

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6106085号
(P6106085)

(45) 発行日 平成29年3月29日(2017.3.29)

(24) 登録日 平成29年3月10日(2017.3.10)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/113	(2010.01)
A 61 K 47/50	(2017.01)
A 61 K 47/06	(2006.01)
A 61 K 31/7125	(2006.01)
A 61 K 48/00	(2006.01)
C 12 N	15/00
A 61 K	47/48
A 61 K	47/06
A 61 K	31/7125
A 61 K	48/00

請求項の数 15 (全 86 頁)

(21) 出願番号	特願2013-526032 (P2013-526032)
(86) (22) 出願日	平成23年8月19日 (2011.8.19)
(65) 公表番号	特表2013-535982 (P2013-535982A)
(43) 公表日	平成25年9月19日 (2013.9.19)
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/048338
(87) 国際公開番号	W02012/027206
(87) 国際公開日	平成24年3月1日 (2012.3.1)
審査請求日	平成26年8月18日 (2014.8.18)
(31) 優先権主張番号	61/376,471
(32) 優先日	平成22年8月24日 (2010.8.24)
(33) 優先権主張国	米国(US)

前置審査

(73) 特許権者	500203684 サーナ・セラピューティクス・インコーポ レイテッド S i r n a T h e r a p e u t i c s, l n c. アメリカ合衆国、マサチューセッツ・O 2 1 4 2、ケンブリッジ、サード・ストリー ト・3 0 0
(74) 代理人	100114188 弁理士 小野 誠
(74) 代理人	100119253 弁理士 金山 賢教
(74) 代理人	100124855 弁理士 坪倉 道明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 内部非核酸スペーサーを含む一本鎖RNAi剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単一の標的RNAに対するRNA干渉を媒介する一本鎖RNA分子であって、前記一本鎖RNAが：

(i) 自己相補的でない第1のヌクレオチド部分(N 1)と第2のヌクレオチド部分(N 2)を含む核酸部分(ここで、当該核酸部分は、標的RNAの標的部位と塩基対形成し得る少なくとも20個のヌクレオチドを含むものであり、該核酸部分内のヌクレオチドの総数は20~26ヌクレオチドである)；および、

(ii) 内部スペーサー部分(ここで、当該スペーサー部分は、第1のヌクレオチド部分と第2のヌクレオチド部分を共有結合によって連結する少なくとも第1の非ヌクレオチドスペーサー部分(S 1)を含むものである)、を含む一本鎖RNA分子であって、

該一本鎖RNA分子は、下記の構造：

5' N 1 - S 1 - N 2 3'を含むものであり、式中：

(a) N 1は、13~20のヌクレオチド長の連続ヌクレオチド鎖を含むものであり；

(b) S 1は、N 1とN 2を共有結合によって連結する1つ以上の非ヌクレオチドスペーサーを含むものであり；

(c) N 2は、1個のヌクレオチドまたは連続ヌクレオチド鎖のいずれかを含むものであり、

S 1は、C₃ - C₆アルキル鎖であって、標的RNAの1から2個の内部ヌクレオチドと置き換えたものである、前記一本鎖RNA分子。

10

20

【請求項 2】

S 1 が、C 3 アルキルおよびC 6 アルキルからなる群より選択される、請求項 1 に記載の分子。

【請求項 3】

前記核酸部分内のヌクレオチドの総数が2 0または2 1ヌクレオチドである、請求項 1 または2に記載の分子。

【請求項 4】

前記標的部位が前記標的 R N A の非翻訳領域内に存在している、請求項 1 ~ 3のいずれか一項に記載の分子。

【請求項 5】

前記標的部位と塩基対形成し得る少なくとも2 0個のヌクレオチドが、天然に存在する内在性 m i R N A ヌクレオチド配列のシード配列の全体または一部である、請求項 4 に記載の分子。

【請求項 6】

S 1 が、前記天然に存在する内在性 m i R N A ヌクレオチド配列の 1 ~ 2 個の内部ヌクレオチドと置き換えられたものである、請求項 5 に記載の分子。

【請求項 7】

前記分子の核酸部分が、前記天然に存在する内在性 m i R N A ヌクレオチド配列と少なくとも 5 0 % 相同である、請求項 5 ~ 6 のいずれか一項に記載の分子。

【請求項 8】

前記標的部位が前記標的 R N A の遺伝子コード領域に存在している、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の分子。

【請求項 9】

前記分子の核酸部分が前記標的部位に少なくとも 9 0 % 相補的である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の分子。

【請求項 10】

少なくとも 1 個のヌクレオチドが修飾糖鎖を有する、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の分子。

【請求項 11】

少なくとも 1 個のヌクレオチドが修飾ヌクレオシド間結合を有する、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の分子。

【請求項 12】

5 ' 末端、3 ' 末端、または 5 ' 末端と 3 ' 末端の両方に末端キャップを有する、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の分子。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の一本鎖 R N A 分子および薬学的に許容され得る担体を含む組成物。

【請求項 14】

リポソーム、ヒドロゲル、シクロデキストリン、生分解性ナノカプセル、生体接着性ミクロスフィアまたはタンパク質性ベクターをさらに含む、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

細胞内の内在性 R N A 標的遺伝子の発現を低減させるための、請求項 13 または請求項 14 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照本出願は、2010年8月24日に出願された米国特許仮出願第 6 1 / 3 7 6 , 4 7 1 号の恩典を主張し、該仮出願は引用により本明細書に組み込まれる。

本発明は、内部非核酸スペーサーを含む一本鎖 R N A i 剤に関する。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【0002】

RNA干渉(RNAi)経路は、進化的に保存された遺伝子調節様式である。RNAiプロセスは、種々の外来性または内在性の供給源(例えば、実験による導入、ウイルス感染)により生成される二本鎖RNA(dsRNA)によって開始される。dsRNAがダイサーによって切断されると、20~25ヌクレオチドの低分子干渉RNA(siRNA)二本鎖が生成される。このような二本鎖は、次いで、RNA誘導性サイレンシング複合体(RISC)に負荷され、RISCが活性化される前に該二本鎖のパッセンジャー/センス鎖が外れる。単独のガイド/アンチセンス鎖はRISCに結合したままであり、標的mRNAの切断を指令する。したがって、二本鎖siRNAは、研究および核酸系治療薬の両方に対して重要なツールとなっている。

10

【0003】

RNAi遺伝子サイレンシングは、一本鎖RNA分子または二本鎖RNA分子によって行われ得る。ここ10年間に、一本鎖アンチセンスsiRNAがsiRNA二本鎖をほぼ同程度に効力があることが報告されている(例えば、非特許文献1;非特許文献2;非特許文献3;および非特許文献4を参照のこと)。二本鎖型とは対照的に、遺伝子サイレンシングのための一本鎖RNA分子の使用にはメリットがある。その分子量が小さいことにより、細胞膜を通過することがより容易となり得る。また、一本鎖RNA分子は、質量と体積が二本鎖siRNAの半分であり、製造コストの利点も示唆される。したがって、依然として、一本鎖RNAi分子に適した新規で好都合な設計上の特徴の設定における関心が高まっている。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Schwarz et al., 2002, Mol. Cell 10: 537-548

