGCUGCUCU A	320	TAATGATT C	1257	AATGATT C	2194	ATGATT C	3131
hsa-miR-16	UAGCAGCACGUAAAUUUGGC G	321	CGTGCTG CT	1258	GTGCTGC T	2195	TGCTGC T	3132
hsa-miR-16-1*	CCAGUAUUUACUGUGCUGCUG A	322	TTAATACT G	1259	TAATACT G	2196	AATACT G	3133
hsa-miR-16-2*	CCAAUUAUACUGUGCUGCUUU A	323	GTAATATT G	1260	TAATATTG G	2197	AATATT G	3134
hsa-miR-17	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGU AG	324	AAGCACT TT	1261	AGCACTT T	2198	GCACTT T	3135
hsa-miR-17*	ACUGCAGUGAAGGCACUUGUA G	325	TCACTGC AG	1262	CACTGCA G	2199	ACTGCA G	3136

10

20

30

40

50

【表 9 - 19】

hsa-miR-181a	AACAUUCAACGCUGUCGGUGA GU	326	GTTGAAT GT	1263	TTGAATG T	2200	TGAATG T	3137
hsa-miR-181a*	ACCAUCGACCGUUGAUUGUAC C	327	GGTCGAT GG	1264	GTCGATG G	2201	TCGATG G	3138
hsa-miR-181a-2*	ACCACUGACCGUUGACUGUAC C	328	GGTCAGT GG	1265	GTCAGTG G	2202	TCAGTG G	3139
hsa-miR-181b	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGG GU	329	AATGAAT GT	1266	ATGAATG T	2203	TGAATG T	3140
hsa-miR-181c	AACAUUCAACCUGUCGGUGAG U	330	GTTGAAT GT	1267	TTGAATG T	2204	TGAATG T	3141
hsa-miR-181c*	AACCAUCGACCGUUGAGUGGA C	331	GTCGATG GT	1268	TCGATGG T	2205	CGATGG T	3142
hsa-miR-181d	AACAUUCAUUGUUGUCGGUGG GU	332	AATGAAT GT	1269	ATGAATG T	2206	TGAATG T	3143
hsa-miR-182	UUUGGCAAUGGUAGAACUCAC ACU	333	CATTGCC AA	1270	ATTGCCA A	2207	TTGCCA A	3144
hsa-miR-182*	UGGUUCUAGACUUGCCAACUA 334	334	TCTAGAA CC	1271	CTAGAAC C	2208	TAGAAC C	3145
hsa-miR-1825	UCCAGUGCCCUCCUCUCC 335	335	GGGCACT GG	1272	GGCACTG G	2209	GCACTG G	3146
hsa-miR-1826	AUUGAUCAUCGACACUUCGAA CGCAAU	336	GATGATC AA	1273	ATGATCA A	2210	TGATCA A	3147
hsa-miR-1827	UGAGGCAGUAGAUUGAAU 337	337	TACTGCC TC	1274	ACTGCCT C	2211	CTGCCT C	3148
hsa-miR-183	UAUGGCACUGGUAGAAUUCAC U	338	CAGTGCC AT	1275	AGTGCCA T	2212	GTGCCA T	3149
hsa-miR-183*	GUGAAUUACCGAAGGGCCAUA A	339	GTAATT CA	1276	GTAATTC A	2213	TAATTC A	3150
hsa-miR-184	UGGACGGAGAACUGAUAGGG U	340	TCTCCGT CC	1277	CTCCGTC C	2214	TCCGTC C	3151
hsa-miR-185	UGGAGAGAAAGGCAGUUCUG A	341	TTTCTCTC C	1278	TTCTCTC C	2215	TCTCTC C	3152

10

20

30

40

50

【表 9 - 20】

hsa-miR-185*	AGGGGCUGGCUUUCCUCUGG UC	342	GCCAGCC CC	1279	CCAGCCC C	2216	CAGCCC C	3153
hsa-miR-186	CAAAGAAUUCUCCUUUUGGGC U	343	GAATTCT TT	1280	AATTCTTT A	2217	ATTCTT T	3154
hsa-miR-186*	GCCCAAAGGUGAAUUUUUUGG G	344	ACCTTTG GG	1281	CCTTTGG G	2218	CTTTGG G	3155
hsa-miR-187	UCGUGUCUUGUGUUGCAGCC GG	345	CAAGACA CG	1282	AAGACAC G	2219	AGACAC G	3156
hsa-miR-187*	GGCUACAACACAGGACCCGGG C	346	TGTTGTA GC	1283	GTTGTAG C	2220	TTGTAG C	3157
hsa-miR-188-3p	CUCCCACAUGCAGGGUUUGCA G	347	CATGTGG GA	1284	ATGTGGG A	2221	TGTGGG A	3158
hsa-miR-188-5p	CAUCCCUUGCAUGGUGGAGG G	348	GCAAGGG AT	1285	CAAGGGA T	2222	AAGGGA T	3159
hsa-miR-18a	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAU AG	349	ATGCACC TT	1286	TGCACCT T	2223	GCACCT T	3160
hsa-miR-18a*	ACUGCCCUAAGUGCUCUUCU GG	350	TTAGGGC AG	1287	TAGGGCA G	2224	AGGGCA G	3161
hsa-miR-18b	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGUU AG	351	ATGCACC TT	1288	TGCACCT T	2225	GCACCT T	3162
hsa-miR-18b*	UGCCCUAAAUGCCCUUCUGG C	352	ATTTAGG GC	1289	TTTAGGG C	2226	TTAGGG C	3163
hsa-miR-190	UGAUUUGUUUGAUUUAUUAGG U	353	AAACATA TC	1290	AACATAT C	2227	ACATAT C	3164
hsa-miR-1908	GGCGGGGACGGCGAUUGGU C	354	GTCCCCG CC	1291	TCCCCGC C	2228	CCCCGC C	3165
hsa-miR-1909	CGCAGGGGCCGGGUGCUCAC CG	355	GGCCCT GC	1292	GCCCCTG C	2229	CCCCTG C	3166
hsa-miR-1909*	UGAGUGCCGGUGCCUGCCCU G	356	CCGGCAC TC	1293	CGGCACT C	2230	GGCACT C	3167
hsa-miR-190b	UGAUUUGUUUGAUUUGGGUU G	357	AAACATA TC	1294	AACATAT C	2231	ACATAT C	3168

10

20

30

40

50

【表 9 - 2 1】

hsa-miR-191	CAACGGAAUCCCAAAGCAGC UG	358	GATTCCG TT	1295	ATTCCGT T	2232	TTCCGT T	3169
hsa-miR-191*	GCUGCGCUUGGAUUUCGUCC CC	359	CAAGCGC AG	1296	AAGCGCA G	2233	AGCGCA G	3170
hsa-miR-1910	CCAGUCCUGUGCCUGCCGCC U	360	ACAGGAC TG	1297	CAGGACT G	2234	AGGACT G	3171
hsa-miR-1911	UGAGUACCGCCAUGUCUGUUG GG	361	GCGGTAC TC	1298	CGGTACT C	2235	GGTACT C	3172
hsa-miR-1911*	CACCAGGCAUUGUGGUCUCC C	362	ATGCCTG GT	1299	TGCCTGG T	2236	GCCTGG T	3173
hsa-miR-1912	UACCCAGAGCAUGCAGUGUGA A	363	GCTCTGG GT	1300	CTCTGGG T	2237	TCTGGG T	3174
hsa-miR-1913	UCUGCCCCCUCGCGUCGUCG CA	364	AGGGGGC AG	1301	GGGGGCA G	2238	GGGGCA G	3175
hsa-miR-1914	CCCUGUGCCCGGCCACUUC UG	365	GGGCACA GG	1302	GGCACAG G	2239	GCACAG G	3176
hsa-miR-1914*	GGAGGGGUGCCGCACUGGGA GG	366	GGACCCC TC	1303	GACCCCT C	2240	ACCCCT C	3177
hsa-miR-1915	CCCCAGGGCGACGGCGGG C	367	CGCCCTG GG	1304	GCCCTGG G	2241	CCCTGG G	3178
hsa-miR-1915*	ACCUUGCCUUGCUGCCCGGG CC	368	AAGGCAA GG	1305	AGGCAAG G	2242	GGCAAG G	3179
hsa-miR-192	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC C	369	CATAGGT CA	1306	ATAGGTC A	2243	TAGGTC A	3180
hsa-miR-192*	CUGCCAAUCCAUAGGUCACA G	370	GAATTGG CA	1307	AATTGGC A	2244	ATTGGC A	3181
hsa-miR-193a-3p	AACUGGCCUACAAAGUCCAG U	371	TAGGCCA GT	1308	AGGCCAG T	2245	GGCCAG T	3182
hsa-miR-193a-5p	UGGGUCUUUGCGGGCGAGAU GA	372	CAAAGAC CC	1309	AAAGACC C	2246	AAGACC C	3183
hsa-miR-193b	AACUGGCCCUCAAAGUCCCGC U	373	AGGGCCA GT	1310	GGGCCAG T	2247	GGCCAG T	3184
hsa-miR-193b*	CGGGGUUUUGAGGGCGAGAU GA	374	CAAAACC CC	1311	AAAACCC C	2248	AAACCC C	3185

10

20

30

40

50

【表 9 - 2 2】

hsa-miR-194	UGU AACAGCAACUCCAUGUGG A	375	TGCTGTT AC	1312	GCTGTTA C	2249	CTGTTA C	3186
hsa-miR-194*	CCAGUGGGGCGUCGUGUUAUC UG	376	GCCCCAC TG	1313	CCCCACT G	2250	CCCCACT G	3187
hsa-miR-195	UAGCAGCACAGAAAUAUUGGC	377	TGTGCTG CT	1314	GTGCTGC T	2251	TGCTGC T	3188
hsa-miR-195*	CCAAUAUUGGCUGUGCUGCUC C	378	CCAATAT TG	1315	CAATATT G	2252	AATATT G	3189
hsa-miR-196a	UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGG G	379	AAACTAC CT	1316	AACTACC T	2253	ACTACC T	3190
hsa-miR-196a*	CGGCAACAAGAAACUGCCUGA G	380	CTTGTTG CC	1317	TTGTTGC C	2254	TGTTGC C	3191
hsa-miR-196b	UAGGUAGUUUCCUGUUGUUG GG	381	AAACTAC CT	1318	AACTACC T	2255	ACTACC T	3192
hsa-miR-197	UUCACCACCUUCUCCACCCAG C	382	AGGTGGT GA	1319	GGTGGTG A	2256	GTGGTG A	3193
hsa-miR-198	GGUCCAGAGGGGAGAUAGGUU C	383	CCTCTGG AC	1320	CTCTGGA C	2257	TCTGGA C	3194
hsa-miR-199a-5p	CCCAGUGUUCAGACUACCUGU UC	384	GAACACT GG	1321	AACACTG G	2258	ACACTG G	3195
hsa-miR-199b-3p	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUU A	385	AGACTAC TG	1322	GACTACT G	2259	ACTACT G	3196
hsa-miR-199b-5p	CCCAGUGUUUAGACUAUCUGU UC	386	AAACTAC GG	1323	AACACTG G	2260	ACACTG G	3197
hsa-miR-19a	UGUGCAAAUCUAUGCAAAACU GA	387	GATTTGC AC	1324	ATTTGCA C	2261	TTTGCA C	3198

10

20

30

40

50

【表 9 - 2 3】

hsa-miR-19a*	AGUUUUGCAUAGUUGCACUAC A	388	ATGCAAA AC	1325	TGCAAAA C	GCAAAA C	3199
hsa-miR-19b	UGUGCAAAUCCAUGCAAAACU GA	389	GATTTGC AC	1326	ATTTGCA C	TTTGCA C	3200
hsa-miR-19b-1*	AGUUUUGCAGGUUUGCAUCCA GC	390	CTGCAAA AC	1327	TGCAAAA C	GCAAAA C	3201
hsa-miR-19b-2*	AGUUUUGCAGGUUUGCAUUUC A	391	CTGCAAA AC	1328	TGCAAAA C	GCAAAA C	3202
hsa-miR-200a	UAACACUGUCUGGUAACGAUG U	392	GACAGTG TT	1329	ACAGTGT T	CAGTGT T	3203
hsa-miR-200a*	CAUCUUACCGGACAGUGCUGG A	393	CGGTAAG AT	1330	GGTAAGA T	GTAAGA T	3204
hsa-miR-200b	UAAUACUGCCUGGUAUGAUG A	394	GGCAGTA TT	1331	GCAGTAT T	CAGTAT T	3205
hsa-miR-200b*	CAUCUUACUGGGCAGCAUUGG A	395	CAGTAAG AT	1332	AGTAAGA T	GTAAGA T	3206
hsa-miR-200c	UAAUACUGCCGGGUAUGAUG GA	396	GGCAGTA TT	1333	GCAGTAT T	CAGTAT T	3207
hsa-miR-200c*	CGUCUUACCCAGCAGUGUUUG G	397	GGGTAAG AC	1334	GGTAAGA C	GTAAGA C	3208
hsa-miR-202	AGAGGUUAUAGGGCAUGGGAA AGAGGUUAUAGGGCAUGGGAA	398	CTATACC TC	1335	TATACCT C	ATACCT C	3209
hsa-miR-202*	UUCCUAUGCAUUAUCUUCUUU G	399	TGCATAG GA	1336	GCATAGG A	CATAGG A	3210
hsa-miR-203	GUGAAAUGUUUAGGACCACUA G	400	AACATTT CA	1337	ACATTTT A	CATTTT A	3211
hsa-miR-204	UUCCCUUUGUCAUCCUUAUGCC U	401	ACAAAGG GA	1338	CAAAGGG A	AAAGGG A	3212
hsa-miR-205	UCCUUCUUCACCCGGAGUCU G	402	GAATGAA GG	1339	AATGAAG G	ATGAAG G	3213
hsa-miR-206	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUG G	403	TTACATTC C	1340	TACATTC C	ACATTC C	3214
hsa-miR-208a	AUAAGACGAGCAAAAAGCUUG U	404	CTCGTCT TA	1341	TCGTCTT A	CGTCTT A	3215
hsa-miR-208b	AUAAGACGAACAAAAGGUUUG U	405	TTCGTCTT A	1342	TCGTCTT A	CGTCTT A	3216
hsa-miR-20a	UAAAGUGC UUUAUAGUGCAGGU AG	406	AAGCACT TT	1343	AGCACTT T	GCACTT T	3217
hsa-miR-20a*	ACUGCAUU AUGAGCACUUAAA G	407	ATAATGC AG	1344	TAATGCA G	AATGCA G	3218

10

20

30

40

50

【表 9 - 2 4】

hsa-miR-20b	CAAAGUGCUCAUAGUGCAGGU AG	408	GAGCACT TT	1345	AGCACTT T	2282	GCACTT T	3219
hsa-miR-20b*	ACUGUAGUAUGGGCACUUCCA G	409	ATACTAC AG	1346	TACTACA G	2283	ACTACA G	3220
hsa-miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUG A	410	TGATAAG CT	1347	GATAAGC T	2284	ATAAGC T	3221
hsa-miR-21*	CAACACCAGUCGAUGGGCUGU G	411	ACTGGTG TT	1348	CTGGTGT T	2285	TGGTGT T	3222
hsa-miR-210	CUGUGCGUGUGACAGCGGCU GA	412	ACACGCA CA	1349	CACGCAC A	2286	ACGCAC A	3223
hsa-miR-211	UUCCCUUUGUCAUCCUUCGCC U	413	ACAAAGG GA	1350	CAAAGGG A	2287	AAAGGG A	3224
hsa-miR-212	UAAACAGUCUCCAGUCACGGCC C	414	GAGACTG TT	1351	AGACTGT T	2288	GACTGT T	3225
hsa-miR-214	ACAGCAGGCACAGACAGGCAG U	415	TGCCTGC TG	1352	GCCTGCT G	2289	CCTGCT G	3226
hsa-miR-214*	UGCCUGUCUACACUUGCUGU GC	416	TAGACAG GC	1353	AGACAGG C	2290	GACAGG C	3227
hsa-miR-215	AUGACCUAUGAAUUGACAGAC C	417	CATAGGT CA	1354	ATAGGTC A	2291	TAGGTC A	3228
hsa-miR-216a	UAAUCUCAGCUGGCAACUGUG A	418	GCTGAGA TT	1355	CTGAGAT T	2292	TGAGAT T	3229
hsa-miR-216b	AAAUCUCUGCAGGCAAUUGUG A	419	GCAGAGA TT	1356	CAGAGAT T	2293	AGAGAT T	3230
hsa-miR-217	UACUGCAUCAGGAACUGAUUG GA	420	TGATGCA GT	1357	GATGCAG T	2294	ATGCAG T	3231
hsa-miR-218	UUGUGCUUGAUCUAACCAUGU G	421	TCAAGCA CA	1358	CAAGCAC A	2295	AAGCAC A	3232
hsa-miR-218-1*	AUGGUUCCGUCAAGCACCAUG G	422	ACGGAAC CA	1359	CGGAACC A	2296	GGAACC A	3233
hsa-miR-218-2*	CAUGGUUCUGUCAAGCACCGC G	423	CAGAACC AT	1360	AGAACCA T	2297	GAACCA T	3234

10

20

30

40

50

【表 9 - 2 5】

hsa-miR-219-1-3p	AGAGUUGAGUCUGGACGUCCC G	424	ACTCAAC TC	1361	CTCAACT C	2298	TCAACT C	3235
hsa-miR-219-2-3p	AGAAUUGUGGCUGGACAUCUG U	425	CCACAAT TC	1362	CACAATT C	2299	ACAATT C	3236
hsa-miR-219-5p	UGAUUGUCCAAACGCAAUUCU U	426	TGGACAA TC	1363	GGACAAT C	2300	GACAAT C	3237
hsa-miR-22	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUG U	427	CTGGCAG CT	1364	TGGCAGC T	2301	GGCAGC T	3238
hsa-miR-22*	AGUUCUUCAGUGGCAAGCUUU A	428	CTGAAGA AC	1365	TGAAGAA C	2302	GAAGAA C	3239
hsa-miR-220a	CCACACCGUAUCUGACACUUU U	429	TACGGTG TG	1366	ACGGTGT G	2303	CGGTGT G	3240
hsa-miR-220b	CCACCACCGUGUCUGACACUU U	430	ACGGTGG TG	1367	CGGTGGT G	2304	GGTGGT G	3241
hsa-miR-220c	ACACAGGGCUGUUGUGAAGAC U	431	AGCCCTG TG	1368	GCCCTGT G	2305	CCCTGT G	3242
hsa-miR-221	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUU UC	432	CAATGTA GC	1369	AATGTAG C	2306	ATGTAG C	3243
hsa-miR-221*	ACCUGGCAUACAAUGUAGAUU U	433	TATGCCA GG	1370	ATGCCAG G	2307	TGCCAG G	3244
hsa-miR-222	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU U	434	AGATGTA GC	1371	GATGTAG C	2308	ATGTAG C	3245
hsa-miR-222*	CUCAGUAGCCAGUGUAGAUCU U	435	GGCTACT GA	1372	GCTACTG A	2309	CTACTG A	3246
hsa-miR-223	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCC A	436	CAAACCTG AC	1373	AAACTGA C	2310	AACTGA C	3247
hsa-miR-223*	CGUGUAUUUGACAAGCUGAGU U	437	CAAATAC AC	1374	AAATACA C	2311	AATACA C	3248
hsa-miR-224	CAAGUCACUAGUGGUUCCGUU U	438	TAGTGAC TT	1375	AGTGAAT T	2312	GTGAAT T	3249
hsa-miR-23a	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC U	439	GCAATGT GA	1376	CAATGTG A	2313	AATGTG A	3250

10

20

30

40

50

【表 9 - 2 6】

hsa-miR-23a*	GGGGUUCCUGGGGAUGGGAU UU	440	CAGGAAC CC	1377	AGGAACC C	2314	GGAACC C	3251
hsa-miR-23b	AUCACAUUGCCAGGGAUUACC	441	GCAATGT GA	1378	CAATGTG A	2315	AATGTG A	3252
hsa-miR-23b*	UGGGUUCCUGGCAUGCUGAU UU	442	CAGGAAC CC	1379	AGGAACC C	2316	GGAACC C	3253
hsa-miR-24	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACA G	443	AACTGAG CC	1380	ACTGAGC C	2317	CTGAGC C	3254
hsa-miR-24-1*	UGCCUACUGAGCUGAUUACAG U	444	TCAGTAG GC	1381	CAGTAGG C	2318	AGTAGG C	3255
hsa-miR-24-2*	UGCCUACUGAGCUGAAACACA G	445	TCAGTAG GC	1382	CAGTAGG C	2319	AGTAGG C	3256
hsa-miR-25	CAUUGCACUUGUCUCGGUCU GA	446	AAGTGCA AT	1383	AGTGCAA T	2320	GTGCAA T	3257
hsa-miR-25*	AGGCGGAGACUUGGGCAAUUG U	447	GTCTCCG CC	1384	TCTCCGC C	2321	CTCCGC C	3258
hsa-miR-26a	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGC U	448	ATTACTT GA	1385	TTACTTGA	2322	TACTTG A	3259
hsa-miR-26a-1*	CCUUAUUCUUGGUUACUUGCAC G	449	CAAGAAT AG	1386	AAGAATA G	2323	AGAATA G	3260
hsa-miR-26a-2*	CCUUAUUCUUGAUUACUUGUUU C	450	CAAGAAT AG	1387	AAGAATA G	2324	AGAATA G	3261
hsa-miR-26b	UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU U	451	ATTACTT GA	1388	TTACTTGA	2325	TACTTG A	3262
hsa-miR-26b*	CCUGUUCUCCAUAUACUUGGCU C	452	GGAGAAC AG	1389	GAGAACA G	2326	AGAACA G	3263
hsa-miR-27a	UUCACAGUGGCUAAGUUCGGC U	453	CCACTGT GA	1390	CACTGTG A	2327	ACTGTG A	3264
hsa-miR-27a*	AGGGCUUAGCUGCUUGUGAG CA	454	GCTAAGC CC	1391	CTAAGCC C	2328	TAAGCC C	3265
hsa-miR-27b	UUCACAGUGGCUAAGUUCGGC U	455	CCACTGT GA	1392	CACTGTG A	2329	ACTGTG A	3266

10

20

30

40

50

【表 9 - 2 7】

hsa-miR-27b*	AGAGCUUAGCUGAUUGGUGAA C	456	GCTAAGC TC	1393	CTAAGCT C	2330	TAAGCT C	3267
hsa-miR-28-3p	CACUAGAUUGUGAGCUCCUGG A	457	CAATCTA GT	1394	AATCTAG T	2331	ATCTAG T	3268
hsa-miR-28-5p	AAGGAGCUCACAGUCUAUUGA G	458	TGAGCTC CT	1395	GAGCTCC T	2332	AGCTCC T	3269
hsa-miR-296-3p	GAGGGUUGGGUGGAGGCUCU CC	459	CCCAACC CT	1396	CCAACCC T	2333	CAACCC T	3270
hsa-miR-296-5p	AGGGCCCCCCCCUCAUCCUGU 460	460	GGGGGGC CC	1397	GGGGGCC C	2334	GGGGCC C	3271
hsa-miR-297	AUGUAUGUGUGCAUGUGCAUG 461	461	ACACATA CA	1398	CACATAC A	2335	ACATAC A	3272
hsa-miR-298	AGCAGAAGCAGGGAGGUUCUC CCA	462	TGCTTCT GC	1399	GCTTCTG C	2336	CTTCTG C	3273
hsa-miR-299-3p	UAUGUGGGAUGGUAAACCGCU U	463	ATCCCAC AT	1400	TCCCACA T	2337	CCCACA T	3274
hsa-miR-299-5p	UGGUUUACCGUCCACAUACA U	464	CGTAAA CC	1401	GGTAAAC C	2338	GTA AAC C	3275
hsa-miR-29a	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUU A	465	GATGGTG CT	1402	ATGGTGC T	2339	TGGTGC T	3276
hsa-miR-29a*	ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCA G	466	AGAAATC AG	1403	GAAATCA G	2340	AAATCA G	3277
hsa-miR-29b	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUG UU	467	AATGGTG CT	1404	ATGGTGC T	2341	TGGTGC T	3278
hsa-miR-29b-1*	GCUGGUUUCAU AUGGUGGUU UAGA	468	TGAAACC AG	1405	GAAACCA G	2342	AAACCA G	3279
hsa-miR-29b-2*	CUGGUUUCACAUGGUGGCUUA G	469	GTGAAAC CA	1406	TGAAACC A	2343	GAAACC A	3280
hsa-miR-29c	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUU A	470	AATGGTG CT	1407	ATGGTGC T	2344	TGGTGC T	3281
hsa-miR-29c*	UGACCGAUUUCUCCUGGUGUU C	471	AAATCGG TC	1408	AATCGGT C	2345	ATCGGT C	3282
hsa-miR-300	UAUACAAGGGCAGACUCUCUC U	472	CCCTTGT AT	1409	CCTTGTA T	2346	CTTGTA T	3283

10

20

30

40

50

【表 9 - 2 8】

hsa-miR-301a	CAGUGCAAUAGUAUUGUCAAA GC	473	TATTGCA CT	1410	ATTGCAC T	2347	TTGCAC T	3284
hsa-miR-301b	CAGUGCAAUGAUUUGUCAAA GC	474	CATTGCA CT	1411	ATTGCAC T	2348	TTGCAC T	3285
hsa-miR-302a	UAAGUGCUUCCAUGUUUUGGU GA	475	GAAGCAC TT	1412	AAGCACT T	2349	AGCACT T	3286
hsa-miR-302a*	ACUUAAACGUGGAUGUACUUG CU	476	ACGTTTA AG	1413	CGTTTAA G	2350	GTTTAA G	3287
hsa-miR-302b	UAAGUGCUUCCAUGUUUUGU AG	477	GAAGCAC TT	1414	AAGCACT T	2351	AGCACT T	3288
hsa-miR-302b*	ACUUUAACAUGGAAGUGCUUU C	478	ATGTTAA AG	1415	TGTTAAA G	2352	GTTAAA G	3289
hsa-miR-302c	UAAGUGCUUCCAUGUUUCAGU GG	479	GAAGCAC TT	1416	AAGCACT T	2353	AGCACT T	3290
hsa-miR-302c*	UUUAACAUGGGGUACCUGCU G	480	CCATGTT AA	1417	CATGTTA A	2354	ATGTTA A	3291
hsa-miR-302d	UAAGUGCUUCCAUGUUUGAGU GU	481	GAAGCAC TT	1418	AAGCACT T	2355	AGCACT T	3292
hsa-miR-302d*	ACUUUAACAUGGAGGCACUUG C	482	ATGTTAA AG	1419	TGTTAAA G	2356	GTTAAA G	3293
hsa-miR-302e	UAAGUGCUUCCAUGCUU UAAGUGCUUCCAUGCUU	483	GAAGCAC TT	1420	AAGCACT T	2357	AGCACT T	3294
hsa-miR-302f	UAAUUGCUUCCAUGUUU UAAUUGCUUCCAUGUUU	484	GAAGCAA TT	1421	AAGCAAT T	2358	AGCAAT T	3295
hsa-miR-30a	UGUAAACAUCCUCGACUGGAA G	485	GATGTTT AC	1422	ATGTTTAC C	2359	TGTTTA C	3296
hsa-miR-30a*	CUUUCAGUCGGAUGUUUGCAG C	486	CGACTGA AA	1423	GACTGAA A	2360	ACTGAA A	3297
hsa-miR-30b	UGUAAACAUCCUACACUCAGC U	487	GATGTTT AC	1424	ATGTTTAC C	2361	TGTTTA C	3298
hsa-miR-30b*	CUGGGAGGUGGAUGUUUACU UC	488	CACCTCC CA	1425	ACCTCCC A	2362	CCTCCC A	3299

10

20

30

40

50

【表 9 - 2 9】

hsa-miR-30c	UGUAAACAUCCUACACUCUCA GC	489	GATGTTT AC	1426	ATGTTTAC	2363	TGTTTA C	3300
hsa-miR-30c-1*	CUGGGAGAGGGUUGUUUACU CC	490	CCTCTCC CA	1427	CTCTCCC A	2364	TCTCCC A	3301
hsa-miR-30c-2*	CUGGGAGAAGGCUGUUUACUC U	491	CTTCTCC CA	1428	TTCTCCC A	2365	TCTCCC A	3302
hsa-miR-30d	UGUAAACAUCCCCGACUGGAA G	492	GATGTTT AC	1429	ATGTTTAC	2366	TGTTTA C	3303
hsa-miR-30d*	CUUUCAGUCAGAUGUUUGCUG C	493	TGACTGA AA	1430	GA CTGAA A	2367	ACTGAA A	3304
hsa-miR-30e	UGUAAACAUCCUUGACUGGAA G	494	GATGTTT AC	1431	ATGTTTAC	2368	TGTTTA C	3305
hsa-miR-30e*	CUUUCAGUCGGAUGUUUACAG C	495	CGACTGA AA	1432	GA CTGAA A	2369	ACTGAA A	3306
hsa-miR-31	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU U	496	CATCTTG CC	1433	ATCTTGC C	2370	TCTTGC C	3307
hsa-miR-31*	UGCUAUGCCAACAUAUUGCCA U	497	TGGCATA GC	1434	GGCATAG C	2371	GCATAG C	3308
hsa-miR-32	UAUUGCACAUAUACUAAGUUGC A	498	ATGTGCA AT	1435	TGTGCAA T	2372	GTGCAA T	3309
hsa-miR-32*	CAAUUUAGUGUGUGUGAUUU U	499	CACTAAA TT	1436	ACTAAATT	2373	CTAAAT T	3310
hsa-miR-320a	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCG A	500	CCCAGCT TT	1437	CCAGCTT T	2374	CAGCTT T	3311
hsa-miR-320b	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCA A	501	CCCAGCT TT	1438	CCAGCTT T	2375	CAGCTT T	3312
hsa-miR-320c	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGU U	502	CCCAGCT TT	1439	CCAGCTT T	2376	CAGCTT T	3313
hsa-miR-320d	AAAAGCUGGGUUGAGAGGA A	503	CCCAGCT TT	1440	CCAGCTT T	2377	CAGCTT T	3314
hsa-miR-323-3p	CACAUUACACGGUCGACCUCU U	504	GTGTAAT GT	1441	TGTAATG T	2378	GTAATG T	3315
hsa-miR-323-5p	AGGUGGUCGUGGCGCGUUC GC	505	CGGACCA CC	1442	GGACCAC C	2379	GACCAC C	3316

10

20

30

40

50

【表 9 - 3 0】

hsa-miR-324-3p	ACUGCCCCAGGUGCUGCUGG	506	CTGGGGC AG	1443	TGGGGCA G	2380	GGGGCA G	3317
hsa-miR-324-5p	CGCAUCCCCUAGGGCAUUGG UGU	507	AGGGGAT GC	1444	GGGGATG C	2381	GGGATG C	3318
hsa-miR-325	CCUAGUAGGUGUCCAGUAAGU GU	508	ACCTACT AG	1445	CCTACTA G	2382	CTACTA G	3319
hsa-miR-326	CCUCUGGGCCCUUCCUCCAG	509	GGCCCAG AG	1446	GCCCAGA G	2383	CCCAGA G	3320
hsa-miR-328	CUGGGCCUCUCUGCCCUUCC GU	510	AGAGGGC CA	1447	GAGGGCC A	2384	AGGGCC A	3321
hsa-miR-329	AACACACCUUGGUUAACCUCUU U	511	CAGGTGT GT	1448	AGGTGTG T	2385	GGTGTG T	3322
hsa-miR-330-3p	GCAAAGCACACGGCCUGCAGA GA	512	TGTGCTT TG	1449	GTGCTTT G	2386	TGCTTT G	3323
hsa-miR-330-5p	UCUCUGGGCCUGUGUCUUAG GC	513	GGCCCAG AG	1450	GCCCAGA G	2387	CCCAGA G	3324
hsa-miR-331-3p	GCCCCUGGGCCUAUCCUAGAA	514	GCCCAGG GG	1451	CCCAGGG G	2388	CCAGGG G	3325
hsa-miR-331-5p	CUAGGUAUGGUCCCAGGGAUC C	515	CCATACC TA	1452	CATACCT A	2389	ATACCT A	3326
hsa-miR-335	UCAAGAGCAAUAACGAAAAAU GU	516	TTGCTCTT G	1453	TGCTCTT G	2390	GCTCTT G	3327
hsa-miR-335*	UUUUUCAUUUUGCUCCUGAC C	517	TAATGAA AA	1454	AATGAAA A	2391	ATGAAA A	3328
hsa-miR-337-3p	CUCCUAUAUGAUGCCUUUCUU C	518	CATATAG GA	1455	ATATAGG A	2392	TATAGG A	3329
hsa-miR-337-5p	GAACGGCUUCAUACAGGAGUU	519	GAAGCCG TT	1456	AAGCCGT T	2393	AGCCGT T	3330
hsa-miR-338-3p	UCCAGCAUCAGUGAUUUUGUU G	520	TGATGCT GG	1457	GATGCTG G	2394	ATGCTG G	3331