【非特許文献2】Martinez et al., 2002, Cell 110: 563-574

【非特許文献3】Amarzguioui et al., 2003, Nucleic Acids Res. 31: 589-595

【非特許文献4】Holen et al., 2003, Nucleic Acids Res. 31: 2401-2407

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本開示により、(a)2つ以上のヌクレオチド部分を含む核酸部分、および(b)1つ以上の非ヌクレオチドスペーサー部分を含む内部(「末端」と対照的)スペーサー部分を含み、該非ヌクレオチドスペーサー部分が該分子の2つのヌクレオチド部分を共有結合によって連結している一本鎖RNA分子を提供する。本発明の一本鎖RNA分子のヌクレオチド部分は互いに相補的でなく、したがって、前記部分は塩基対を形成しない。本発明の一本鎖RNA分子は、RNA干渉機構によって遺伝子発現を阻害し得るガイド鎖またはアンチセンス鎖としての機能を果たすものであり、したがって一本鎖RNAi剤である。

40

【0006】

本発明の一本鎖RNAi分子は、一本鎖オリゴヌクレオチド構造を有し、標的RNAに対するRNA干渉を媒介する。該一本鎖RNAi分子は:(a)第1のヌクレオチド部分(N1)と第2のヌクレオチド部分(N2)を含む核酸部分(前記核酸部分は、標的RNAと塩基対形成し得る少なくとも8個のヌクレオチドを含み、該核酸部分内のヌクレオチドの総数は8~26ヌクレオチドである);および(b)第1のヌクレオチド部分と第2のヌクレオチド部分を共有結合によって連結する少なくとも第1の非ヌクレオチドスペーサー部分(S1)を含む内部スペーサー部分を含むものである。第1のヌクレオチド部分

50

と第2のヌクレオチド部分は自己相補的でない。本発明の一本鎖RNAi分子のすべての数（例えば、8～26個）のヌクレオチドは該分子のヌクレオチド部分間に分布しており、各ヌクレオチド部分は少なくとも1個のヌクレオチドを含むものである。

【0007】

一実施形態において、本発明の一本鎖RNAi分子の核酸部分は、第1のヌクレオチド部分（N1）および第2のヌクレオチド部分（N2）と称する2つのヌクレオチド部分を含むものである。本発明のRNAi分子の第1のヌクレオチド部分と第2のヌクレオチド部分は、該分子の非ヌクレオチドスペーサー部分に共有結合によって結合されている。別の実施形態では、本発明の一本鎖RNAi分子の核酸部分は、1つより多くのヌクレオチド部分（例えば、3、4または5つ、それぞれ、第3（N3）、第4（N4）または第5（N5）のヌクレオチド部分と称する）を含むものである。 10

【0008】

一実施形態において、本発明の一本鎖RNAi分子の内部スペーサー部分は、第1の非ヌクレオチドスペーサー部分（S1）と称する非ヌクレオチドスペーサー部分を1つだけ含むものである。本発明のRNAi分子の第1の非ヌクレオチドスペーサー部分（S1）は、共有結合によって、2個のヌクレオチドおよび/または非ヌクレオチド代替部（各々は、該一本鎖分子の相違するヌクレオチド部分内に存在している）に結合されている。別の実施形態では、本発明の一本鎖RNAi分子の内部スペーサー部分は、1つより多くの非ヌクレオチドスペーサー部分（例えば、2、3または4つ、それぞれ、第2（S2）、第3（N3）または第4（N4）の非ヌクレオチドスペーサー部分と称する）を含むものである。 20

【0009】

本発明の一本鎖RNAi分子は、細胞内のRNA標的部位に一部、実質的に、または完璧に相補的な配列ヌクレオチドを含むものである。

【0010】

一実施形態において、本発明の一本鎖RNAi分子は、天然に存在するmiRNAのガイド鎖に一部、実質的に、または完璧に相同なヌクレオチド配列を含むものであり、したがって、miRNA模倣物としての機能を果たす。本発明の一本鎖miRNA模倣物は天然に存在する対応miRNAを基にして設計され、このとき、少なくとも1つの非ヌクレオチドスペーサー部分は、天然に存在するmiRNAガイド鎖配列の2個の隣接ヌクレオチド間に存在しているか、または天然に存在するmiRNAガイド鎖配列の1～約12個の内部（すなわち、非末端）ヌクレオチドの代わりに置き換えられているかのいずれかである。 30

【0011】

別の実施形態では、本発明の一本鎖RNAi分子は、一本鎖siRNAまたは二本鎖siRNAのガイド/アンチセンス鎖のいずれかの類似体であり、該一本鎖RNAi分子は、対応する一本鎖siRNAまたは対応する二本鎖siRNAのガイド鎖に一部、実質的に、または完璧に相同な配列を含むものである。対応する一本鎖siRNAまたは二本鎖siRNAは、RNAi機構によって遺伝子発現を阻害することが知られたものであり得る。この実施形態において、該一本鎖RNAi分子は一本鎖siRNA模倣物である。本発明の一本鎖siRNA模倣物は対応siRNAを基にして設計され、このとき、少なくとも1つの非ヌクレオチドスペーサー部分は、siRNAガイド鎖配列の2個の隣接ヌクレオチド間に存在しているか、または対応siRNAガイド鎖配列の1～約4個のヌクレオチドの代わりに置き換えられているかのいずれかである。 40

【0012】

本発明の一本鎖RNAi分子は、置換、化学修飾ヌクレオチド、および非ヌクレオチド（例えば、主鎖、糖鎖、塩基またはヌクレオシドにおける置換または修飾）を含むものであってもよい。一部の特定の実施形態において、置換または修飾された本開示の一本鎖RNAi分子の使用により、この分子は被検体または生物学的試料中（例えば、血清中）において半減期が増大するように設計されたものであり得るため、低用量で所与の治療効果 50

の達成が可能となり得る。さらに、特定の細胞もしくは組織を標的化することによって、または一本鎖RNAi分子の細胞内取込みを改善することによって、一本鎖RNAi分子のバイオアベイラビリティを改善するために特定の置換または修飾が使用され得る。

【0013】

本発明の一本鎖RNAi分子の内部スペーサー部分は、1つ以上の非ヌクレオチドスペーサー部分を含むものであってもよい。非ヌクレオチドスペーサー部分は、任意の脂肪族または芳香族の化学基（さらに置換されていてもよい）を含むものであってもよく、前記スペーサー部分にはヌクレオチドが含まれていない。該スペーサー部分は、該一本鎖RNAi分子にさらなる官能部を提供する化学部分で置換されたものであり得る。例えば、非ヌクレオチドスペーサー部分は、対象の標的分子に特異的に結合する部分、または該分子の細胞内送達を助長／増進する部分で置換されたものであり得る。本発明の一実施形態において、非ヌクレオチドスペーサー部分としては、好ましくは炭素数が1～20のアルキル、アルケニルまたはアルキニル鎖（これらは置換されていてもよい）が挙げられる。

【0014】

本発明の一本鎖RNAi分子は、さまざまな治療的、診断的、標的確認、ゲノム知得、遺伝子操作および薬理ゲノミクスの適用用途のための方法において使用され得る有用な試薬である。したがって、本発明は、さらに、本開示の一本鎖RNAi分子を含む組成物、および細胞または生物体において1種類以上の対応する標的mRNAの発現を阻害するための方法を含む。本開示により、被検体（ヒト細胞、組織または個体を包含する）を処置するための方法および一本鎖RNAi分子組成物を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】RT-qPCRアッセイを使用し、C3スペーサーを含む一本鎖m_iR-124類似体によるVAMP3標的の発現の阻害度合いを示す。該類似体の構造および配列は、表2（後述）に具体的に示している。このm_iR-124類似体の模式図において、丸印は、5'末端に存在する黒丸が5'リン酸基を表すこと以外、ヌクレオチドを表す。白丸は、2' - デオキシ - 2' - フルオロヌクレオチドを表す。この模式図の3'末端に存在する黒丸は2' - O - メチルヌクレオチドを表し、「3」はC3スペーサーの位置を表す。「124(21)-8p-16rrr」類似体の模式図において、3つの内部の黒丸は非修飾リボヌクレオチドを表す。グラフにおいてバーが長いほどノックダウンが大きいことを示し、二連のバーは生物学的同型体を示す。