10

20

30

40

50

【表 9 - 3 1】

hsa-miR-338-5p	AACAAUAUCCUGGUGCUGAGU G	521	GGATATT GT	1458	GATATTG T	2395	ATATTG T	3332
hsa-miR-339-3p	UGAGCGCCUCGACGACAGAGC CG	522	GAGGCGC TC	1459	AGGCGCT C	2396	GGCGCT C	3333
hsa-miR-339-5p	UCCCGUCCUCCAGGAGCUCA CG	523	AGGACAG GG	1460	GGACAGG G	2397	GACAGG G	3334
hsa-miR-33a	GUGCAUUGUAGUUGCAUUGCA 524	524	TACAATG CA	1461	ACAATGC A	2398	CAATGC A	3335
hsa-miR-33a*	CAAUGUUUCCACAGUGCAUCA C	525	GGAAACA TT	1462	GAAACAT T	2399	AAACAT T	3336
hsa-miR-33b	GUGCAUUGCUGUUGCAUUGC 526	526	AGCAATG CA	1463	GCAATGC A	2400	CAATGC A	3337
hsa-miR-33b*	CAGUGCCUCGGCAGUGCAGC CC	527	CGAGGCA CT	1464	GAGGCAC T	2401	AGGCAC T	3338
hsa-miR-340	UUAUAAAAGCAAUGAGACUGAU U	528	TGCTTTAT A	1465	GCTTTATA A	2402	CTTTAT A	3339
hsa-miR-340*	UCCGUCUCAGUUACUUUAUAG C	529	CTGAGAC GG	1466	TGAGACG G	2403	GAGACG G	3340
hsa-miR-342-3p	UCUCACACAGAAAUCGCACCC GU	530	CTGTGTG AG	1467	TGTGTGA G	2404	GTGTGA G	3341
hsa-miR-342-5p	AGGGGUGCUAUCUGUGAUUGA 531	531	TAGCACC CC	1468	AGCACCC C	2405	GCACCC C	3342
hsa-miR-345	GCUGACUCCUAGUCCAGGGC UC	532	AGGAGTC AG	1469	GGAGTCA G	2406	GAGTCA G	3343
hsa-miR-346	UGUCUGCCCGCAUGCCUGCC UCU	533	CGGGCAG AC	1470	GGGCAGA C	2407	GGCAGA C	3344
hsa-miR-34a	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUU GU	534	GACACTG CC	1471	ACACTGC C	2408	CACTGC C	3345
hsa-miR-34a*	CAAUCAGCAAGUAUACUGCCC U	535	TTGCTGA TT	1472	TGCTGAT T	2409	GCTGAT T	3346
hsa-miR-34b	CAAUCACUAACUCCACUGCCA U	536	TTAGTGA TT	1473	TAGTGAT T	2410	AGTGAT T	3347
hsa-miR-34b*	UAGGCAGUGUCAUUAGCUGAU UG	537	ACACTGC CT	1474	CACTGCC T	2411	ACTGCC T	3348

10

20

30

40

50

【表 9 - 3 2】

hsa-miR-34c-3p	AAUCACUAACCACACGGCCAG G	538	GTTAGTG AT	1475	TTAGTGA T	2412	TAGTGA T	3349
hsa-miR-34c-5p	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUU GC	539	TACACTG CC	1476	ACACTGC C	2413	CACTGC C	3350
hsa-miR-361-3p	UCCCCCAGGUGUGAUUCUGAU UU	540	ACCTGGG GG	1477	CCTGGGG G	2414	CTGGGG G	3351
hsa-miR-361-5p	UUAUCAGAAUCUCCAGGGGUA C	541	ATTCTGA TA	1478	TTCTGATA T	2415	TCTGAT A	3352
hsa-miR-362-3p	AACACACCUAUUCAAGGAUUC A	542	TAGGTGT GT	1479	AGGTGTG T	2416	GGTGTG T	3353
hsa-miR-362-5p	AAUCCUUGGAACCUAGGUGUG AGU	543	TCCAAGG AT	1480	CCAAGGA T	2417	CAAGGA T	3354
hsa-miR-363	AAUUGCACGGUAUCCAUCUGU A	544	CCGTGCA AT	1481	CGTGCAA T	2418	GTGCAA T	3355
hsa-miR-363*	CGGGUGGAUCACGAUGCAAUU U	545	GATCCAC CC	1482	ATCCACC C	2419	TCCACC C	3356
hsa-miR-365	UAAUGCCCCUAAAAUCCUUA U	546	AGGGGCA TT	1483	GGGGCAT T	2420	GGGCAT T	3357
hsa-miR-367	AAUUGCACUUUAGCAAUGGUG A	547	AAGTGCA AT	1484	AGTGCAA T	2421	GTGCAA T	3358
hsa-miR-367*	ACUGUUGC UAAUAUGCAACUC U	548	TAGCAAC AG	1485	AGCAACA G	2422	GCAACA G	3359
hsa-miR-369-3p	AAUAAUACAUGGUUGAUCUUU T	549	ATGTATTA T	1486	TGTATTAT T	2423	GTATTA T	3360
hsa-miR-369-5p	AGAUCGACCGUGUUUAUUCG C	550	CGGTGCA TC	1487	GGTCGAT C	2424	GTTCGAT C	3361
hsa-miR-370	GCCUGCUGGGGUGGAACCG GU	551	CCCAGCA GG	1488	CCAGCAG G	2425	CAGCAG G	3362
hsa-miR-371-3p	AAGUGCCGCCAUCUUUUGAGU GU	552	GGCGGCA CT	1489	GCGGCAC T	2426	CGGCAC T	3363
hsa-miR-371-5p	ACUCAAACUGUGGGGGCACU AG	553	CAGTTTG AG	1490	AGTTTGA G	2427	GTTTGA G	3364
hsa-miR-372	AAAGUGCUGCGACAUUUGAGC GU	554	GCAGCAC TT	1491	CAGCACT T	2428	AGCACT T	3365

10

20

30

40

50

【表 9 - 3 3】

hsa-miR-373	GAAGUGCUUCGAUUUUUGGGG UGU	555	GAAGCAC TT	1492	AAGCACT T	2429	AGCACT T	3366
hsa-miR-373*	ACUCAAAAUGGGGGCGCUUUC C	556	CATTTTG AG	1493	ATTTTGA G	2430	TTTTGA G	3367
hsa-miR-374a	UUAUAAUACAACCUGAUAGU G	557	TGTATTAT A	1494	GTATTATA A	2431	TATTAT A	3368
hsa-miR-374a*	CUUAUCAGAUUGUAUUGUAAU U	558	ATCTGAT AA	1495	TCTGATA A	2432	CTGATA A	3369
hsa-miR-374b	AUAUAAUACAACCUGCUAAGU G	559	TGTATTAT A	1496	GTATTATA A	2433	TATTAT A	3370
hsa-miR-374b*	CUUAGCAGGUUGUAUUUCAU U	560	ACCTGCT AA	1497	CCTGCTA A	2434	CTGCTA A	3371
hsa-miR-375	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGU GA	561	AACGAAC AA	1498	ACGAACA A	2435	CGAACA A	3372
hsa-miR-376a	AUCAUAGAGGAAAAUCCACGU U	562	CCTCTAT GA	1499	CTCTATG A	2436	TCTATG A	3373
hsa-miR-376a*	GUAGAUUCUCCUUCUAUGAGU A	563	GAGAATC TA	1500	AGAATCT A	2437	GAATCT A	3374
hsa-miR-376b	AUCAUAGAGGAAAAUCCAUGU U	564	CCTCTAT GA	1501	CTCTATG A	2438	TCTATG A	3375
hsa-miR-376c	AACAUAGAGGAAAAUCCACGU U	565	CCTCTAT GT	1502	CTCTATG T	2439	TCTATG T	3376
hsa-miR-377	AUCACACAAAGGCAACUUUUG U	566	TTTGTGT GA	1503	TTGTGTG A	2440	TGTGTG A	3377
hsa-miR-377*	AGAGGUUGCCCUUGGUGAAUU C	567	GGCAACC TC	1504	GCAACCT C	2441	CAACCT C	3378
hsa-miR-378	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGG U	568	CAAGTCC AG	1505	AAGTCCA G	2442	AGTCCA G	3379
hsa-miR-378*	CUCCUGACUCCAGGUCCUGU GU	569	GAGTCAG GA	1506	AGTCAGG A	2443	GTCAGG A	3380

10

20

30

40

50

【表 9 - 3 4】

hsa-miR-379	UGGUAGACUAUGGAACGUAGG	570	TAGTCTA CC	1507	AGTCTAC C	2444	GTCTAC C	3381
hsa-miR-379*	UAUGUAACAUGGUCCACUAAC U	571	ATGTTAC AT	1508	TGTTACAT	2445	GTTACA T	3382
hsa-miR-380	UAUGUAAUAUGGUCCACAUCU U	572	ATATTACA T	1509	TATTACAT	2446	ATTACA T	3383
hsa-miR-380*	UGGUUGACCAUAGAACAUGCG C	573	TGGTCAA CC	1510	GGTCAAC C	2447	GTCAAC C	3384
hsa-miR-381	UAUACAAGGGCAAGCUCUCUG U	574	CCCTTGT AT	1511	CCTTGTA T	2448	CTTGTA T	3385
hsa-miR-382	GAAGUUGUUCGUGGUGGAUU CG	575	GAACAAC TT	1512	AACAAC T	2449	ACAAC T	3386
hsa-miR-383	AGAUCAGAAGGUGAUUGUGGC U	576	CTTCTGA TC	1513	TTCTGAT C	2450	TCTGAT C	3387
hsa-miR-384	AUUCCUAGAAAUGUUCAUA U	577	TTCTAGG AA	1514	TCTAGGA A	2451	CTAGGA A	3388
hsa-miR-409-3p	GAAUGUUGCUCGGUGAACCCC U	578	AGCAACA TT	1515	GCAACAT T	2452	CAACAT T	3389
hsa-miR-409-5p	AGGUUACCCGAGCAACUUUGC AU	579	CGGGTAA CC	1516	GGGTAAAC C	2453	GGTAAAC C	3390
hsa-miR-410	AAUAUAACACAGAUGGCCUGU U	580	GTGTTAT AT	1517	TGTTATAT	2454	GTTATA T	3391
hsa-miR-411	UAGUAGACCGUAGCGUACG U	581	CGGTCTA CT	1518	GGTCTAC T	2455	GTCTAC T	3392
hsa-miR-411*	UAUGUAACACGGUCCACUAAC C	582	GTGTTAC AT	1519	TGTTACAT	2456	GTTACA T	3393
hsa-miR-412	ACUUCACCGUGUCCACUAGCC GU	583	CAGGTGA AG	1520	AGGTGAA G	2457	GGTGAA G	3394
hsa-miR-421	AUCAACAGACAUAAUUGGGC GC	584	GTCTGTT GA	1521	TCTGTTG A	2458	CTGTTG A	3395
hsa-miR-422a	ACUGGACUUAGGGUCAGAAGG C	585	TAAGTCC AG	1522	AAGTCCA G	2459	AGTCCA G	3396
hsa-miR-423-3p	AGCUCGGUCUGAGGCCCCUC AGU	586	AGACCGA GC	1523	GACCGAG C	2460	ACCGAG C	3397

10

20

30

40

50

【表 9 - 3 5】

hsa-miR-423-5p	UGAGGGGCAGAGAGCGAGACU UU	587	CTGCCCC TC	1524	TGCCCCCT C	2461	GCCCCT C	3398
hsa-miR-424	CAGCAGCAAUUCAUGUUUUGA A	588	ATTGCTG CT	1525	TTGCTGC T	2462	TGCTGC T	3399
hsa-miR-424*	CAAAACGUGAGGCGCUGCUAU	589	TCACGTT TT	1526	CACGTTT T	2463	ACGTTT T	3400
hsa-miR-425	AAUGACACGAUCACUCCCGUU GA	590	TCGTGTC AT	1527	CGTGTCA T	2464	GTGTCA T	3401
hsa-miR-425*	AUCGGGAAUGUCGUGUCCGC CC	591	CATTCCC GA	1528	ATTCCCG A	2465	TTCCCG A	3402
hsa-miR-429	UAAUACUGUCUGGUAAAACCG U	592	GACAGTA TT	1529	ACAGTAT T	2466	CAGTAT T	3403
hsa-miR-431	UGUCUUGCAGGCCGUAUGCA	593	CTGCAAG AC	1530	TGCAAGA C	2467	GCAAGA C	3404
hsa-miR-431*	CAGGUCGUCUUGCAGGGCUU CU	594	AGACGAC CT	1531	GACGACC T	2468	ACGACC T	3405
hsa-miR-432	UCUUGGAGUAGGUCAUUGGG UGG	595	TACTCCA AG	1532	ACTCCAA G	2469	CTCCAA G	3406
hsa-miR-432*	CUGGAUGGCCUCCUCAUGUC U	596	AGCCATC CA	1533	GCCATCC A	2470	CCATCC A	3407
hsa-miR-433	AUCAUGAUGGGCUCCUCGGU GU	597	CCATCAT GA	1534	CATCATG A	2471	ATCATG A	3408
hsa-miR-448	UUGCAUAUGUAGGAUGUCCCA U	598	ACATATG CA	1535	CATATGC A	2472	ATATGC A	3409
hsa-miR-449a	UGGCAGUGUAUUGUUAGCUG GU	599	TACACTG CC	1536	ACACTGC C	2473	CACTGC C	3410
hsa-miR-449b	AGGCAGUGUAUUGUUAGCUGG C	600	TACACTG CC	1537	ACACTGC C	2474	CACTGC C	3411
hsa-miR-450a	UUUUGCGAUGUGUUCCUAAUA U	601	CATCGCA AA	1538	ATCGCAA A	2475	TCGCAA A	3412
hsa-miR-450b-3p	UUGGGAUCAUUUUGCAUCCA A	602	ATGATCC CA	1539	TGATCCC A	2476	GATCCC A	3413
hsa-miR-450b-5p	UUUUGCAAUAUGUCCUGAAU A	603	TATTGCA AA	1540	ATTGCAA A	2477	TTGCAA A	3414

10

20

30

40

50

【表 9 - 3 6】

hsa-miR-451	AAACCGUUACCAUUACUGAGU U	604	GTAACGG TT	1541	TAACGGT T	2478	AACGGT T	3415
hsa-miR-452	AACUGUUUGCAGAGGAAACUG A	605	GCAAACA GT	1542	CAAACAG T	2479	AAACAG T	3416
hsa-miR-452*	CUCAUCUGCAAAGAAGUAAGU G	606	TGCAGAT GA	1543	GCAGATG A	2480	CAGATG A	3417
hsa-miR-453	AGGUUGUCCGUGGUGAGUUC GCA	607	CGGACAA CC	1544	GGACAAC C	2481	GACAAC C	3418
hsa-miR-454	UAGUGCAAUAUUGCUUAUAGG GU	608	TATTGCA CT	1545	ATTGCAC T	2482	TTGCAC T	3419
hsa-miR-454*	ACCCUAUCAAAUUGUCUCUG C	609	TTGATAG GG	1546	TGATAGG G	2483	GATAGG G	3420
hsa-miR-455-3p	GCAGUCCAUGGGCAUAUACAC G	610	CATGGAC TG	1547	ATGGACT G	2484	TGGACT G	3421
hsa-miR-455-5p	UAUGUGCCUUUGGACUACAUC G	611	AAGGCAC AT	1548	AGGCACA T	2485	GGCACA T	3422
hsa-miR-483-3p	UCACUCCUCUCCUCCCGUCUU G	612	AGAGGAG TG	1549	GAGGAGT G	2486	AGGAGT G	3423
hsa-miR-483-5p	AAGACGGGAGGAAAGAAGGGA G	613	CTCCCGT CT	1550	TCCCGTC T	2487	CCCGTC T	3424
hsa-miR-484	UCAGGCUCAGUCCCCUCCGA U	614	CTGAGCC TG	1551	TGAGCCT G	2488	GAGCCT G	3425
hsa-miR-485-3p	GUCAUACACGGCUCUCCUCUC U	615	CGTGTAT GA	1552	GTGTATG A	2489	TGTATG A	3426
hsa-miR-485-5p	AGAGGCUGGCCGUGAUGAAUU C	616	GCCAGCC TC	1553	CCAGCCT C	2490	CAGCCT C	3427
hsa-miR-486-3p	CGGGGCAGCUCAGUACAGGAU G	617	AGCTGCC CC	1554	GCTGCCC C	2491	CTGCCC C	3428
hsa-miR-486-5p	UCCUGUACUGAGCUGCCCCGA G	618	CAGTACA GG	1555	AGTACAG G	2492	GTACAG G	3429

10

20

30

40

50

【表 9 - 3 7】

hsa-miR-487a	AAUCAUACAGGGACAUCCAGU U	619	CTGTATG AT	1556	TGTATGA T	2493	GTATGA T	3430
hsa-miR-487b	AAUCGUACAGGGUCAUCCACU U	620	CTGTACG AT	1557	TGTACGA T	2494	GTACGA T	3431
hsa-miR-488	UUGAAAGGCUAUUUCUUGGUC U	621	AGCCTTT CA	1558	GCCTTTC A	2495	CCTTTC A	3432
hsa-miR-488*	CCCAGAUAAUGGCACUCUCA A	622	ATTATCT GG	1559	TTATCTG G	2496	TATCTG G	3433
hsa-miR-489	GUGACAUCACAUAUACGGCAG C	623	GTGATGT CA	1560	TGATGTC A	2497	GATGTC A	3434
hsa-miR-490-3p	CAACCUGGAGGACUCCAUGC G	624	CTCCAGG TT	1561	TCCAGGT T	2498	CCAGGT T	3435
hsa-miR-490-5p	CCAUGGAUCUCCAGGUGGGU U	625	AGATCCA TG	1562	GATCCAT G	2499	ATCCAT G	3436
hsa-miR-491-3p	CUUAUGCAAGAUAUCCCUUCU A	626	CTTGCAT AA	1563	TTGCATA A	2500	TGCATA A	3437
hsa-miR-491-5p	AGUGGGGAACCCUCCAUGAG G	627	GTTCCCC AC	1564	TTCCCCA C	2501	TCCCCA C	3438
hsa-miR-492	AGGACCUGCGGGACAAGAUUC UU	628	CGCAGGT CC	1565	GCAGGTC C	2502	CAGGTC C	3439
hsa-miR-493	UGAAGGUCUACUGUGUGCCAG G	629	TAGACCT TC	1566	AGACCTT C	2503	GACCTT C	3440
hsa-miR-493*	UUGUACAUGGUAGGCUUUCU U	630	CCATGTA CA	1567	CATGTAC A	2504	ATGTAC A	3441
hsa-miR-494	UGAAACAUAACACGGGAAACCU C	631	GTATGTTT C	1568	TATGTTTC C	2505	ATGTTT C	3442
hsa-miR-495	AAACAAACAUGGUGCACUUCU U	632	ATGTTTGT T	1569	TGTTTGTT T	2506	GTTTGT T	3443
hsa-miR-496	UGAGUAUUACAUGGCCAAUCU C	633	GTAATAC TC	1570	TAATACT C	2507	AATACT C	3444
hsa-miR-497	CAGCAGCACACUGUGGUUUGU U	634	TGTGCTG CT	1571	GTGCTGC T	2508	TGCTGC T	3445
hsa-miR-497*	CAAACCACACUGUGGUGUUAG A	635	GTGTGGT TT	1572	TGTGGTT T	2509	GTGGTT T	3446

10

20

30

40

50

【表 9 - 3 8】

hsa-miR-498	UUUCAAGCCAGGGGGCGUUUU UC	636	TGGCTTG AA	1573	GGCTTGA A	2510	GCTTGA A	3447
hsa-miR-499-3p	AACAUCACAGCAAGUCUGUGC U	637	CTGTGAT GT	1574	TGTGATG T	2511	GTGATG T	3448
hsa-miR-499-5p	UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU GA	638	CAAGTCT TA	1575	AAGTCTT A	2512	AGTCTT A	3449
hsa-miR-500	UAAUCCUUGCUACCUGGGUGA GA	639	GCAAGGA TT	1576	CAAGGAT T	2513	AAGGAT T	3450
hsa-miR-500*	AUGCACCUGGGCAAGGAUUCU G	640	CCAGGTG CA	1577	CAGGTGC A	2514	AGGTGC A	3451
hsa-miR-501-3p	AAUGCACCCGGGCAAGGAUUC U	641	CGGGTGC AT	1578	GGGTGCA T	2515	GGTGCA T	3452
hsa-miR-501-5p	AAUCCUUUGUCCUGGGUGAG A	642	ACAAAGG AT	1579	CAAAGGA T	2516	AAAGGA T	3453
hsa-miR-502-3p	AAUGCACCUGGGCAAGGAUUC A	643	CAGGTGC AT	1580	AGGTGCA T	2517	GGTGCA T	3454
hsa-miR-502-5p	AUCCUUGCUAUCUGGGUGCUA C	644	TAGCAAG GA	1581	AGCAAGG A	2518	GCAAGG A	3455
hsa-miR-503	UAGCAGCGGGAACAGUUCUGC AG	645	CCCGCTG CT	1582	CCGCTGC T	2519	CGCTGC T	3456
hsa-miR-504	AGACCCUGGUCUGCACUCUAU C	646	ACCAGGG TC	1583	CCAGGGT C	2520	CAGGGT C	3457
hsa-miR-505	CGUCAACACUUGCUGGUUUC U	647	AGTGTTG AC	1584	GTGTTGA C	2521	TGTTGA C	3458
hsa-miR-505*	GGGAGCCAGGAAGUAUUGAUG U	648	CCTGGCT CC	1585	CTGGCTC C	2522	TGGCTC C	3459
hsa-miR-506	UAAGGCACCCUUCUGAGUAGA GA	649	GGGTGCC TT	1586	GGTGCCT T	2523	GTGCCT T	3460
hsa-miR-507	UUUUGCACCUUUUGGAGUGAA GA	650	AGGTGCA AA	1587	GGTGCAA A	2524	GTGCAA A	3461
hsa-miR-508-3p	UGAUUGUAGCCUUUUGGAGUA GA	651	GCTACAA TC	1588	CTACAAT C	2525	TACAAT C	3462
hsa-miR-508-5p	UACUCCAGAGGGCGUCACUCA UG	652	CTCTGGA GT	1589	TCTGGAG T	2526	CTGGAG T	3463

10

20

30

40

50

【表 9 - 3 9】

hsa-miR-509-3-5p	UACUGCAGACGUGGCAAUCAU G	653	GTCTGCA GT	1590	TCTGCAG T	2527	CTGCAG T	3464
hsa-miR-509-3p	UGAUUGGUACGUCUGUGGGU AG	654	GTACCAA TC	1591	TACCAAT C	2528	ACCAAT C	3465
hsa-miR-509-5p	UACUGCAGACAGUGGCAAUCA C	655	GTCTGCA GT	1592	TCTGCAG T	2529	CTGCAG T	3466
hsa-miR-510	UACUCAGGAGAGUGGCAAUCA C	656	CTCCTGA GT	1593	TCCTGAG T	2530	CCTGAG T	3467
hsa-miR-511	GUGUCUUUUGCUCUGCAGUCA C	657	CAAAAGA CA	1594	AAAAGAC A	2531	AAAGAC A	3468
hsa-miR-512-3p	AAGUGCUGUCAUAGCUGAGGU C	658	GACAGCA CT	1595	ACAGCAC T	2532	CAGCAC T	3469
hsa-miR-512-5p	CACUCAGCCUUGAGGGCACUU UC	659	AGGCTGA GT	1596	GGCTGAG T	2533	GCTGAG T	3470
hsa-miR-513a-3p	UAAAUUUCACCUUUCUGAGAA GG	660	GTGAAAT TT	1597	TGAAATTT T	2534	GAAATT T	3471
hsa-miR-513a-5p	UUCACAGGGAGGUGUCAU U	661	TCCCTGT GA	1598	CCCTGTG A	2535	CCTGTG A	3472
hsa-miR-513b	UUCACAAGGAGGUGUCAUUUA U	662	TCCTTGT GA	1599	CCTTGTG A	2536	CTTGTG A	3473
hsa-miR-513c	UUCUCAAGGAGGUGUCGUUUA U	663	TCCTTGA GA	1600	CCTTGAG A	2537	CTTGAG A	3474
hsa-miR-514	AUUGACACUUCUGUGAGUAGA U	664	AAGTGTC AA	1601	AGTGTC A	2538	GTGTCA A	3475
hsa-miR-515-3p	GAGUGCCUUCUUUUGGAGCG UU	665	GAAGGCA CT	1602	AAGGCAC T	2539	AGGCAC T	3476
hsa-miR-515-5p	UUCUCCAAAAGAAAGCACUUU CUG	666	TTTTGGA GA	1603	TTTGGAG A	2540	TTGGAG A	3477
hsa-miR-516a-3p	UGCUUCCUUUCAGAGGGU U	667	AAAGGAA GC	1604	AAGGAAG C	2541	AGGAAG C	3478
hsa-miR-516a-5p	UUCUCGAGGAAAGAAGCACUU UC	668	TCCTCGA GA	1605	CCTCGAG A	2542	CTCGAG A	3479

10

20

30

40

50

【表 9 - 4 0】

hsa-miR-516b	AUCUGGAGGUAAGAAGCACUU U	669	ACCTCCA GA	1606	CCTCCAG A	2543	CTCCAG A	3480
hsa-miR-517*	CCUCUAGAUGGAAGCACUGUC U	670	CATCTAG AG	1607	ATCTAGA G	2544	TCTAGA G	3481
hsa-miR-517a	AUCGUGCAUCCUUUAGAGUG U	671	GATGCAC GA	1608	ATGCACG A	2545	TGCACG A	3482
hsa-miR-517b	UCGUGCAUCCUUUAGAGUGU U	672	GGATGCA CG	1609	GATGCAC G	2546	ATGCAC G	3483
hsa-miR-517c	AUCGUGCAUCCUUUAGAGUG U	673	GATGCAC GA	1610	ATGCACG A	2547	TGCACG A	3484
hsa-miR-518a-3p	GAAAGCGCUUCCUUUGCUGG A	674	AAGCGCT TT	1611	AGCGCTT T	2548	GCGCTT T	3485
hsa-miR-518b	CAAAGCGCUCCUUUAGAGG U	675	GAGCGCT TT	1612	AGCGCTT T	2549	GCGCTT T	3486
hsa-miR-518c	CAAAGCGCUUCUCUUUAGAGU GU	676	AAGCGCT TT	1613	AGCGCTT T	2550	GCGCTT T	3487
hsa-miR-518c*	UCUCUGGAGGGAAGCACUUUC UG	677	CCTCCAG AG	1614	CTCCAGA G	2551	TCCAGA G	3488
hsa-miR-518d-3p	CAAAGCGCUUCCUUUGGAGC A	678	AAGCGCT TT	1615	AGCGCTT T	2552	GCGCTT T	3489
hsa-miR-518d-5p	CUCUAGAGGGAAGCACUUUCU G	679	CCCTCTA GA	1616	CCTCTAG A	2553	CTCTAG A	3490
hsa-miR-518e	AAAGCGCUUCCUUUCAGAGUG U	680	GAAGCGC TT	1617	AAGCGCT T	2554	AGCGCT T	3491
hsa-miR-518f	GAAAGCGCUUCUCUUUAGAGG U	681	AAGCGCT TT	1618	AGCGCTT T	2555	GCGCTT T	3492
hsa-miR-518f*	CUCUAGAGGGAAGCACUUUCU C	682	CCCTCTA GA	1619	CCTCTAG A	2556	CTCTAG A	3493
hsa-miR-519a	AAAGUGCAUCCUUUAGAGUG U	683	GATGCAC TT	1620	ATGCACT T	2557	TGCACT T	3494
hsa-miR-519a*	CUCUAGAGGGAAGCGCUUUCU G	684	CCCTCTA GA	1621	CCTCTAG A	2558	CTCTAG A	3495
hsa-miR-519b-3p	AAAGUGCAUCCUUUAGAGGU U	685	GATGCAC TT	1622	ATGCACT T	2559	TGCACT T	3496

10

20

30

40

50

【表 9 - 4 1】

hsa-miR-519c-3p	AAAGUGCAUCUUUUUAGAGGA U	686	GATGCAC TT	1623	ATGCACT T	2560	TGCACT T	3497
hsa-miR-519d	CAAAGUGCCUCCUUUAGAGU G	687	AGGCACT TT	1624	GGCACTT T	2561	GCACTT T	3498
hsa-miR-519e	AAGUGCCUCCUUUAGAGUGU U	688	GGAGGCA CT	1625	GAGGCAC T	2562	AGGCAC T	3499
hsa-miR-519e*	UUCUCCAAAAGGGAGCACUUU C	689	TTTTGGA GA	1626	TTTGAG A	2563	TTGGAG A	3500
hsa-miR-520a-3p	AAAGUGCUUCCUUUGGACUG U	690	GAAGCAC TT	1627	AAGCACT T	2564	AGCACT T	3501
hsa-miR-520a-5p	CUCCAGAGGGAAGUACUUUCU U	691	CCCTCTG GA	1628	CCTCTGG A	2565	CTCTGG A	3502
hsa-miR-520b	AAAGUGCUUCCUUUAGAGGG U	692	GAAGCAC TT	1629	AAGCACT T	2566	AGCACT T	3503
hsa-miR-520c-3p	AAAGUGCUUCCUUUAGAGGG U	693	GAAGCAC TT	1630	AAGCACT T	2567	AGCACT T	3504
hsa-miR-520d-3p	AAAGUGCUUCUCUUUGGUGGG U	694	GAAGCAC TT	1631	AAGCACT T	2568	AGCACT T	3505
hsa-miR-520d-5p	CUACAAAGGGAAGCCUUUC U	695	CCCTTTG TA	1632	CCTTTGT A	2569	CTTTGT A	3506
hsa-miR-520e	AAAGUGCUUCCUUUUGAGGG U	696	GAAGCAC TT	1633	AAGCACT T	2570	AGCACT T	3507
hsa-miR-520f	AAGUGCUUCCUUUAGAGGGU U	697	GGAAGCA CT	1634	GAAGCAC T	2571	AAGCAC T	3508
hsa-miR-520g	ACAAAGUGCUUCCUUUAGAG UGU	698	AGCACTT TG	1635	GCACTTT G	2572	CACTTT G	3509
hsa-miR-520h	ACAAAGUGCUUCCUUUAGAG U	699	AGCACTT TG	1636	GCACTTT G	2573	CACTTT G	3510
hsa-miR-521	AACGCACUUCCUUUAGAGUG U	700	GAAGTGC GT	1637	AAGTGCG T	2574	AGTGCG T	3511
hsa-miR-522	AAAAUGGUUCCUUUAGAGUG U	701	GAACCAT TT	1638	AACCATT T	2575	ACCATT T	3512
hsa-miR-523	GAACGCGCUUCCUAUAGAGG GU	702	AAGCGCG TT	1639	AGCGCGT T	2576	GCGCGT T	3513

10

20

30

40

50

【表 9 - 4 2】

hsa-miR-524-3p	GAAGGCGCUUCCCUUUGGAG U	703	AAGCGCC TT	1640	AGCGCCT T	2577	GCGCCT T	3514
hsa-miR-524-5p	CUACAAAGGGAAGCACUUUCU C	704	CCCTTTG TA	1641	CCTTTGT A	2578	CTTTGT A	3515
hsa-miR-525-3p	GAAGGCGCUUCCCUUUAGAGC G	705	AAGCGCC TT	1642	AGCGCCT T	2579	GCGCCT T	3516
hsa-miR-525-5p	CUCCAGAGGGAUGCACUUUCU 706	706	CCCTCTG GA	1643	CCTCTGG A	2580	CTCTGG A	3517
hsa-miR-526b	CUCUUGAGGGAAGCACUUUCU GU	707	CCCTCAA GA	1644	CCTCAAG A	2581	CTCAAG A	3518
hsa-miR-526b*	GAAAGUGCUUCCUUUUAGAGG C	708	AAGCACT TT	1645	AGCACTT T	2582	GCACTT T	3519
hsa-miR-527	CUGCAAAGGGAAGCCCUUUC 709	709	CCCTTTG CA	1646	CCTTTGC A	2583	CTTTGC A	3520
hsa-miR-532-3p	CCUCCACACCCAAGGCUUGC A	710	GTGTGGG AG	1647	TGTGGGA G	2584	GTGGGA G	3521
hsa-miR-532-5p	CAUGCCUUGAGUGUAGGACCG U	711	TCAAGGC AT	1648	CAAGGCA T	2585	AAGGCA T	3522
hsa-miR-539	GGAGAAUUUAUCCUUGGUGUG U	712	TAATTTCT C	1649	AATTTCTC C	2586	ATTTCT C	3523
hsa-miR-541	UGGUGGGCACAGAAUCUGGAC U	713	GTGCCCA CC	1650	TGCCCAC C	2587	GCCCAC C	3524
hsa-miR-541*	AAAGGAUUCUGCUGUCGGUCC CACU	714	AGAATCC TT	1651	GAATCCT T	2588	AATCCT T	3525
hsa-miR-542-3p	UGUGACAGAUUGAUACUGAA A	715	ATCTGTC AC	1652	TCTGTCA C	2589	CTGTCA C	3526
hsa-miR-542-5p	UCGGGGAUCAUCAUGUCACGA GA	716	TGATCCC CG	1653	GATCCCC G	2590	ATCCCC G	3527
hsa-miR-543	AAACAUUCGCGGUGCACUUCU U	717	GCGAATG TT	1654	CGAATGT T	2591	GAATGT T	3528
hsa-miR-544	AUUCUGCAUUUUUJAGCAAGUU C	718	AATGCAG AA	1655	ATGCAGA A	2592	TGCAGA A	3529