【図2】RT-qPCRアッセイを使用し、C6スペーサーを含む一本鎖m_iR-124類似体によるVAMP3標的の発現の阻害度合いを示す。該類似体の構造および配列は、表2（後述）に具体的に示している。このm_iR-124類似体の模式図において、丸印は、5'リン酸基に存在する黒丸が5'リン酸基を表すこと以外、ヌクレオチドを表す。白丸は、2' - デオキシ - 2' - フルオロヌクレオチドを表す。この模式図の3'末端に存在する黒丸は2' - O - メチルヌクレオチドを表し、「6」は、C6スペーサーの位置を表す。「124(21)-8p-16rrr」類似体の模式図において、3つの内部の黒丸は非修飾リボヌクレオチドを表す。グラフにおいてバーが長いほどノックダウンが大きいことを示し、二連のバーは生物学的同型体を示す。

【図3】図1と2の試験類似体のサブセットのVAMP3発現の用量依存性応答を示す。VAMP3発現をy軸上に示している。試験したm_iR-124類似体（構造および配列については表2（後述）参照）の用量をx軸上に、左側に最小用量から右側に最大に用量までの範囲で示す。

【図4】レポーターアッセイを使用し、C3スペーサーを含む一本鎖m_iR-124類似体による阻害度合いを示す。このアッセイは、m_iR-124のシード（seed）領域とマッチしている2つの標的部位を有するコトランスクレプトしたルシフェラーゼレポーターのノックダウンを測定するものである。該類似体の構造および配列は、表2（後述）に具体的に示している。このm_iR-124類似体の模式図において、丸印は、5'末端に存在する黒丸が5'リン酸基を表すこと以外、ヌクレオチドを表す。白丸は、2' - デ

10

20

30

40

50

オキシ-2' - フルオロヌクレオチドを表す。この模式図の3'末端に存在する黒丸は、2' - O - メチルヌクレオチドを表し、「3」はC3スペーサーの位置を表す。「124(21) - 8p - 16rrr」類似体の模式図において、3つの内部の黒丸は非修飾リボヌクレオチドを表す。グラフの二連のバーは生物学的同型体を示し、長いバーほど阻害が大きいことを示す。

【図5】レポーターアッセイを使用し、C6スペーサーを含む一本鎖m i R - 124類似体による阻害度合いを示す。このアッセイは、m i R - 124のシード領域とマッチしている2つの標的部位を有するコトランスフェクトしたルシフェラーゼレポーターのノックダウンを測定するものである。該類似体の構造および配列は、表2(後述)に具体的に示している。このm i R - 124類似体の模式図において、丸印は、5'末端に存在する黒丸が5'リン酸基を表すこと以外、ヌクレオチドを表す。白丸は、2' - デオキシ-2' - フルオロヌクレオチドを表す。この模式図の3'末端に存在する黒丸は、2' - O - メチルヌクレオチドを表し、「6」はC6スペーサーの位置を表す。「124(21) - 8p - 16rrr」類似体の模式図において、3つの内部の黒丸は非修飾リボヌクレオチドを表す。二連のバーは生物学的同型体を示し、長いバーほど阻害が大きいことを示す。

【図6A】図3の試験した一本鎖m i R - 124類似体のサブセットでの2種類の異なるルシフェラーゼレポーターの標的発現阻害の用量依存性応答を示す。表示した阻害活性は、m i R - 124シード領域に対して2つのマッチを有するルシフェラーゼレポーターに対するものであり、試験類似体のm i R N A活性を表す。

【図6B】図3の試験した一本鎖m i R - 124類似体のサブセットでの2種類の異なるルシフェラーゼレポーターの標的発現阻害の用量依存性応答を示す。表示した阻害活性は、m i R - 124に対して2つの完全長マッチを有するルシフェラーゼレポーターに対するものであり、試験類似体のs i R N A活性を表す。

【図7】15位(「485 c3@pos15」)、16位(「485 c3@pos16」)、17位(「485 c3@pos17」)、18位(「485 c3@pos18」)、または19位(「485 c3@pos19」)(該オリゴ体の5'を基準)のいずれかに組み込まれたC3スペーサーを有するA p o B標的化一本鎖(ガイド鎖)オリゴヌクレオチドを使用し、A p o B m R N Aのノックダウンを、スペーサーのない対応一本鎖オリゴヌクレオチド(「485」)について、2つの異なる濃度(100nMおよび10nM)において比較したものである。一本鎖分子はすべて、ピリミジンヌクレオチドとプリンヌクレオチドの両方が2' - デオキシ-2' - フルオロヌクレオチド、5'リン酸基、および3'末端の2個の2' - O - メチルヌクレオチドで構成されたものである。

【図8】18位にC3スペーサーを有する30種類の異なるA p o B標的化一本鎖配列を用いて、2つの濃度(100nMおよび10nM)でA p o B m R N Aノックダウンを比較したものである。該一本鎖をx軸上に、標的化対象のA p o B m R N A内の位置によって表記している。一本鎖分子はすべて、ピリミジンヌクレオチドとプリンヌクレオチドの両方が2' - デオキシ-2' - フルオロヌクレオチド、5'リン酸基、および3'末端の2個の2' - O - メチルヌクレオチドで構成されたものである。

【図9】19位にC3スペーサーを有する30種類の異なるA p o B標的化一本鎖配列を用いて、2つの濃度(100nMおよび10nM)でA p o B m R N Aノックダウンを比較したものである。該一本鎖をx軸上に、標的化対象のA p o B m R N A内の位置によって表記している。一本鎖分子はすべて、ピリミジンヌクレオチドとプリンヌクレオチドの両方が2' - デオキシ-2' - フルオロヌクレオチド、5'リン酸基、および3'末端の2個の2' - O - メチルヌクレオチドで構成されたものである。

【図10】図8と9で試験した30種類の異なる各A p o B標的部位を標的化する一本鎖分子を用いた100nM濃度でのA p o B m R N Aノックダウンを、C3スペーサーなしの一本鎖(「全-f1u-p」)、18位にC3スペーサーを有する一本鎖(「全-f1u-c3-18-p」)、および19位にC3スペーサーを有する一本鎖(「全-f1u-c3-19-p」)を用いて比較したものである。一本鎖分子はすべて、ピリミジン

10

20

30

40

50

ヌクレオチドとプリンヌクレオチドの両方が2' - デオキシ - 2' - フルオロヌクレオチド、5' リン酸基、および3' 末端の2個の2' - O - メチルヌクレオチドで構成されたものである。

【発明を実施するための形態】

【0016】

A. 用語および定義

本出願書類で用いる場合、以下の専門用語および定義を適用する。

【0017】

本明細書および添付の特許請求の範囲で用いる場合、単数形「a」、「a n」および「the」は、本文中にそうでないことを明示していない限り、複数の指示対象物を包含している。したがって、例えば「細胞」に対する言及は2個以上の細胞の組合せを包含している、などである。