10

20

30

40

50

【表 9 - 4 3】

hsa-miR-545	UCAGCAAACAUUUUAUUGUGUG C	719	TGTTTGC TG	1656	GTTTGCT G	2593	TTTGCT G	3530
hsa-miR-545*	UCAGUAAAUGUUUUAUAGAUG A	720	CATTTACT G	1657	ATTTACTG	2594	TTTACT G	3531
hsa-miR-548a-3p	CAAAACUGGCCAAUACUUUUG C	721	GCCAGTT TT	1658	CCAGTTT T	2595	CAGTTT T	3532
hsa-miR-548a-5p	AAAAGUAAUUGCGAGUUUUAC C	722	AATTACTT T	1659	ATTACTTT	2596	TTACTT T	3533
hsa-miR-548b-3p	CAAGAACCUCAGUUGC UUUG U	723	GAGGTTC TT	1660	AGGTTCT T	2597	GGTTCT T	3534
hsa-miR-548b-5p	AAAAGUAAUUGUGUUUUUGGC C	724	AATTACTT T	1661	ATTACTTT	2598	TTACTT T	3535
hsa-miR-548c-3p	CAAAAAUCUCAAUUACUUUUG C	725	GAGATTT TT	1662	AGATTTTT	2599	GATTTT T	3536
hsa-miR-548c-5p	AAAAGUAAUUGCGUUUUUGC C	726	AATTACTT T	1663	ATTACTTT	2600	TTACTT T	3537
hsa-miR-548d-3p	CAAAAACCACAGUUUCUUUUG C	727	GTGGTTT TT	1664	TGGTTTTT	2601	GGTTTT T	3538
hsa-miR-548d-5p	AAAAGUAAUUGUGUUUUUGC C	728	AATTACTT T	1665	ATTACTTT	2602	TTACTT T	3539
hsa-miR-548e	AAAAACUGAGACUACUUUUGC A	729	CTCAGTT TT	1666	TCAGTTTT	2603	CAGTTT T	3540
hsa-miR-548f	AAAAACUGUAAUACUUUU A	730	TACAGTT TT	1667	ACAGTTTT	2604	CAGTTT T	3541
hsa-miR-548g	AAAACUGUAAUACUUUUGUA C	731	TTACAGT TT	1668	TACAGTTT	2605	ACAGTT T	3542
hsa-miR-548h	AAAAGUAAUCGCGUUUUUGU C	732	GATTACT TT	1669	ATTACTTT	2606	TTACTT T	3543
hsa-miR-548i	AAAAGUAAUUGCGGAUUUUGC C	733	AATTACTT T	1670	ATTACTTT	2607	TTACTT T	3544
hsa-miR-548j	AAAAGUAAUUGCGGUCUUUGG U	734	AATTACTT T	1671	ATTACTTT	2608	TTACTT T	3545
hsa-miR-548k	AAAAGUACUUGCGGAUUUUGC U	735	AAGTACT TT	1672	AGTACTTT	2609	GTACTT T	3546

10

20

30

40

50

【表 9 - 4 4】

hsa-miR-548l	AAAAGUAAUUUGCGGGUUUUUGU C	736	T	AAATACTT	1673	AATACTTT	2610	ATACTT	3547
hsa-miR-548m	CAAAGGUAAUUUGUGGUUUUUUG	737	TT	AATACCT	1674	ATACCTTT	2611	TACCTT	3548
hsa-miR-548n	CAAAAAGUAAUUUGUGGAUUUUUG U	738	T	ATTACTTT	1675	TTACTTTT	2612	TACTTT	3549
hsa-miR-548o	CCAAAACUGCAGUUACUUUUUG C	739	TG	GCAGTTT	1676	CAGTTTT	2613	AGTTTT	3550
hsa-miR-548p	UAGCAAAAACUGCAGUUACUU U	740	CT	GTTTTTG	1677	TTTTTGCT	2614	TTTTGC	3551
hsa-miR-549	UGACAACUAUGGAUGAGCUCU 741	741	TC	ATAGTTG	1678	TAGTTGT	2615	AGTTGT	3552
hsa-miR-550	AGUGCCUGAGGGAGUAAGAGC CC	742	AC	CTCAGGC	1679	TCAGGCA	2616	CAGGCA	3553
hsa-miR-550*	UGUCUUACUCCCUCAGGCACA U	743	AC	GAGTAAG	1680	AGTAAGA	2617	GTAAGA	3554
hsa-miR-551a	GCGACCCACUCUUGGUUUCCA 744	744	CG	AGTGGGT	1681	GTGGGTC	2618	TGGGTC	3555
hsa-miR-551b	GCGACCCAUACUUGGUUUUCAG 745	745	CG	TATGGGT	1682	ATGGGTC	2619	TGGGTC	3556
hsa-miR-551b*	GAAAUCAAGCGUGGGUGAGAC C	746	TT	GCTTGAT	1683	CTTGATTT	2620	TTGATT	3557
hsa-miR-552	AACAGGUGACUGGUUAGACAA 747	747	GT	GTCACCT	1684	TCACCTG	2621	CACCTG	3558
hsa-miR-553	AAAACGGUGAGAUUUUGUUUU 748	748	TT	TCACCGT	1685	CACCGTT	2622	ACCGTT	3559
hsa-miR-554	GCUAGUCCUGACUCAGCCAGU 749	749	AG	CAGGACT	1686	AGGACTA	2623	GGACTA	3560
hsa-miR-555	AGGGUAAGCUGAACCUCUGAU 750	750	CC	AGCTTAC	1687	GCTTACC	2624	CTTACC	3561
hsa-miR-556-3p	AUAUUACCAUUAGCUCAUUU U	751	TA	ATGGTAA	1688	TGGTAAT	2625	GGTAAT	3562
hsa-miR-556-5p	GAUGAGCUCAUUGUAAUAUGA G	752	AT	TGAGCTC	1689	GAGCTCA	2626	AGCTCA	3563
hsa-miR-557	GUUUGCACGGGUGGGCCUUG UCU	753	AA	CCGTGCA	1690	CGTGCAA	2627	GTGCAA	3564

10

20

30

40

50

【表 9 - 4 5】

hsa-miR-558	UGAGCUGCUGUACCAAAAU	754	CAGCAGC TC	1691	AGCAGCT C	2628	GCAGCT C	3565
hsa-miR-559	UAAAGUAAAUAUGCACCAAAA	755	ATTTACTT T	1692	TTTACTTT	2629	TTACTT T	3566
hsa-miR-561	CAAAGUUUAAGAUCUUGAAG U	756	TTAAACTT T	1693	TAAACTTT	2630	AAACTT T	3567
hsa-miR-562	AAAGUAGCUGUACCAUUUGC	757	CAGCTAC TT	1694	AGCTACT T	2631	GCTACT T	3568
hsa-miR-563	AGGUUGACAUACGUUUUCC	758	ATGTCAA CC	1695	TGTCAAC C	2632	GTCAAC C	3569
hsa-miR-564	AGGCACGGUGUCAGCAGGC	759	CACCGTG CC	1696	ACCGTGC C	2633	CCGTGC C	3570
hsa-miR-566	GGGCGCCUGUGAUCCCAAC	760	ACAGGCG CC	1697	CAGGCGC C	2634	AGGCGC C	3571
hsa-miR-567	AGUAUGUUCUCCAGGACAGA AC	761	AGAACAT AC	1698	GAACATA C	2635	AACATA C	3572
hsa-miR-568	AUGUAUAAAUGUAUACACAC	762	ATTTATAC A	1699	TTTATACA	2636	TTATAC A	3573
hsa-miR-569	AGUUAUUGAAUCCUGGAAAGU	763	TTCATTAA C	1700	TCATTAA C	2637	CATTAA C	3574
hsa-miR-570	CGAAAACAGCAAUUACCUUG C	764	GCTGTTT TC	1701	CTGTTTTC	2638	TGTTTT C	3575
hsa-miR-571	UGAGUUGGCCAUCUGAGUGAG	765	GGCCAAC TC	1702	GCCAACT C	2639	CCAACT C	3576
hsa-miR-572	GUCCGCUCGGCGGUGGCCCA	766	CCGAGCG GA	1703	CGAGCGG A	2640	GAGCGG A	3577
hsa-miR-573	CUGAAGUGAUGUGUAACUGAU CAG	767	ATCACTT CA	1704	TCACTTC A	2641	CACTTC A	3578
hsa-miR-574-3p	CACGCUCAUGCACACACCCAC A	768	CATGAGC GT	1705	ATGAGCG T	2642	TGAGCG T	3579

10

20

30

40

50

【表 9 - 4 6】

hsa-miR-574-5p	UGAGUGUGUGUGUGUGAGUG UGU	769	CACACAC TC	1706	ACACACT C	2643	CACACT C	3580
hsa-miR-575	GAGCCAGUUGGACAGGAGC	770	CAACTGG CT	1707	AACTGGC T	2644	ACTGGC T	3581
hsa-miR-576-3p	AAGAUGUGGAAAAUUGGAU C	771	TCCACAT CT	1708	CCACATC T	2645	CACATC T	3582
hsa-miR-576-5p	AUUCUAAUUUCUCCAGUCUU U	772	AAATTAG AA	1709	AATTAGA A	2646	ATTAGA A	3583
hsa-miR-577	UAGAUAAAAUUAUUGGUACCUG	773	ATTTTATC T	1710	TTTTATCT	2647	TTTATC T	3584
hsa-miR-578	CUUCUUGUGCUCUAGGAUUGU	774	GCACAAG AA	1711	CACAAGA A	2648	ACAAGA A	3585
hsa-miR-579	UUCAUUUGGUUAAAACCGCGA UU	775	ACCAAAT GA	1712	CCAAATG A	2649	CAAATG A	3586
hsa-miR-580	UUGAGAAUGAUGAAUCAUUAG G	776	TCATTCT CA	1713	CATTCTC A	2650	ATTCTC A	3587
hsa-miR-581	UCUUGUGUUCUCUAGAUCAGU	777	GAACACA AG	1714	AACACAA G	2651	ACACAA G	3588
hsa-miR-582-3p	UAACUGGUUGAACACUGAAC C	778	CAACCAG TT	1715	AACCAGT T	2652	ACCAGT T	3589
hsa-miR-582-5p	UUACAGUUGUUAACCAGUUA CU	779	ACAACTG TA	1716	CAACTGT A	2653	AACTGT A	3590
hsa-miR-583	CAAAGAGGAAGGUCCAUUAC	780	TTCCTCTT T	1717	TCCTCTTT	2654	CCTCTT T	3591
hsa-miR-584	UUAUGGUUUGCCUGGGACUGA G	781	CAAACCA TA	1718	AAACCAT A	2655	AACCAT A	3592
hsa-miR-585	UGGGCGUAUCUGUAUGCUA	782	GATACGC CC	1719	ATACGCC C	2656	TACGCC C	3593
hsa-miR-586	UAUGCAUUGUAUUUUUAGGUC C	783	ACAATGC AT	1720	CAATGCA T	2657	AATGCA T	3594
hsa-miR-587	UUUCCAUAGGUGAUGAGUCAC	784	CCTATGG AA	1721	CTATGGA A	2658	TATGGA A	3595
hsa-miR-588	UUGGCCACAAUGGGUUAGAAC	785	TTGTGGC CA	1722	TGTGGCC A	2659	GTGGCC A	3596
hsa-miR-589	UGAGAACCACGUCUGCUCUGA G	786	GTGGTTC TC	1723	TGGTTCT C	2660	GGTTCT C	3597

10

20

30

40

50

【表 9 - 4 7】

hsa-miR-589*	UCAGAACAAAUGCCGGUUC	787	TTTGTCT	1724	TTGTCT	2661	TGTTCT	3598
hsa-miR-590-3p	UAAUUUAUGUAUAAGCUAGU	788	CATAAAA	1725	ATAAAATT	2662	TAAAAT	3599
hsa-miR-590-5p	GAGCUUAUUCAUAAAAGUGCA	789	GAATAAG	1726	AATAAGC	2663	ATAAGC	3600
hsa-miR-591	AGACCAUGGGUUCUCAUUGU	790	CCCATGG	1727	CCATGGT	2664	CATGGT	3601
hsa-miR-592	UUGUGUCAAU AUGCGAUGAUG	791	ATTGACA	1728	TTGACAC	2665	TGACAC	3602
hsa-miR-593	UGUCUCUGCUGGGGUUCU	792	AGCAGAG	1729	GCAGAGA	2666	CAGAGA	3603
hsa-miR-593*	AGGCACCAGCCAGGCAUUGCU	793	GCTGGTG	1730	CTGGTGC	2667	TGGTGC	3604
hsa-miR-595	GAAGUGUGCCGUGGUGUGUC	794	GGCACAC	1731	GCACACT	2668	CACACT	3605
hsa-miR-596	AAGCCUGCCCGGCUCUCGG	795	GGCAGG	1732	GGCAGGC	2669	GCAGGC	3606
hsa-miR-597	UGUGUCACUCGAUGACCACUG	796	GAGTGAC	1733	AGTGACA	2670	GTGACA	3607
hsa-miR-598	UACGUCAUCGUUGUCAUCGUC	797	CGATGAC	1734	GATGACG	2671	ATGACG	3608
hsa-miR-599	GUUGUGUCAGUUUAUCAAAAC	798	CTGACAC	1735	TGACACA	2672	GACACA	3609
hsa-miR-600	ACUUACAGACAAGAGCCUUGC	799	GTCTGTA	1736	TCTGTAA	2673	CTGTAA	3610
hsa-miR-601	UGGUCUAGGAUUGUUGGAGGA	800	TCCTAGA	1737	CCTAGAC	2674	CTAGAC	3611
hsa-miR-602	GACACGGGCGACAGCUGCGG	801	CGCCCGT	1738	GCCCGTG	2675	CCCGTG	3612
hsa-miR-603	CACACACUGCAAUUACUUUUG	802	GCAGTGT	1739	CAGTGTG	2676	AGTGTG	3613
hsa-miR-604	AGGCUGCGGAAUUCAGGAC	803	TCCGCAG	1740	CCGCAGC	2677	CGCAGC	3614

10

20

30

40

50

【表 9 - 4 8】

hsa-miR-605	UAAAUCCCAUGGUGCCUUCUC CU	804	ATGGGAT TT	1741	TGGGATT T	2678	GGGATT T	3615
hsa-miR-606	AAACUACUGAAAAUCAAGAU	805	TCAGTAG TT	1742	CAGTAGT T	2679	AGTAGT T	3616
hsa-miR-607	GUUCAAAUCCAGAUCUAUAAC	806	GGATTTG AA	1743	GATTTGA A	2680	ATTTGA A	3617
hsa-miR-608	AGGGGUGGUGUUGGACAGC UCCGU	807	CACCACC CC	1744	ACCACCC C	2681	CCACCC C	3618
hsa-miR-609	AGGGUGUUUCUCUCAUCUCU	808	GAAACAC CC	1745	AAACACC C	2682	AACACC C	3619
hsa-miR-610	UGAGCUAAAUGUGUGCUGGGA	809	ATTTAGC TC	1746	TTTAGCT C	2683	TTAGCT C	3620
hsa-miR-611	GCGAGGACCCUCGGGGUCU GAC	810	GGGTCCT CG	1747	GGTCCTC G	2684	GTCCTC G	3621
hsa-miR-612	GCUGGGCAGGGCUUCUGAGC UCCUU	811	CCTGCCC AG	1748	CTGCCCA G	2685	TGCCCA G	3622
hsa-miR-613	AGGAAUGUCCUUCUUUGCC	812	GAACATT CC	1749	AACATTC C	2686	ACATTC C	3623
hsa-miR-614	GAACGCCUGUUCUUGCCAGGU GG	813	ACAGGCG TT	1750	CAGGCGT T	2687	AGGCGT T	3624
hsa-miR-615-3p	UCCGAGCCUGGGUCUCCCUC UU	814	CAGGCTC GG	1751	AGGCTCG G	2688	GGCTCG G	3625
hsa-miR-615-5p	GGGGUCCCCGGUGCUCGGA UC	815	GGGGACC CC	1752	GGGACCC C	2689	GGACCC C	3626
hsa-miR-616	AGUCAUUGGAGGGUUUGAGCA G	816	TCCAATG AC	1753	CCAATGA C	2690	CAATGA C	3627
hsa-miR-616*	ACUCAAAACCCUUCAGUGACU U	817	GGTTTTG AG	1754	GTTTTGA G	2691	TTTTGA G	3628
hsa-miR-617	AGACUCCCAUUUGAAGGUGG C	818	TGGGAAG TC	1755	GGGAAGT C	2692	GGAAGT C	3629