【0018】

濃度範囲、パーセンテージ範囲、比率の範囲、または整数の範囲はいずれも、特に記載のない限り、記載の範囲内の任意の整数値ならびに、適切な場合は、その分数（整数の10分の1および100分の1など）を含むと理解されたい。「約」または「およそ」は、数値に関して本明細書で用いる場合、特に記載のない限り、または本文から自明でない限り、一般的に、該数値のいずれかの方向（大きい方または小さい方）の5%の範囲内に含まれる数値を包含していると理解されたい（かかる数値が可能な値の100%を超えることがあり得る場合を除く）。範囲を記載している場合、特に記載のない限り、または本文から自明でない限り、両端は該範囲に含まれる。

【0019】

本明細書で用いる場合、用語「including」（～を含む）（およびその任意の形態、例えば、「includes」および「include」）、「comprising」（～を含む）（およびその任意の形態、例えば、「comprise」および「comprises」）、「having」（～を有する）（およびその任意の形態、例えば、「has」もしくは「have」）、または「containing」（およびその任意の形態、例えば、「contains」または「contain」）は包括的でオープンエンドであり、記載していないさらなる要素またはプロセス工程を排除しない。

【0020】

「類似体」は、本明細書で用いる場合、当該技術分野で一般に認められたその意味を示す。該用語は、一般的に、親化合物または分子（例えば、ヌクレオチド、天然に存在するm i R N A）と構造的に類似しているが、組成物が若干異なる（例えば、1個の原子または官能基が異なる、付加または除去されている）化合物または分子をいう。類似体は、原型の親化合物または分子と異なる化学的特性または物性を有するものであっても、そうでなくともよく、改善された生物学的活性または化学的活性を有するものであっても、そうでなくともよい。例えば、類似体は、親化合物／分子よりも親水性であってもよく、親化合物／分子の活性が改変されたものであってもよい。類似体は、原型の親化合物分子は、天然のバリアントであっても天然に存在しない（例えば、化学修飾された、または組換え）バリアントであってもよい。R N A類似体の一例は、ヌクレオチド類似体を含むR N A分子である。ヌクレオチド類似体は、糖鎖、塩基またはヌクレオシドが化学修飾されたヌクレオチドであり、当該技術分野で一般的に認識されている。

【0021】

本明細書で用いる場合、用語「模倣物」は、当該技術分野で一般に認められたその意味を示す。該用語は、一般的に、参照分子と構造的に異なる分子をいう。例えば、本発明の一部の特定の実施形態の目的のための参照分子は、天然に存在するm i R N A分子、または非ヌクレオチド内部スペーサーが含まれていない一本鎖s i R N A分子であり得る。模倣物は、参照分子の能力の範囲内である生物学的、生理学的および／または化学的機能のうちの1つ以上または全部を発揮できるものである。模倣物と参照分子は機能的等価体である必要はないが、模倣物は、共有された機能を示すのに適したアッセイまたはパ

10

20

30

40

50

ラメータを用いて測定および比較したとき、参照分子の1つ以上の機能を発揮でき、参照分子の活性の少なくとも5%以上、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、または90%以上を発現できるものであるのがよい。用語「類似体」と「模倣物」は、参照RNAi分子と構造的に異なる本開示のRNAi分子を説明する場合、は、互換的に用いていることがあり得る。

【0022】

用語「ヌクレオチド」は、当該技術分野で一般的に認識されたその意味を示す。ヌクレオチドは、一般的に、核酸塩基、糖鎖およびヌクレオシド間結合（例えば、ホスフェート）で構成されている。塩基は、天然塩基（標準）であっても修飾塩基であっても塩基類似体であってもよく、これらは、当該技術分野でよく知られている。かかる塩基は、一般的に、ヌクレオチドの糖鎖部分の1'位に存在している。さらに、ヌクレオチドは非修飾であってもよく、糖鎖、ヌクレオシド間結合および/または塩基部分が修飾されていてもよい（互換的にヌクレオチド類似体、修飾ヌクレオチド、非天然ヌクレオチド、非標準ヌクレオチドとも称される）；例えば、米国特許出願第12/064,014号を参照のこと。

10

【0023】

用語「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」は、本明細書で用いる場合、当該技術分野で一般に認められたその意味を示す。該用語は、一般的にヌクレオチド鎖をいう。「核酸」および「核酸分子」はヌクレオチドのポリマーである。したがって、「核酸」、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」は、本明細書において互換的である。当業者は、核酸が、ヌクレオチドモノマーに加水分解され得るポリヌクレオチドであるという一般知識を有している。ヌクレオチドモノマーは、さらにヌクレオシドに加水分解され得る。

20

【0024】

「連続ヌクレオチド鎖」により、一連の連続した少なくとも2個のヌクレオチドを意図する。該鎖内のヌクレオチドを接続している結合はホスホジエステル結合である。

【0025】

用語「RNA」は、本明細書で用いる場合、当該技術分野で一般に認められたその意味を示す。該用語は、一般的に、少なくとも1つのリボフラノシド残基（リボヌクレオチドなど）を含む分子をいう。用語「リボヌクレオチド」は、-D-リボフラノース部分の2'位にヒドロキシル基を有するヌクレオチドを意味する。該用語は、二本鎖RNA、一本鎖RNA、単離されたRNA、例えば、一部精製RNA、本質的に純粋なRNA、合成RNA、組換え作製されたRNA、または天然に存在するRNAと1つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換および/または改変によって異なる改変RNAをいう。かかる改変としては、例えば、RNA分子の1個以上の非末端ヌクレオチドへの非ヌクレオチド物質の付加が挙げられ得る。したがって、本発明の一本鎖RNA分子内のヌクレオチドは、天然に存在しないヌクレオチド、化学合成ヌクレオチドおよび/または修飾ヌクレオチドあるいはデオキシヌクレオチドなどの非標準ヌクレオチドを含むものであってもよい。改変RNAは「修飾RNA」または「RNA類似体」と称される。

30

【0026】

用語「ピリミジン」は、本明細書で用いる場合、当該技術分野で一般に認められたその意味を示す。該用語は、一般的に慣用的なピリミジン塩基、例えば、標準ピリミジン塩基であるウラシル、チミジンおよびシトシンをいう。また、ピリミジンという用語には、非標準ピリミジン塩基または酸、例えば、5-メチルウラシル、2-チオ-5-メチルウラシル、4-チオウラシル、ブソイドウラシル、ジヒドロウラシル、オロト酸（orotate）、5-メチルシトシンなど、ならびに化学修飾塩基または「ユニバーサル塩基」が包含されることを想定しており、これらは、本開示の核酸分子において標準ピリミジンの代わりに置き換えて使用され得る。

40

【0027】

用語「プリン」は、本明細書で用いる場合、当該技術分野で一般に認められたその意味

50

を示す。該用語は、一般的に、慣用的なプリン塩基、例えば、標準プリン塩基であるアデニンおよびグアニンをいう。また、用語「プリン」には、非標準プリン塩基または酸、例えば、N₂-メチルグアニン、イノシン、ジアミノプリンなど、ならびに化学修飾塩基または「ユニバーサル塩基」が包含されることを想定しており、これらは、本明細書において標準プリンの代わりに置き換えて使用され得る。