10

20

30

40

50

【表 9 - 4 9】

hsa-miR-618	AAACUCUACUUGUCCUUCUGA GU	819	AGTAGAG TT	1756	T	GTAGAGT T	2693	T	TAGAGT T	3630
hsa-miR-619	GACCUGGACAUGUUUGUGCCC AGU	820	TGTCCAG GT	1757	T	GTCCAGG T	2694	T	TCCAGG T	3631
hsa-miR-620	AUGGAGAUAGAUUAGAAAU	821	CTATCTC CA	1758	A	TATCTCC A	2695	A	ATCTCC A	3632
hsa-miR-621	GGCUAGCAACAGCGCUUACCU	822	GTTGCTA GC	1759	C	TTGCTAG C	2696	C	TGCTAG C	3633
hsa-miR-622	ACAGUCUGCUGAGGUUGGAGC	823	AGCAGAC TG	1760	G	GCAGACT G	2697	G	CAGACT G	3634
hsa-miR-623	AUCCCUUGCAGGGGCUGUUG GGU	824	TGCAAGG GA	1761	A	GCAAGGG A	2698	A	CAAGGG A	3635
hsa-miR-624	CACAAGGUAUUGGUUUACCU	825	ATACCTT GT	1762	T	TACCTTG T	2699	T	ACCTTG T	3636
hsa-miR-624*	UAGUACCAGUACCUUGUGUUC A	826	ACTGGTA CT	1763	T	CTGGTAC T	2700	T	TGGTAC T	3637
hsa-miR-625	AGGGGGAAAGUUCUAUAGUCC	827	CTTTCCC CC	1764	C	TTTCCCC C	2701	C	TTCCCC C	3638
hsa-miR-625*	GACUAUAGAACUUUCCCCUC A	828	TTCTATA GT	1765	T	TCTATAGT T	2702	T	CTATAG T	3639
hsa-miR-626	AGCUGUCUGAAAUGUCUU	829	TCAGACA GC	1766	C	CAGACAG C	2703	C	AGACAG C	3640
hsa-miR-627	GUGAGUCUCUAAGAAAAGAGG A	830	AGAGACT CA	1767	A	GAGACTC A	2704	A	AGACTC A	3641
hsa-miR-628-3p	UCUAGUAAGAGUGGCAGUCGA	831	TCTTACTA G	1768	G	CTTACTA G	2705	G	TTACTA G	3642
hsa-miR-628-5p	AUGCUGACAUAUUUACUAGAG G	832	ATGTCAG CA	1769	A	TGTCAGC A	2706	A	GTCAGC A	3643
hsa-miR-629	UGGGUUUACGUUGGGAGAACU	833	CGTAAAC CC	1770	C	GTAACC C	2707	C	TAAACC C	3644
hsa-miR-629*	GUUCUCCCAACGUAAGCCCAG C	834	TTGGGAG AA	1771	A	TGGGAGA A	2708	A	GGGAGA A	3645
hsa-miR-630	AGUAUUCUGUACCAGGGAAGG U	835	ACAGAAT AC	1772	C	CAGAATA C	2709	C	AGAATA C	3646
hsa-miR-631	AGACCUGGCCAGACCUCAGC	836	GGCCAGG TC	1773	C	GCCAGGT C	2710	C	CCAGGT C	3647

10

20

30

40

50

【表 9 - 5 0】

hsa-miR-632	GUGUCUGCUUCCUGUGGGA	837	AAGCAGA CA	1774	AGCAGAC A	2711	GCAGAC A	3648
hsa-miR-633	CUAAUAGUAUCUACCACAAUA AA	838	ATACTATT A	1775	TACTATTA	2712	ACTATT A	3649
hsa-miR-634	AACCAGCACCCCAACUUUGGA C	839	GGTGCTG GT	1776	GTGCTGG T	2713	TGCTGG T	3650
hsa-miR-635	ACUUGGGCACUGAAACAAUGU CC	840	GTGCCCCA AG	1777	TGCCCCAA G	2714	GCCCCAA G	3651
hsa-miR-636	UGUGCUUGCUCGUCCCCGCC GCA	841	AGCAAGC AC	1778	GCAAGCA C	2715	CAAGCA C	3652
hsa-miR-637	ACUGGGGGCUUUCGGGGCUCU GCGU	842	AGCCCCC AG	1779	GCCCCCA G	2716	CCCCCA G	3653
hsa-miR-638	AGGGAUCGCGGGCGGGUGGC GGCCU	843	CGCGATC CC	1780	GCGATCC C	2717	CGATCC C	3654
hsa-miR-639	AUCGCUGCGGUUGCGAGCGC UGU	844	CCGCAGC GA	1781	CGCAGCG A	2718	GCAGCG A	3655
hsa-miR-640	AUGAUCCAGGAACCUGCCUCU	845	CCTGGAT CA	1782	CTGGATC A	2719	TGGATC A	3656
hsa-miR-641	AAAGACAUAGGAUAGAGUCAC CUC	846	CTATGTC TT	1783	TATGTCTT	2720	ATGTCT T	3657
hsa-miR-642	GUCCUCUCCAAAUGUGUCUU G	847	GGAGAGG GA	1784	GAGAGGG A	2721	AGAGGG A	3658
hsa-miR-643	ACUUGUAUGCUAGCUCAGGUA G	848	GCATACA AG	1785	CATACAA G	2722	ATACAA G	3659
hsa-miR-644	AGUGUGGCUUUCUUAGAGC	849	AAGCCAC AC	1786	AGCCACA C	2723	GCCACA C	3660
hsa-miR-645	UCUAGGCUUGUACUGCUGA	850	CCAGCCT AG	1787	CAGCCTA G	2724	AGCCTA G	3661
hsa-miR-646	AAGCAGCUGCCUCUGAGGC	851	GCAGCTG CT	1788	CAGCTGC T	2725	AGCTGC T	3662
hsa-miR-647	GUGGCUGCACUCACUCCUUC	852	GTGCAGC CA	1789	TGCAGCC A	2726	GCAGCC A	3663
hsa-miR-648	AAGUGGCAGGGCACUGGU	853	CTGCACA CT	1790	TGCACAC T	2727	GCACAC T	3664

10

20

30

40

50

【表 9 - 5 1】

hsa-miR-649	AAACCUGUGUUGUUCAAGAGU C	854	TT	1791	T	2728	T	3665
hsa-miR-650	AGGAGGCAGCGCUCUCAGGAC	855	CC	1792	C	2729	C	3666
hsa-miR-651	UUUAGGAUAAGCUUGACUUUU G	856	TTATCCTA A	1793	A	2730	A	3667
hsa-miR-652	AAUGGCGCCACUAGGGUUGUG	857	TGGCGCC AT	1794	T	2731	T	3668
hsa-miR-653	GUGUUGAAACAAUCUCUACUG	858	GTTTCAA CA	1795	A	2732	A	3669
hsa-miR-654-3p	UAUGUCUGCUGACCAUCACCU U	859	AGCAGAC AT	1796	T	2733	T	3670
hsa-miR-654-5p	UGGUGGGCCGCAGAACAUGU GC	860	CGGCCCA CC	1797	C	2734	C	3671
hsa-miR-655	AUAAUACAUGGUUAACCUCUU U	861	CATGTAT TA	1798		2735	A	3672
hsa-miR-656	AAUAAUUAACAGUCAACCUCU	862	GTATAAT AT	1799		2736	T	3673
hsa-miR-657	GGCAGGUUCUCACCCUCUCUA GG	863	AGAACCT GC	1800	C	2737	C	3674
hsa-miR-658	GGCGGAGGGAAGUAGGUCCG UUGGU	864	TCCCTCC GC	1801	C	2738	C	3675
hsa-miR-659	CUUGGUUCAGGGAGGGUCCC CA	865	CTGAACC AA	1802	A	2739	A	3676
hsa-miR-660	UACCCAUUGCAUAUCGGAGUU G	866	GCAATGG GT	1803	T	2740	T	3677
hsa-miR-661	UGCCUGGGUCUCUGGCCUGC GCGU	867	GACCCAG GC	1804	C	2741	C	3678
hsa-miR-662	UCCCACGUUGUGGCCAGCA G	868	CAACGTG GG	1805	G	2742	G	3679

10

20

30

40

50

【表 9 - 5 2】

hsa-miR-663	AGGCGGGGCGCCGCGGGACC GC	869	CGCCCCG CC	1806	GCCCCGC C	2743	CCCCGC C	3680
hsa-miR-663b	GGUGGCCCGGCCGUGCCUGA GG	870	CCGGGCC AC	1807	CGGGCCA C	2744	GGGCCA C	3681
hsa-miR-664	UAUUCAUUUAUCCCCAGCCUA CA	871	TAAATGA AT	1808	AAATGAA T	2745	AATGAA T	3682
hsa-miR-664*	ACUGGCUAGGGAAAAUGAUUG GAU	872	CCTAGCC AG	1809	CTAGCCA G	2746	TAGCCA G	3683
hsa-miR-665	ACCAGGAGGCUGAGGCCCCU ACCAGGAGGCUGAGGCCCCU	873	GCCTCCT GG	1810	CCTCCTG G	2747	CTCCTG G	3684
hsa-miR-668	UGUCACUCGGCUCGGCCCCAC UAC	874	CCGAGTG AC	1811	CGAGTGA C	2748	GAGTGA C	3685
hsa-miR-671-3p	UCCGGUUCUCAGGGCUCCAC C	875	GAGAACC GG	1812	AGAACCG G	2749	GAACCG G	3686
hsa-miR-671-5p	AGGAAGCCCUGGAGGGGCUG GAG	876	AGGGCTT CC	1813	GGGCTTC C	2750	GGCTTC C	3687
hsa-miR-675	UGGUGCGGAGAGGGCCACA GUG	877	CTCCGCA CC	1814	TCCGCAC C	2751	CCGCAC C	3688
hsa-miR-675b	CUGUAUGCCCUCACCGCUCA CUGUAUGCCCUCACCGCUCA	878	GGGCATA CA	1815	GGCATA A	2752	GCATA A	3689
hsa-miR-7	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUU GU	879	TAGTCTT CC	1816	AGTCTTC C	2753	GTCTTC C	3690
hsa-miR-7-1*	CAACAAAUCACAGUCUGCCAU A	880	TGATTTGT T	1817	GATTTGTT T	2754	ATTTGT T	3691
hsa-miR-7-2*	CAACAAAUCCCAGUCUACCUA A	881	GGATTTG TT	1818	GATTTGTT T	2755	ATTTGT T	3692
hsa-miR-708	AAGGAGCUUACAAUCUAGCUG GG	882	TAAGCTC CT	1819	AAGCTCC T	2756	AGCTCC T	3693
hsa-miR-708*	CAACUAGACUGUGAGCUUCUA G	883	AGTCTAG TT	1820	GTCTAGT T	2757	TCTAGT T	3694
hsa-miR-720	UCUCGCUGGGGCCUCCA UCUCGCUGGGGCCUCCA	884	CCCAGCG AG	1821	CCAGCGA G	2758	CAGCGA G	3695
hsa-miR-744	UGCGGGGCUAGGGCUAACAG CA	885	TAGCCCC GC	1822	AGCCCCG C	2759	GCCCCG C	3696

10

20

30

40

50

【表 9 - 5 3】

hsa-miR-744*	CUGUUGCCACUAACCUCAACC U	886	GTGGCAA CA	1823	TGGCAAC A	2760	GGCAAC A	3697
hsa-miR-758	UUUGUGACCUGGUCCACUAAC C	887	AGGTCAC AA	1824	GGTCACA A	2761	GTCACA A	3698
hsa-miR-760	CGGCUCUGGGUCUGUGGGGA	888	CCCAGAG CC	1825	CCAGAGC C	2762	CAGAGC C	3699
hsa-miR-765	UGGAGGAGAAGGAAGGUGAUG	889	TTCTCCT CC	1826	TCTCCTC C	2763	CTCCTC C	3700
hsa-miR-766	ACUCCAGCCCCACAGCCUCAG C	890	GGGCTGG AG	1827	GGCTGGA G	2764	GCTGGA G	3701
hsa-miR-767-3p	UCUGCUCAUACCCCAUGGUUU CU	891	TATGAGC AG	1828	ATGAGCA G	2765	TGAGCA G	3702
hsa-miR-767-5p	UGCACCAUGGUUGUCUGAGCA UG	892	CCATGGT GC	1829	CATGGTG C	2766	ATGGTG C	3703
hsa-miR-769-3p	CUGGGAUCUCCGGGGUCUUG GUU	893	GAGATCC CA	1830	AGATCCC A	2767	GATCCC A	3704
hsa-miR-769-5p	UGAGACCUCUGGGUUCUGAG CU	894	AGAGGTC TC	1831	GAGGTCT C	2768	AGGTCT C	3705
hsa-miR-770-5p	UCCAGUACCACGUGUCAGGGC CA	895	TGGTACT GG	1832	GGTACTG G	2769	GTA CTG G	3706
hsa-miR-802	CAGUAACAAAGAUUCAUCCU GU	896	TTTGTTAC T	1833	TTGTTACT T	2770	TGTTAC T	3707
hsa-miR-873	GCAGGAACUUGUGAGUCUCCU GA	897	AAGTTCC TG	1834	AGTTCTC G	2771	GTTCTC G	3708
hsa-miR-874	CUGCCCUGGCCCGAGGGACC GA	898	GCCAGGG CA	1835	CCAGGGC A	2772	CAGGGC A	3709
hsa-miR-875-3p	CCUGGAAACACUGAGGUUGUG AG	899	TGTTTCC AG	1836	GTTTCCA G	2773	TTTCCA G	3710
hsa-miR-875-5p	UAUACCUCAGUUUUUAUCAGGU G	900	CTGAGGT AT	1837	TGAGGTA T	2774	GAGGTA T	3711
hsa-miR-876-3p	UGGUGUUUACAAAGUAAUUC A	901	TAAACCA CC	1838	AAACCAC C	2775	AACCAC C	3712
hsa-miR-876-5p	UGGAUUUCUUUGUGAAUCACC A	902	AAGAAAT CC	1839	AGAAATC C	2776	GAAATC C	3713
hsa-miR-877	GUAGAGGAGAUGGCCGAGGG TA	903	TCTCCTC TA	1840	CTCCTCT A	2777	TCCTCT A	3714
hsa-miR-877*	UCCUCUUCUCCUCCUCCAG GG	904	GAGAAGA GG	1841	AGAAGAG G	2778	GAAGAG G	3715

10

20

30

40

50

【表 9 - 5 4】

hsa-miR-885-3p	AGGCAGCGGGGUGUAGUGGA UA	905	CCCGCTG CC	1842	CCGCTGC C	2779	CGCTGC C	3716
hsa-miR-885-5p	UCCAUUACACUACCCUGCCUC U	906	GTGTAAT GG	1843	TGTAATG G	2780	GTAATG G	3717
hsa-miR-886-3p	CGCGGGUGCUUACUGACCCU U	907	AGCACCC GC	1844	GCACCCG C	2781	CACCCG C	3718
hsa-miR-886-5p	CGGGUCGGAGUUAGCUCAAGC GG	908	CTCCGAC CC	1845	TCCGACC C	2782	CCGACC C	3719
hsa-miR-887	GUGAACGGGCGCCAUCCCGA GG	909	GCCCGTT CA	1846	CCCGTTC A	2783	CCGTTC A	3720
hsa-miR-888	UACUCAAAAAGCUGUCAGUCA 910	910	TTTTTGAG T	1847	TTTTGAGT T	2784	TTTGAG T	3721
hsa-miR-888*	GACUGACACCUCUUUGGGUGA A	911	GGTGTCA GT	1848	GTGTCAG T	2785	TGTCAG T	3722
hsa-miR-889	UUAAUAUCGGACAACCAUUGU 912	912	CCGATAT TA	1849	CGATATT A	2786	GATATT A	3723
hsa-miR-890	UACUUGGAAAGGCAUCAGUUG 913	913	TTTCCAA GT	1850	TTCCAAG T	2787	TCCAAG T	3724
hsa-miR-891a	UGCAACGAACCUGAGCCACUG A	914	GTTTCGTT GC	1851	TTCGTTG C	2788	TCGTTG C	3725
hsa-miR-891b	UGCAACUUACCUGAGUCAUUG A	915	GTAAGTT GC	1852	TAAGTTG C	2789	AAGTTG C	3726
hsa-miR-892a	CACUGUGUCCUUUCUGCGUA G	916	GGACACA GT	1853	GACACAG T	2790	ACACAG T	3727
hsa-miR-892b	CACUGGCUCUUUCUGGGUA GA	917	GGAGCCA GT	1854	GAGCCAG T	2791	AGCCAG T	3728
hsa-miR-9	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAU GA	918	TAACCAA AG	1855	AACCAA G	2792	ACCAA G	3729