【0028】

本明細書に記載のように、「塩基対」は、2個のヌクレオチド間、ヌクレオチドと修飾ヌクレオチド間、2個の修飾ヌクレオチド間、ヌクレオチドとヌクレオチド類似体間、2個のヌクレオチド類似体間、ヌクレオチドと非ヌクレオチド代替部分間、または2つの非ヌクレオチド代替部分間で形成され得る。具体的な実施形態では、非ヌクレオチド代替部は、細胞内RNAi機構の成分（例えば、PAZドメイン、PIWIドメインおよび/またはRISCと結合している他のアルゴノートタンパク質ドメインなど）と関連し得る任意の化学部分を含むものであり得る。また、従来型でないワトソンクリック塩基対は、「非規範的な塩基対」と理解されている。非規範的な塩基対は、ミスマッチおよび/またはゆらぎ（wobble）塩基対などの任意の非ワトソンクリック塩基対、例えば、フリップド（flipped）ミスマッチ、単一水素結合ミスマッチ、トランス型ミスマッチ、三重塩基相互作用、および四重塩基相互作用を意図する。かかる非規範的な塩基対の非限定的な例としては、限定されないが、AC逆フーグスティーン型、ACゆらぎ、AU逆フーグスティーン型、GUゆらぎ、AA N7アミノ、CC 2-カルボニル-アミノ（H1）-N3-アミノ（H2）、GA剪断型、UC 4-カルボニル-アミノ、UUイミノ-カルボニル、AC逆ゆらぎ、AUフーグスティーン型、AU逆ワトソンクリック、CG逆ワトソンクリック、GC N3-アミノ-アミノN3、AA N1-アミノ対称型、AA N7-アミノ対称型、GA N7-N1アミノ-カルボニル、GA+カルボニル-アミノN7-N1、GG N1-カルボニル対称型、GG N3-アミノ対称型、CCカルボニル-アミノ対称型、CC N3-アミノ対称型、UU 2-カルボニル-イミノ対称型、UU 4-カルボニル-イミノ対称型、AA アミノ-N3、AA N1-アミノ、AC アミノ2-カルボニル、AC N3-アミノ、AC N7-アミノ、AU アミノ-4-カルボニル、AU N1-イミノ、AU N3-イミノ、AU N7-イミノ、CCカルボニル-アミノ、GA アミノ-N1、GA アミノ-N7、GA カルボニル-アミノ、GA N3-アミノ、GC アミノ-N3、GC カルボニル-アミノ、GC N3-アミノ、GC N7-アミノ、GG アミノ-N7、GG カルボニル-イミノ、GG N7-アミノ、GU アミノ-2-カルボニル、GU カルボニル-イミノ、GU イミノ-2-カルボニル、GU N7-イミノ、psi U イミノ-2-カルボニル、UC 4-カルボニル-アミノ、UC イミノ-カルボニル、UU イミノ-4-カルボニル、AC C2-H-N3、GA カルボニル-C2-H、UU イミノ-4-カルボニル2カルボニル-C5-H、AC アミノ（A）N3（C）-カルボニル、GC イミノアミノ-カルボニル、Gpsi イミノ-2-カルボニルアミノ-2-カルボニルおよびGU イミノアミノ-2-カルボニル塩基対が挙げられる。

【0029】

本明細書で用いる場合、用語「相補的な」（または「相補性」）は、当該技術分野で一般に認められたその意味を示す。該用語は、一般的に、ある核酸配列と別の核酸配列間での、従来のワトソン-クリック型または本明細書に記載の他の非従来型の結合のいずれかによる水素結合の形成または存在をいう。本発明の例示的な核酸分子に関しては、相補性は本発明の一本鎖RNAiとRNA標的配列との間に見られ得る。核酸分子のその相補配列との結合自由エネルギーは、該核酸の該当する機能（例えば、RNAi活性）が進行することを可能にするのに充分なものである。核酸分子の結合自由エネルギーの測定は当該技術分野でよく知られている（例えば、Turnerら, 1987, CSH Symp. Quant. Biol. LII pp. 123-133; Frierら, 1986, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83: 9373-9377; Turnerら, 1987, J. Am. Chem. Soc. 109: 3783-3785を参照のこと）

10

20

30

40

50

。

【0030】

本明細書で用いる場合、用語「完璧に相補的な」（または「完璧な相補性」）は、第1の核酸分子（例えば、本発明の一本鎖RNAi分子）と第2の核酸分子（例えば、標的RNA配列）との間において、第1の核酸配列の連続している残基のすべてが、第2の核酸配列内の同じ数の連続している残基と水素結合することを意味する。例えば、2つ以上の完璧に相補的な核酸鎖は、同じ数のヌクレオチドを有するものであっても（すなわち、同じ長さを有し、突出端を有する、もしくは有しない1つの二本鎖領域を形成している）、異なる数のヌクレオチドを有するものであってもよい（例えば、第1の鎖は、第2の鎖よりも短いが第2の鎖内に完全に内包されるものであり得る）。一例として、本発明の一本鎖RNAi分子が、ヌクレオチド1個だけの第1のヌクレオチド部分と10個の連続したヌクレオチドの第2のヌクレオチド部分を有するものであり、該分子の第2のヌクレオチド部分の10個全部のヌクレオチドがRNA標的配列と塩基対形成する場合、該RNAi分子はRNA標的配列と完璧に相補的である。第1のヌクレオチド部分に含まれた単一のヌクレオチドは、連続したヌクレオチド鎖に存在するものでないため、相補性の度合いを判定する際に含めない。しかしながら、この例において、第1のヌクレオチド部分が2個のヌクレオチドを含むものである場合、第1のヌクレオチド部分の該2個のヌクレオチドと第2のヌクレオチド部分の10個のヌクレオチドがRNA標的配列と塩基対形成するのであれば、該RNAi分子はRNA標的配列に完璧に相補的である。

【0031】

相補的な核酸分子は、誤対合塩基 - すなわち、従来のワトソンクリック塩基対の形成（すなわち、水素結合の形成）の形成ができない塩基、または他の非従来型の塩基対（すなわち、水素結合でない非従来型の力によって形成もしくは保持されて一体になった「ミスマッチ」塩基）を有するものであってもよい。用語「一部相補的な」（または「一部相補性」）は、第1の核酸分子（例えば、本発明の一本鎖RNAi分子）と第2の核酸分子（例えば、標的RNA配列）との間において、種々のミスマッチまたは塩基対を形成しないヌクレオチド（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上のミスマッチまたは塩基対を形成しない形成ヌクレオチド）がヌクレオチド配列間に生じる（これにより、例えば隆起部またはループがもたらされ得る）ことを示す。かかる一部相補性は相補性パーセント（%）で表され得、これは、関与しているヌクレオチドの総数に対する塩基対形成したヌクレオチドの数によって求められ、例えば、約50%、60%、70%、80%、90%などである。例えば、第1の核酸分子が10個のヌクレオチドを有するものであり得、第2の核酸分子が10個のヌクレオチドを有するものであり得、そのとき、第1および第2の核酸分子間（これは、連続した二本鎖領域を形成していても形成していないてもよい）での5、6、7、8、9または10個のヌクレオチドの塩基対形成は、それぞれ、50%、60%、70%、80%、90%または100%の相補性を示すものである。本発明との関連において、かかる一部相補性は、本発明の一本鎖RNAi分子がその機能（例えば、配列特異的RNAiを媒介する能力）を維持している範囲で許容される。

【0032】

第1の核酸分子は第2の核酸に「実質的に相補的な」ものであり得る。「実質的に相補的な」により、第1の核酸配列（例えば、本発明の一本鎖RNAi分子）が第2の核酸配列（例えば、RNA標的配列）に、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%相補的であることを意図する。本明細書で用いる場合、第1の核酸分子は第2の核酸分子に、「一部相補的」かつ「実質的に相補的」であり得る。