10

20

30

40

50

【表 9 - 5 5】

hsa-miR-9*	AUAAAGCUAGAUAACCGAAAG U	919	CTAGCTT TA	1856	TAGCTTTA	2793	AGCTTT A	3730
hsa-miR-920	GGGGAGCUGUGGAAGCAGUA	920	ACAGCTC CC	1857	CAGCTCC C	2794	AGCTCC C	3731
hsa-miR-921	CUAGUGAGGGACAGAACCAGG AUUC	921	CCCTCAC TA	1858	CCTCACT A	2795	CTCACT A	3732
hsa-miR-922	GCAGCAGAGAAUAGGACUACG UC	922	TCTCTGC TG	1859	CTCTGCT G	2796	TCTGCT G	3733
hsa-miR-923	GUCAGCGGAGGAAAAGAAACU	923	CTCCGCT GA	1860	TCCGCTG A	2797	CCGCTG A	3734
hsa-miR-924	AGAGUCUUGUGAUGUCUUGC	924	ACAAGAC TC	1861	CAAGACT C	2798	AAGACT C	3735
hsa-miR-92a	UAUUGCACUUGUCCCGGCCU GU	925	AAGTGCA AT	1862	AGTGCAA T	2799	GTGCAA T	3736
hsa-miR-92a-1*	AGGUUGGGAUCGGUUGCAAUG CU	926	ATCCCAA CC	1863	TCCCAAC C	2800	CCCAAC C	3737
hsa-miR-92a-2*	GGGUGGGGAUUUGUUGCAUU AC	927	ATCCCCA CC	1864	TCCCCAC C	2801	CCCCAC C	3738
hsa-miR-92b	UAUUGCACUCGUCCCGGCCU CC	928	GAGTGCA AT	1865	AGTGCAA T	2802	GTGCAA T	3739
hsa-miR-92b*	AGGGACGGGACGCGGUGCAG UG	929	TCCCGTC CC	1866	CCCGTCC C	2803	CCGTCC C	3740
hsa-miR-93	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGU AG	930	CAGCACT TT	1867	AGCACTT T	2804	GCACTT T	3741
hsa-miR-93*	ACUGCUGAGCUAGCACUUCCC G	931	GCTCAGC AG	1868	CTCAGCA G	2805	TCAGCA G	3742
hsa-miR-933	UGUGCGCAGGGAGACCUCUC CC	932	CCTGCGC AC	1869	CTGCGCA C	2806	TGCGCA C	3743
hsa-miR-934	UGUCUACUACUGGAGACACUG G	933	GTAGTAG AC	1870	TAGTAGA C	2807	AGTAGA C	3744
hsa-miR-935	CCAGUUACCGCUUCCGCUACC GC	934	CGGTAAC TG	1871	GGTAACT G	2808	GTAAC G	3745
hsa-miR-936	ACAGUAGAGGGAGGAAUCGCA G	935	CCTCTAC TG	1872	CTCTACT G	2809	TCTACT G	3746

10

20

30

40

50

【表 9 - 5 6】

has-miR-937	AUCCGCGCUCUGACUCUCUG CC	936	GAGCGCG GA	1873	AGCGCGG A	2810	GCGCGG A	3747
has-miR-938	UGCCCUUAAAGGUGAACCCAG U	937	TTTAAGG GC	1874	TTAAGGG C	2811	TAAGGG C	3748
has-miR-939	UGGGGAGCUGAGGCUCUGGG GGUG	938	CAGCTCC CC	1875	AGCTCCC C	2812	GCTCCC C	3749
has-miR-940	AAGGCAGGGCCCCCGCUCCC C	939	GCCCTGC CT	1876	CCCTGCC T	2813	CCTGCC T	3750
has-miR-941	CACCCGGCUGUGUGCACAUG UGC	940	CAGCCGG GT	1877	AGCCGGG T	2814	GCCGGG T	3751
has-miR-942	UCUUCUCUGUUUUGGCCAUG UG	941	ACAGAGA AG	1878	CAGAGAA G	2815	AGAGAA G	3752
has-miR-943	CUGACUGUUGCCGUCCUCCA G	942	CAACAGT CA	1879	AACAGTC A	2816	ACAGTC A	3753
has-miR-944	AAAUUAUUGUACAUCGGAUGA G	943	ACAATAA TT	1880	CAATAATT T	2817	AATAAT T	3754
has-miR-95	UUCAACGGGUUUUUUUGAGC A	944	ACCCGTT GA	1881	CCCGTTG A	2818	CCGTTG A	3755
has-miR-96	UUUGGCACUAGCACAUUUUUG CU	945	TAGTGCC AA	1882	AGTGCCA A	2819	GTGCCA A	3756
has-miR-96*	AAUCAUGUGCAGUGCCAAUUAU G	946	GCACATG AT	1883	CACATGA T	2820	ACATGA T	3757
has-miR-98	UGAGGUAGUAAGUUGUAUUGU U	947	TACTACC TC	1884	ACTACCT C	2821	CTACCT C	3758
has-miR-99a	AACCCGUAGAUCGGAUCUUGU G	948	TCTACGG GT	1885	CTACGGG T	2822	TACGGG T	3759
has-miR-99a*	CAAGCUCGCUUCUAUGGGUCU G	949	AGCGAGC TT	1886	GCGAGCT T	2823	CGAGCT T	3760
has-miR-99b	CACCCGUAGAACCGACCUUGC G	950	TCTACGG GT	1887	CTACGGG T	2824	TACGGG T	3761
has-miR-99b*	CAAGCUCGUGUCUGUGGGUC CG	951	CACGAGC TT	1888	ACGAGCT T	2825	CGAGCT T	3762

10

20

30

40

50

【表 9 - 5 7】

hsv1-miR-H1	UGGAAGGACGGGAAGUGGAAG	952	CGTCCTT CC	1889	GTCCTTC C	2826	TCCTTC C	3763
hsv1-miR-H2-3p	CCUGAGCCAGGGACGAGUGC GACU	953	CTGGCTC AG	1890	TGGCTCA G	2827	GGCTCA G	3764
hsv1-miR-H2-5p	UCGCACGGCGCCCGGCACAGAC U	954	GCGCGTG CG	1891	CGCGTGC G	2828	GCGTGC G	3765
hsv1-miR-H3	CUGGGACUGUGCGGUUGGGA	955	ACAGTCC CA	1892	CAGTCCC A	2829	AGTCCC A	3766
hsv1-miR-H4-3p	CUUGCCUGUCUAACUCGCUAG U	956	GACAGGC AA	1893	ACAGGCA A	2830	CAGGCA A	3767
hsv1-miR-H4-5p	GGUAGAGUUUGACAGGCAAGC A	957	AAACTCT AC	1894	AACTCTA C	2831	ACTCTA C	3768
hsv1-miR-H5	GUCAGAGAUCCAAACCCUCCG G	958	GATCTCT GA	1895	ATCTCTG A	2832	TCTCTG A	3769
hsv1-miR-H6	CACUUCCTCGUCCUCCAUCCC G	959	ACGGGAA GT	1896	CGGGAAG T	2833	GGGAAG T	3770
kshv-miR-K12-1	AUUACAGGAAACUGGGUGUAA GC	960	TTCCTGT AA	1897	TCCTGTA A	2834	CCTGTA A	3771
kshv-miR-K12-10a	UAGUGUUGUCCCCCGAGUG GC	961	GACAACA CT	1898	ACAACAC T	2835	CAACAC T	3772
kshv-miR-K12-10b	UGGUGUUGUCCCCCGAGUG GC	962	GACAACA CC	1899	ACAACAC C	2836	CAACAC C	3773
kshv-miR-K12-11	UUAAUGCUUAGCCUGUGUCCG A	963	TAAGCAT TA	1900	AAGCATT A	2837	AGCATT A	3774
kshv-miR-K12-12	ACCAGGCCACCAUCCUCUCC G	964	GTGGCCT GG	1901	TGGCCTG G	2838	GGCCTG G	3775
kshv-miR-K12-2	AACUGUAGUCCGGGUCGAUCU G	965	GACTACA GT	1902	ACTACAG T	2839	CTACAG T	3776
kshv-miR-K12-3	UCACAUUCUGAGGACGGCAGC GA	966	CAGAATG TG	1903	AGAATGT G	2840	GAATGT G	3777
kshv-miR-K12-3*	UCGCGGUCACAGAAUGUGACA G	967	GTGACCG CG	1904	TGACCGC G	2841	GACCGC G	3778
kshv-miR-K12-4-3p	UAGAAUACUGAGGCCUAGCUG A	968	CAGTATT CT	1905	AGTATTCT T	2842	GTATTCT T	3779

10

20

30

40

50

【表 9 - 5 8】

kshv-miR-K12-4-5p	AGCUAAACCGCAGUACUCUAG	969	CGTTTA	1906	GGTTAG	GTTTAG	3780
kshv-miR-K12-5	UAGGAUGCCUGGAACUUGCCG	970	AGGCATC	1907	GGCATCC	GCATCC	3781
kshv-miR-K12-6-3p	UGAUGGUUUUCGGGCUGUUG	971	AAAACCA	1908	AAACCAT	AACCAT	3782
kshv-miR-K12-6-5p	CCAGCAGCACCUGAUAUCAUG	972	GTGCTGC	1909	TGCTGCT	GCTGCT	3783
kshv-miR-K12-7	UGAUCCCAUGUUGCUGGCGC	973	CATGGGA	1910	ATGGGAT	TGGGAT	3784
kshv-miR-K12-8	UAGGCGCGACUGAGAGAGCAC	974	GTCGCGC	1911	TCGCGCC	CGCGCC	3785
kshv-miR-K12-9	CUGGGUAUACGCAGCUGCGUA	975	GTATACC	1912	TATACCC	ATACCC	3786
kshv-miR-K12-9*	ACCCAGCUGCGUAAACCCCGC	976	GCAGCTG	1913	CAGCTGG	AGCTGG	3787

10

【図 1】

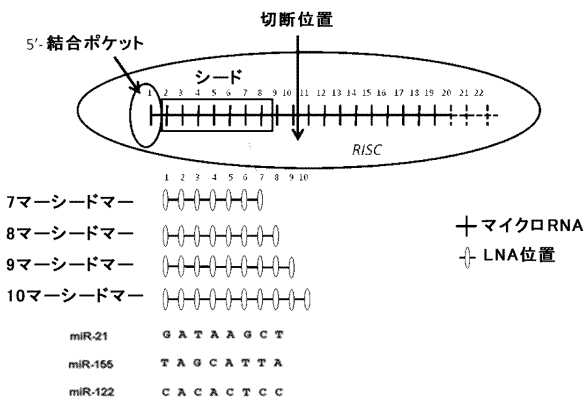


Figure 1

【図 2】

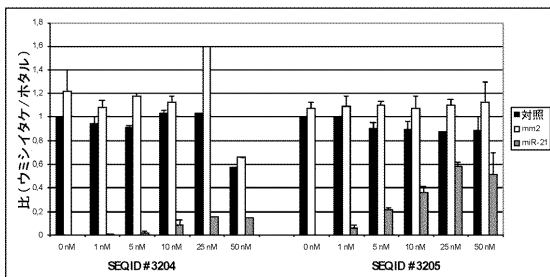


Figure 2

【図 3】

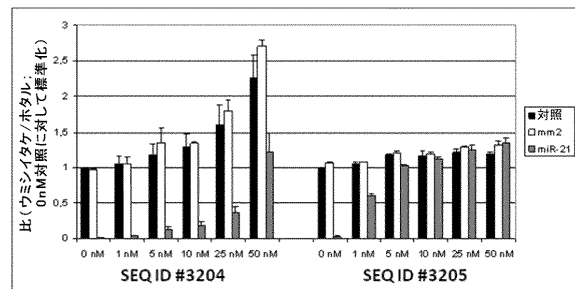


Figure 3

【図 4】

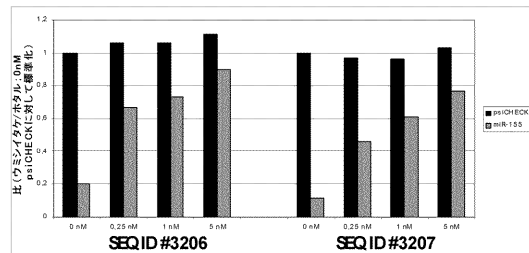


Figure 4

【 1 1 】

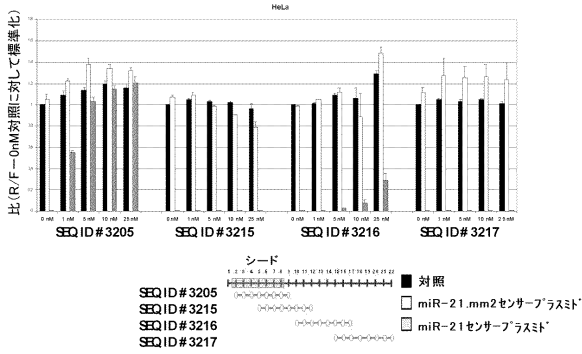


Figure 11

【 1 3 】

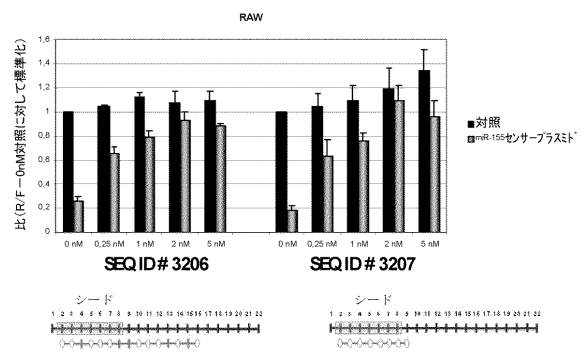


Figure 13

【 1 2 】

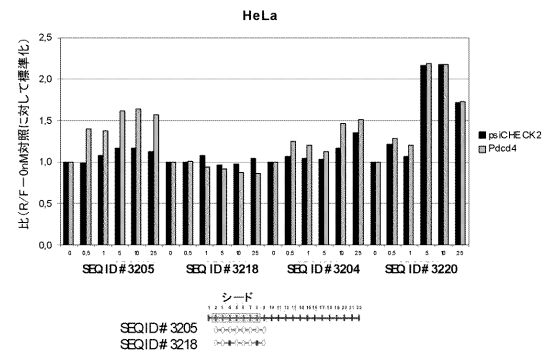


Figure 12

【 1 4 】

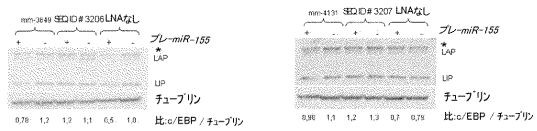


Figure 14

【 1 5 】

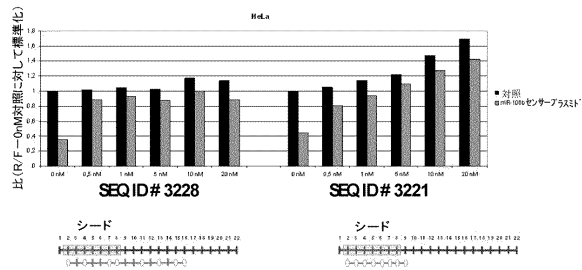


Figure 15

【 1 8 】

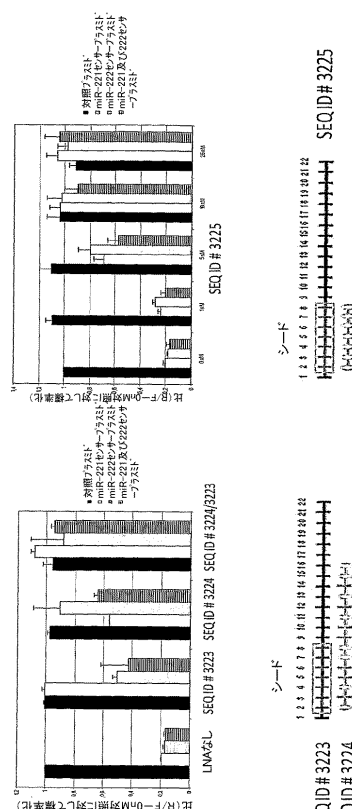


Figure 18

【 1 6 】

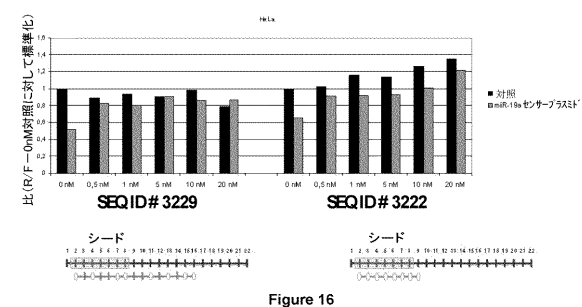


Figure 16

【 1 7 】

シード-7マー

```

miR-221  A G C U A C A U G U C U G C U G G G U U C
miR-222  A G C U A C A U C U G G C U A C U G G G U U C

```

Figure 17

【 図 19 】

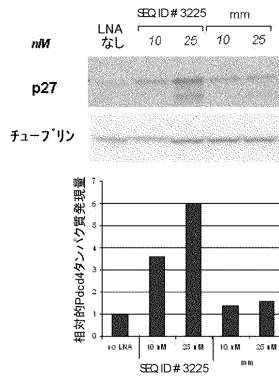


Figure 19

【 図 20 】

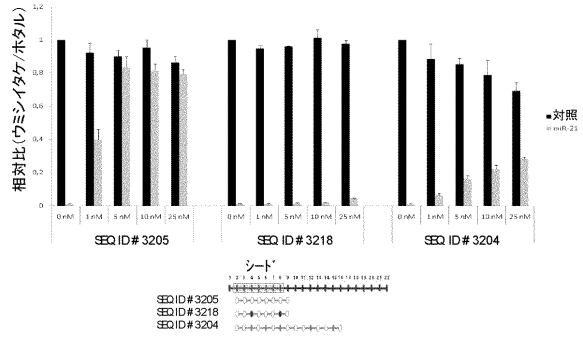


Figure 20

【 図 21 】

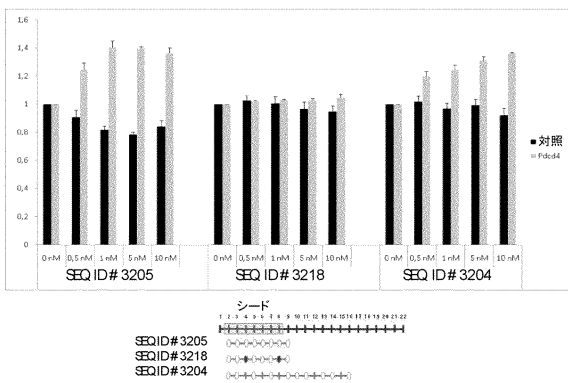


Figure 21

【 図 23 】

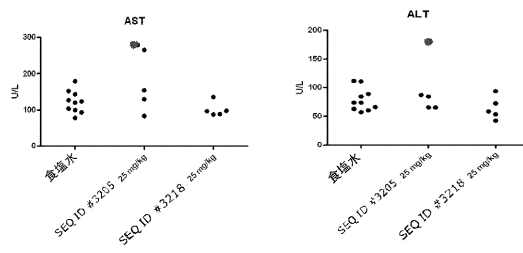
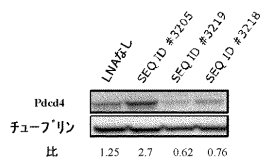