【0033】

本明細書で用いる場合、用語「相同な」（または「相同性」）は、当該技術分野で一般に認められたその意味を示す。該用語は、一般的に、典型的には配列解析プログラムによって（例えば、KarlinnおよびAltschul, 1990, PNAS 87: 22

10

20

30

40

50

64-2268; Karl in および Alt schul, 1993, PNAS 90: 5873-5877) または目視検査によって調べたとき、参照核酸配列の同一のヌクレオチドにマッチした主題の核酸配列のヌクレオチドの数をいう。用語「完璧な相同性」(または「完璧に相同な」)は、本明細書で用いる場合、参照配列と主題の核酸配列間の完全な(100%)相同性または「同一性」をいう。本明細書で用いる場合、用語「実質的に相同な」(または「実質的な相同性」)は、主題の配列が参照配列の同じヌクレオチド位置のヌクレオチドと、少なくとも50% (例えば、少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%) 相同なヌクレオチドを共有していることを意図する。

【0034】

10

語句「化学修飾」は、本明細書で用いる場合、当該技術分野で一般に認められたその意味を示す。本発明の例示的な核酸分子に関しては、該用語は、天然RNAのヌクレオチドと異なるヌクレオチドの化学構造の任意の修飾をいう。用語「化学修飾」は、本明細書に記載の、あるいは当該技術分野で知られているような、糖鎖、塩基またはヌクレオチド間結合における天然RNAの付加、置換または修飾を包含する。一部の特定の実施形態において、用語「化学修飾」は、特定の生物学的系内に天然に存在しているRNAの特定の形態(例えば、2'-O-メチル修飾またはイノシン修飾)をいう場合があり得る。

【0035】

語句「修飾ヌクレオチド」は、本明細書で用いる場合、当該技術分野で一般に認められたその意味を示す。該用語は、一般的に、当該技術分野で一般的に知られた非修飾(または天然)ヌクレオチドの塩基、糖鎖および/またはリン酸基の化学構造内に修飾を含むヌクレオチドをいう。修飾ヌクレオチドの非限定的な例は、本明細書および米国特許出願第12/064,014号に記載されている。

20

【0036】

「修飾割合」は、当該技術分野で一般に認められたその意味を示す。本明細書で用いる場合、該用語は、一般的には、本発明の一本鎖RNA分子内の修飾されたヌクレオチドの数をいう。化学修飾の程度は、当業者によく知られた種々の要素(例えば、標的RNA、オフターゲットサイレンシング、エンドヌクレアーゼ分解の度合い)に依存する。

【0037】

30

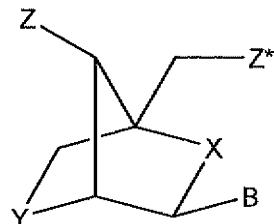
用語「ホスホロチオエート」は、当該技術分野で一般に認められたその意味を示す。該用語は、一般的に、酸素原子の代わりに1個以上のイオウ原子を含むヌクレオチド間リン酸結合をいう。したがって、ホスホロチオエートという用語は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合およびホスホロジチオエートヌクレオチド間結合のどちらも指す。

【0038】

本明細書で用いる場合、用語「ロックド核酸」(LNA)は、一般式I:

【0039】

【化1】



40

の構造を有するものであり、XおよびYは、独立して、-O-、-S-、-N(H)-、-N(R)-、-CH₂-または-CH- (二重結合の一部である場合)、-CH₂-O-、CH₂-S-、CH₂-N(H)-、-CH₂-N(R)-、-CH₂-CH₂-、およびCH₂-CH- (二重結合の一部である場合)、-CH=CH- (ここで、Rは、水素およびC₁~₄-アルキルから選択される) からなる群より選択され; ZおよびZ*は、独立して、ヌクレオチド間結合、末端基または保護基から選択され; Bは、天然また

50

は非天然の核酸塩基を構成しており；不斉基は、どちらの向きで見られるものであってもよい。

【0040】

図示した式Iの4つのキラル中心は固定された立体配置に存在しているが、その立体配置は固定されている必要はない。したがって、キラル中心は、式II（下記）に示したものなどの異なる立体配置で見られるものであってもよい。したがって、式Iの各キラル中心は、R配置またはS配置のいずれで存在するものであってもよい。R（右：rectus）およびS（左：sinister）の定義は、IUPAC 1974 Recommendations, Section E, Fundamental Stereochimistry: The rules can be found in Pure Appl. Chem. 45, 13-30 (1976) および「Nomenclature of Organic Chemistry」Pergamon, New York, 1979に記載されている。

【0041】

末端基は、独立して、水素、アジド、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、Prot-O-、Act-O-、メルカプト、Prot-S-、Act-S-、C_{1~6}-アルキルチオ、アミノ、Prot-N(R^H)-、Act-N(R^H)、モノ-またはジ(C_{1~6}-アルキル)アミノ、置換されていてもよいC_{1~6}-アルコキシ、置換されていてもよいC_{1~6}-アルキル、置換されていてもよいC_{2~6}-アルケニル、置換されていてもよいC_{2~6}-アルケニルオキシ、置換されていてもよいC_{2~6}-アルキニル、置換されていてもよいC_{2~6}-アルキニルオキシ、モノホスフェート、モノチオホスフェート、ジホスフェート、ジチオホスフェート、トリホスフェート、トリチオホスフェート、DNAインターラーカー、光化学的活性基、熱化学的活性基、キレート基、レポーター基、リガンド、カルボキシ、スルホノ、ヒドロキシメチル、Prot-O-CH₂-、Act-O-CH₂-、アミノメチル、Prot-N(R^H)-CH₂-、Act-N(R^H)-CH₂-、カルボキシメチル、スルホノメチルの中から選択され、ここで、Protは、-OH、-SHおよび-NH(R^H)のそれぞれの保護基であり、Actは、-OH、-SHおよび-NH(R^H)のそれぞれの活性化基であり、R^Hは、水素およびC_{1~6}-アルキルから選択される。

【0042】

ヒドロキシ置換基の保護基は、置換トリチルを含むもの、例えば、4,4'-ジメトキシトリチルオキシ(DMT)、4-モノメトキシトリチルオキシ(MMT)、およびトリチルオキシ、置換されていてもよい9-(9-フェニル)キサンテニルオキシ(pixy1)、置換されていてもよいメトキシテトラヒドロ-ピラニルオキシ(mthp)、シリルオキシ(トリメチルシリルオキシ(TMS)、トリイソプロピルシリルオキシ(TIPs)、tert-ブチルジメチルシリルオキシ(TBDMS)、トリエチルシリルオキシ、およびフェニルジメチルシリルオキシなど)、tert-ブチルエーテル、アセタール(例えば、2つのヒドロキシ基)、アシルオキシ(アセチルまたはハロゲン置換アセチルなど)である。

【0043】

「Act」は、-OH、-SHおよび-NH(R^H)のそれぞれの活性化基を示す。かかる活性化基は、例えば、置換されていてもよいO-ホスホルアミダイト、置換されていてもよいO-ホスホルトリエステル、置換されていてもよいO-ホスホルジエステル、置換されていてもよいH-ホスホネート、および置換されていてもよいO-ホスホネートから選択される。

【0044】

Bは、天然または非天然の核酸塩基を構成しており、アデニン、シトシン、5-メチルシトシン、イソシトシン、ブソイドイソシトシン、グアニン、チミン、ウラシル、5-ブロモウラシル、5-プロピニルウラシル、5-プロピニル-6-フルオロ(fluoro1)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、

10

20

30

40

50

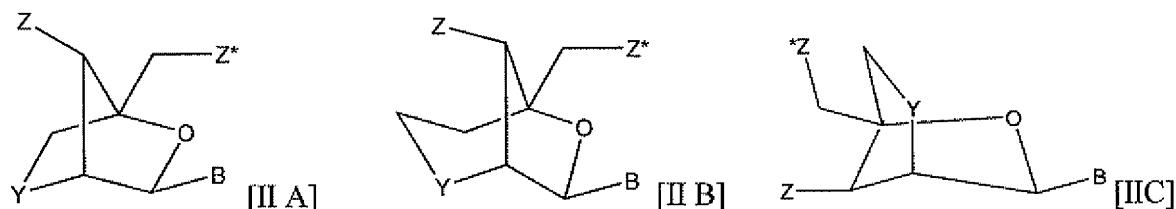
イノシン、ジアミノプリン、7-プロピン-7-デアザアデニン、7-プロピン-7-デアザグアニン、および2-クロロ-6-アミノプリンの中から選択される。

【0045】

好ましくは、本発明の一本鎖RNA*i*分子に使用されるロックド核酸(LNA)は、式I I :

【0046】

【化2】



のいずれかによるLNA構造を含むものであり、式中、Yは、-O-、-S-、-NH-、またはN(R^H)であり；ZおよびZ*は、独立して、ヌクレオチド間結合、末端基または保護基の中から選択され；Bは、天然または非天然の核酸塩基を構成している。このような例示的なLNAモノマーおよび他のもの、ならびにその調製は、国際公開第99/14226号パンフレットおよび後続出願、国際公開第00/56746号パンフレット、同第00/56748号パンフレット、同第00/66604号パンフレット、同第00/125248号パンフレット、同第02/28875号パンフレット、同第2002/094250号パンフレット、および同第2003/006475号パンフレットに記載されており；これらすべての開示は引用により本明細書に組み込まれる。

【0047】

用語「ユニバーサル塩基」は、当該技術分野で一般に認められたその意味を示す。該用語は、一般的に、標準DNA/RNAの各塩基とほとんど区別なく塩基対を形成し、細胞内酵素によって認識されるヌクレオチド塩基類似体をいう。例えば、Loakesら, 1997, J. Mol. Bio. 270: 426-435を参照のこと。ユニバーサル塩基の非限定的な例としては、C-フェニル、C-ナフチルおよび他の芳香族の誘導体、イノシン、アゾールカルボザミド(carbozamide)、ならびにニトロアゾール誘導体(3'-ニトロピロール、4-ニトロインドール、5-ニトロインドール、および6-ニトロインドールなど)が挙げられ、当該技術分野で知られている。例えば、Loakes, 2001, Nucleic Acids Res. 29: 2437を参照のこと。

【0048】

本明細書で用いる場合、語句「RNA干渉」(また、本明細書では「RNA*i*」とも称する)は、当該技術分野で一般に認められたその意味を示す。該用語は、一般的に、細胞内の遺伝子発現を阻害、低減または下方調節する生物学的プロセスであって、低分子干渉核酸分子(例えば、siRNA、miRNA、shRNA)によって媒介されるものをいう。例えば、ZamoreおよびHaley, 2005, Science 309: 1519-1524; VaughnおよびMartenssen, 2005, Science 309: 1525-1526; Zamoreら, 2000, Cell 101: 25-33; Bass, 2001, Nature 411: 428-429; Elbashirら, 2001, Nature 411: 494-498;ならびにKreutzerら, PCT国際公開第00/44895号パンフレット; Zernicka-Goetzら, PCT国際公開第01/36646号パンフレット; Fire, PCT国際公開第99/32619号パンフレット; Plaetinckら, PCT国際公開第00/01846号パンフレット; MelilloおよびFire, PCT国際公開第01/29058号パンフレット; Deschamps-Depaillotte, PCT国際公開第99/07409号パンフレット; およびLiら, PCT国際公開第00/44914号パンフレット; Allshire, 2002, Science 297: 1818-1819;

20

30

40

50

Volpela, 2002, *Science* 297: 1833 - 1837; Jenuwein, 2002, *Science* 297: 2215 - 2218; ならびに Hallら, 2002, *Science* 297: 2232 - 2237; HutzvagnerおよびZamore, 2002, *Science* 297: 2056 - 60; McManusら, 2002, *RNA* 8: 842 - 850; Reinhartら, 2002, *Gene & Dev.* 16: 1616 - 1626; および Reinhart & Bartel, 2002, *Science* 297: 1831)を参照のこと。さらに、用語「RNA干渉」(または「RNAi」)は、配列特異的RNA干渉を示すために用いている他の用語、例えば、転写後遺伝子サイレンシング、翻訳阻害、転写阻害、または後成学などと等価であることを意図する。例えば、本発明の一本鎖RNA分子は、転写後レベルまたは転写前レベルのいずれかで、後成的遺伝子サイレンシングを行うために使用され得る。非限定的な例において、本発明の一本鎖RNA分子による遺伝子発現の後成的モジュレーションは、遺伝子発現を改変するためのクロマチン構造またはメチル化パターンの改良によりもたらされるものであり得る(例えば、Verdelら, 2004, *Science* 303: 672 - 676; Pal-Bhadraら, 2004, *Science* 303: 669 - 672; Alshire, 2002, *Science* 297: 1818 - 1819; Volpela, 2002, *Science* 297: 1833 - 1837; Jenuwein, 2002, *Science* 297: 2215 - 2218; および Hallら, 2002, *Science* 297: 2232 - 2237を参照のこと)。別の非限定的な例では、本発明の一本鎖RNA分子による遺伝子発現のモジュレーションは、RISCもしくは翻訳阻害によるRNA(コードRNAもしくは非コードRNAのいずれか)の切断によりもたらされるものであり得るか(当該技術分野で知られている)、または該モジュレーションは、転写阻害によりもたらされるものであり得る(例えば、Janowskiら, 2005, *Nature Chemical Biology* 1: 216 - 222を参照のこと)。

【0049】

用語「阻害する」、「下方調節する」、「低減させる」または「ノックダウンする」は、本明細書で用いる場合、当該技術分野で一般に認められたその意味を示す。本発明の例示的な一本鎖RNAi分子に関しては、該用語は、一般的に、(i) 遺伝子もしくは標的配列の発現および/または1種類以上のタンパク質もしくはタンパク質サブユニットをコードしているRNA分子のレベルの低減、および/または(ii) 1種類以上のタンパク質もしくはタンパク質サブユニットの活性が、本発明の一本鎖RNAi分子の非存在下で観察される活性より下まで低減されることをいう。また、下方調節は、転写後サイレンシング(RNAi媒介性切断など、またはDNAのメチル化パターンもしくはDNAのクロマチン構造の改変により)と関連していてもよい。RNAi剤での阻害、下方調節、低減またはノックダウンは、不活性な分子、弱毒化分子、スクランブル配列を有するRNAi剤、またはミスマッチを有するRNAi剤に関するものであってもよい。語句「遺伝子サイレンシング」は、細胞内の内在性標的遺伝子の標的化阻害による一部または完全な機能喪失をいう。したがって、該用語は、標的遺伝子の発現のRNAi、「ノックダウン」、「阻害」、「下方調節」または「低減」と互換的に使用される。