Figure 23

【 図 22 】



SEQ ID #3205 5'-GATAAGCT-3'
 SEQ ID #3219 5'-CGTAATGA-3'
 SEQ ID #3218 5'-GGTAAACT-3'

Figure 22

【 図 24 】

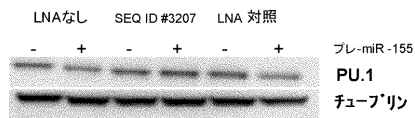
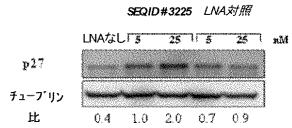


Figure 24

【図 25】



SEQ ID # 3225 5'- ATGTAGC -3'
 LNA对照 5'- GTAGACT -3'

Figure 25

【図 26】

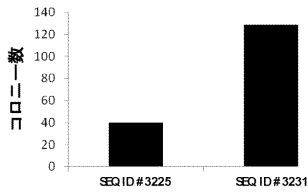


Figure 26

【図 27】

名称	成熟miRNA配列	S (2-8)	ES (2-9)	NE (9-16)合計	(2-16)
let-7a	UUGGUAGUAGGUUUAUAGUU	NA	NA	NA	NA
let-7b	UAGGUAGUAGGUUUAUAGUU	0	0	0	0
let-7c	UAGGUAGUAGGUUUAUAGUU	0	0	0	0
let-7d	UAGGUAGUAGGUUUAUAGUU	0	0	1	1
let-7e	UAGGUAGUAGGUUUAUAGUU	0	1	0	1
let-7f	UAGGUAGUAGGUUUAUAGUU	0	0	1	1
let-7g	UAGGUAGUAGGUUUAUAGUU	0	0	1	1
let-7i	UAGGUAGUAGGUUUAUAGUU	0	0	1	1
miR-98	UAGGUAGUAGGUUUAUAGUU	0	0	1	1

番号	化合物	配列 (5'→3')	長さ (nt)	相補的ターゲット
1.	SEQ ID #3226	A-C-a-A-c-C-T-a-c-T-a C-c-T-C	15	let-7a/b/c
2.	SEQ ID #3236	G-C-a-A-c-C-T-a-c-T-a C-c-T-C	15	let-7d
3.	SEQ ID #3237	A-C-a-A-c-C-T-c-c-T-a C-c-T-C	15	let-7e
4.	SEQ ID #3238	A-C-a-A-a-C-T-a-c-T-a C-c-T-C	15	let-7g/i
5.	SEQ ID #3239	C-T-A-C C-T-C	7	全メンバー
6.	SEQ ID #3240	C-T-A-A C-T-C	7	なし
7.	SEQ ID #3227	A-C-T-A-C C-T-C	8	let-7eを除くすべて
8.	SEQ ID #3232	T-A-C C-T-C	6	全メンバー
9.	SEQ ID #3234	T-N ₁ -C-T-A-C C-T-C	9	全メンバー ^b
10.	SEQ ID #3235	T-N ₂ -C-T-A-C C-T-C	9	全メンバー ^b

^a大文字および小文字はそれぞれLNAおよびDNAを表す。
^bどちらの9マーも、それぞれの2番目の位置にユニバーサルにハイブリダイズする2つの異なるケミストリーを含有するので、理論的にはすべてのメンバーをターゲットとする。

Figure 27

【図 28】

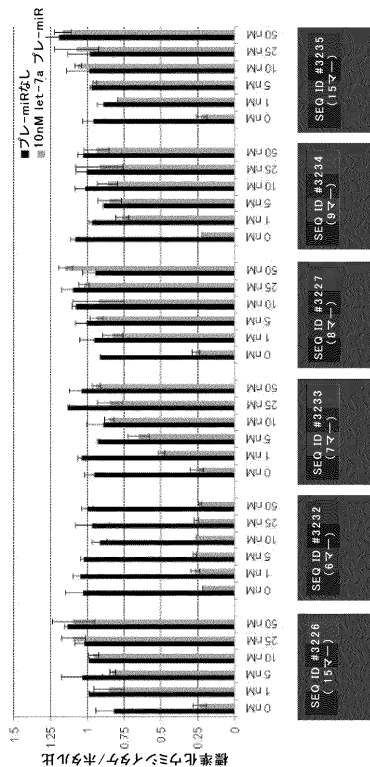


Figure 28

【図 29】

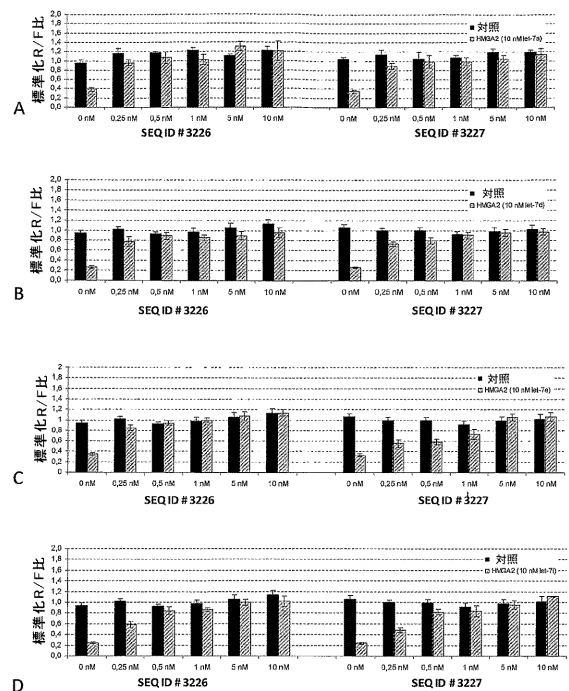


Figure 29

【 図 3 0 】

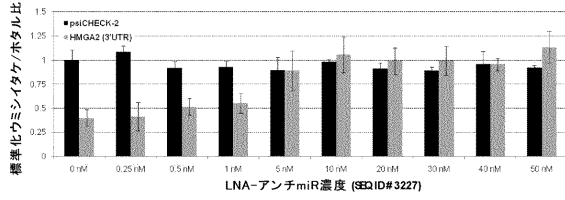


Figure 30

【 図 3 2 】

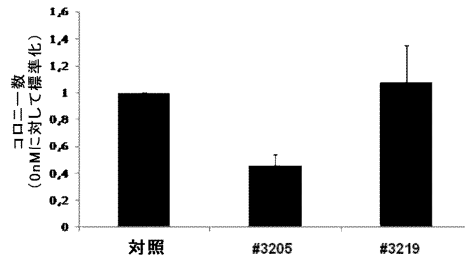


Figure 32.

【 図 3 1 】

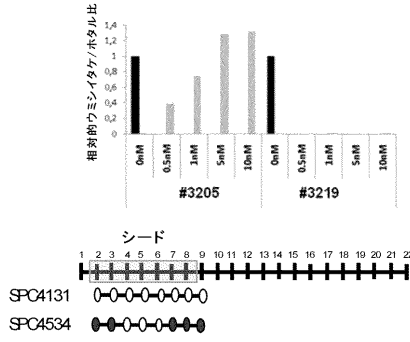


Figure 31.

【 図 3 3 】

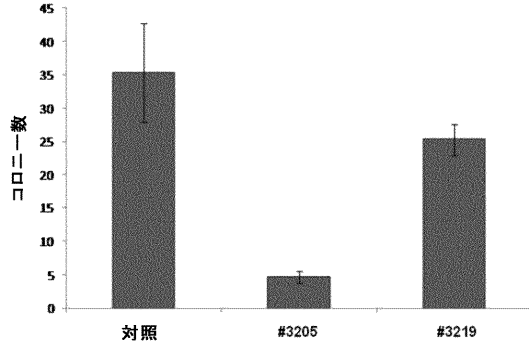


Figure 33.

【 図 3 4 】

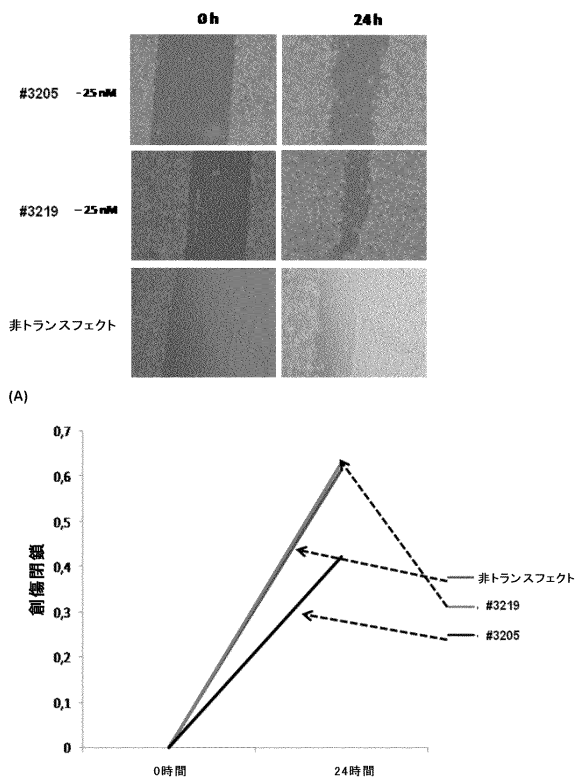


Figure 34 A and B

【 図 3 5 】

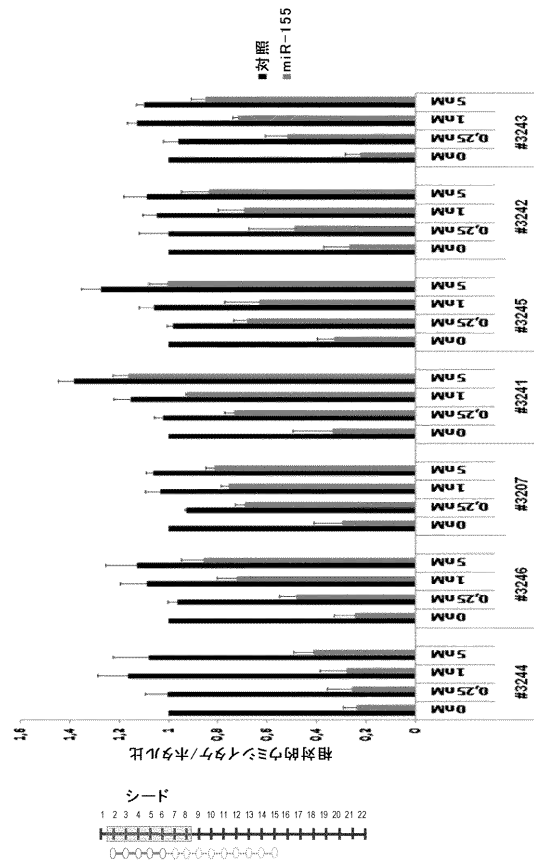
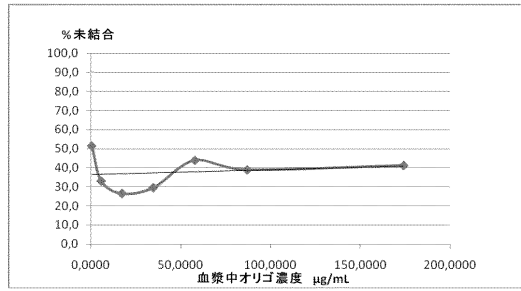
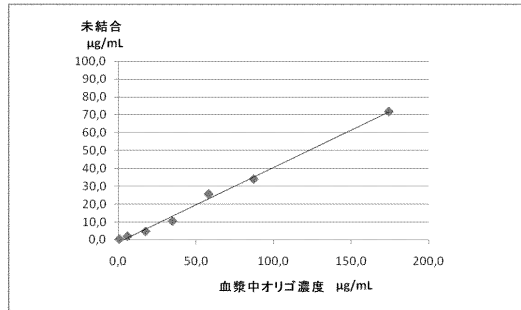


Figure 35.

【図36】



A)



B)

Figure 36.

【配列表】

0006035010000001.app

【図37】

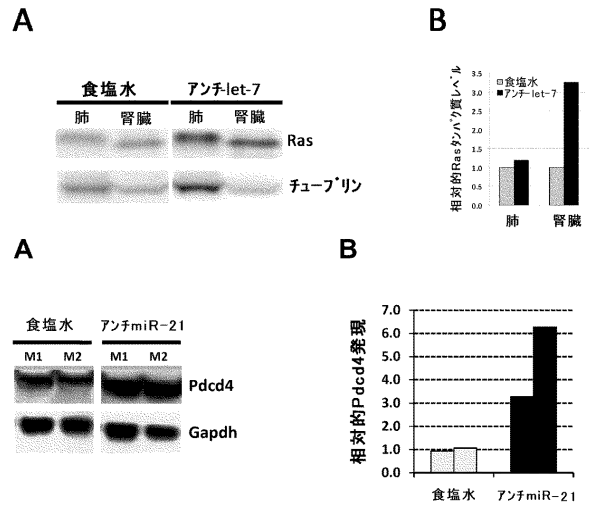


Figure 37.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 6 1 P 31/14 (2006.01) A 6 1 P 31/14
 A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00 1 0 5

(31)優先権主張番号 61/028,062
 (32)優先日 平成20年2月12日(2008.2.12)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 08104780.5
 (32)優先日 平成20年7月17日(2008.7.17)
 (33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(72)発明者 スサンナ・オバド
 スウェーデン、エス - 2 1 7 5 5 マルメ、ロスリンス・ヴェーグ18デー番
 (72)発明者 サカリ・カウツピネン
 デンマーク、デーコー - 2 7 6 5 スモルム、ノルスケクローゲン12番
 (72)発明者 ヨアシム・エルメン
 スウェーデン、エス - 2 1 1 5 2 マルメ、フェレニングスガータン61番
 (72)発明者 モルテン・リンドウ
 デンマーク、デーコー - 2 4 5 0 コペンハーゲン・エスヴェー、トマス・コッペルス・アレー22
 セー番
 (72)発明者 マルクス・ハイデンブラド
 スウェーデン、エス - 2 2 6 4 7 ルンド、マンタルスクローケン9番

合議体

審判長 田村 明照
 審判官 三原 健治
 審判官 高堀 栄二

(56)参考文献 特表2007-515953(JP,A)
 Biochemistry, 2002, Vol. 41, p. 9973-9981
 OLIGONUCLEOTIDES, 2004, Vol. 14, p. 130-146
 Curr. Opin. Invest. Drugs, 2001, Vol. 2, No. 4, p. 56
 2-573
 Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, Vol. 8, p. 2219-222
 2

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90
 PubMed
 Thomson Innovation
 CAPLUS/REGISTRY/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE/WPIDS
 (STN)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)