【0050】

阻害の程度を調べるためにには、試験試料(例えば、標的遺伝子(1つもしくは複数)または標的配列(1つもしくは複数)を発現している対象生物体由来の生物学的試料、または標的遺伝子/配列を発現している培養状態の細胞の試料を、標的遺伝子または配列の発現をサイレンシング、低減または阻害するRNAi分子と接触させ得る。試験試料における標的遺伝子/配列の発現を、RNAi分子と接触させていない対照試料(例えば、標的遺伝子/配列を発現している対象生物体由来の生物学的試料、または標的遺伝子/配列を発現している培養状態の細胞の試料)における標的遺伝子/配列の発現と比較する。対照試料(すなわち、標的遺伝子/配列が発現されている試料)に100%の値を割り付ける。対照試料に対する試験試料の値が約95%、90%、85%、80%、75%、70%

、 65%、 60%、 55%、 50%、 45%、 40%、 35%、 30%、 25%、 20% または 10% である場合、 標的遺伝子 / 配列の発現のサイレンシング、 阻害または低減がなされている。 好適なアッセイとしては、 例えば、 当業者に知られた手法、 例えば、 ドットプロット、 ノザンプロット、 インサイチュハイブリダイゼーション、 E L I S A、 マイクロアレイハイブリダイゼーション、 免疫沈降、 酵素機能、 当業者に知られたならびに表現型分類アッセイを用いたタンパク質レベルまたは m R N A レベルの検査が挙げられる。

【 0051 】

語句「改善された R N A i 活性」は、 一般的に、 インピトロおよび / またはインピボで測定された R N A i 活性の増大をいい、 ここで、 R N A i 活性は、 R N A i 剤が R N A i を媒介する能力および R N A i 剤の安定性のいずれかまたは両方の反映である。

10

【 0052 】

用語「モジュレートする」は、 本明細書で用いる場合、 当該技術分野で一般に認められたその意味を示す。 該用語は、 一般的に、 遺伝子の発現、 または 1 種類以上の R N A 分子（コードもしくは非コード）のレベル、 あるいは 1 種類以上の R N A 分子またはタンパク質もしくはタンパク質サブユニットの活性を、 該発現、 レベルまたは活性が、 モジュレーションをもたらす分子の非存在下で観察されるものよりも大きくなる、 または小さくなるように上方調節または下方調節する場合をいう。 例えば、 用語「モジュレートする」は、 一部の実施形態では、 例えば遺伝子発現の阻害を指すものであり得、 他の実施形態では、 その増強または上方調節を指すものであり得る。

【 0053 】

20

用語「 R N A i 剤」または「 R N A i 分子」は、 R N A 干渉（「 R N A i 」）または遺伝子サイレンシングを配列特異的様式で媒介することにより遺伝子発現またはウイルス複製を阻害または下方調節し得る任意の核酸分子をいう。 R N A i 剤は、 自己相補性のセンス（パッセンジャー）鎖とアンチセンス（ガイド）鎖を含む二本鎖核酸分子であり得、 この場合、 アンチセンス鎖は、 標的核酸分子またはその一部分のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むものであり、 センス鎖は、 標的核酸配列またはその一部分に対応するヌクレオチド配列を含むものである。 R N A i 剤は一本鎖ポリヌクレオチドであってもよい。 理論に拘束されることを望まないが、 R N A i 剤は、 いくつかの機構（例えば、 標的 m R N A の転写後切断、 または転写前もしくは翻訳前機構）のうちの 1 つ以上によって作用するものであり得る。

30

【 0054 】

用語「一本鎖 R N A i 」または「 s s R N A i 」剤または分子は、 標的核酸分子またはその一部分内のヌクレオチド配列に一部、 実質的に、 または完璧に相補的なヌクレオチド配列を有する一本鎖の核酸由来分子である R N A i 剤である。 一本鎖 R N A i 剤が塩基対を形成する対象の第 2 のヌクレオチド配列は存在しない。 該一本鎖 R N A i 分子は、 さらに、 終末端の一方または両方に存在する末端リン酸基（5' リン酸基または 5' , 3' 二リン酸基など）を含むものであってもよい。 s s R N A i 分子 / 剤は、 m i R N A または m i R N A 模倣物を含むものであってもよい。 本発明の一本鎖 R N A i 剤は、 R I S C 内に負荷されるか、 あるいは R I S C と結合し、 R N A i 機構による遺伝子サイレンシングに関与する。 本発明の一本鎖 R N A i 分子は、 置換、 化学修飾ヌクレオチド、 および非ヌクレオチドを含むものであってもよい。 本発明の一本鎖 R N A i 分子は、 1 つ以上のリボヌクレオチドを含むもの、 またはすべてリボヌクレオチドで構成されたものであってもよい。 本発明の一部の特定の実施形態は、 主鎖、 糖鎖、 塩基またはヌクレオシドに置換または修飾を含む一本鎖 R N A i 分子を含む。

40

【 0055 】

用語「 m i R N A 」または「 m i c r o R N A 」は、 本明細書において、 当該技術分野における通常の意味に従って用いており、 多種多様な真核生物（例えば、 哺乳動物）において発現され、 R N A 系遺伝子調節に関与している低分子の非タンパク質コード R N A 分子をいう。 充分にプロセッシングされた成熟 m i R N A は約 15 ~ 約 30 ヌクレオチド長である。 代表的な一連の既知の内在性 m i R N A 種は、 公衆に利用可能な m i R B a s e

50

配列データベースに示されており、Griffith-Jonesら、Nucleic Acids Research, 2004, 32:D109-D111およびGriffith-Jonesら、Nucleic Acids Research, 2006, 34:D140-D144に記載されており、ワールドワイドウェブにおいてWellcome Trust Sanger Instituteのウェブサイトでアクセス可能である。miRBase配列データベースにおいて公衆に利用可能な充分にプロセッシングされた成熟miRNAは各々、引用により本明細書に組み込まれる。また、代表的な一連のmiRNAを本明細書の表1(後述)に示す。各成熟miRNAは、該miRNAの標的である1種類以上のメッセンジャーRNA(mRNA)分子に一部相補的であり、それにより、標的と関連している遺伝子の発現が調節される。

10

【0056】

用語「miRNA模倣物」は、本明細書で用いる場合、細胞内の天然に存在するmiRNAの模倣物である一本鎖RNA分子をいう。miRNA模倣物は、典型的には、対応内在性miRNAを基にして設計される。miRNA模倣物は、天然に存在する対応miRNAによっても調節される標的mRNAの発現をモジュレートし得るものである。miRNA模倣物でもある本発明の一本鎖RN Ai分子は、RISC内に負荷されるか、あるいはRISCと結合し、RN Ai機構による遺伝子サイレンシングに関与する。本発明のmiRNA模倣物は、置換、化学修飾ヌクレオチド、および非ヌクレオチドを含むものであってもよい。本発明のmiRNA模倣物は1つ以上のリボヌクレオチドを含むものであってもよく、すべてリボヌクレオチドで構成されたものであってもよい。本発明の一部の特定の実施形態は、主鎖、糖鎖、塩基またはヌクレオシドに置換または修飾を含むmiRNA模倣物を含む。細胞内の天然に存在するmiRNAを本明細書において、「対応miRNA」、「内在性miRNA」または「天然に存在するmiRNA」と称する。また、細胞に提供される本発明の一本鎖miRNA模倣物は、天然に存在する対応miRNAによっても標的化される1種類以上の標的mRNAを標的化するものであると理解されたい。細胞に導入された本発明のmiRNA模倣物は、適切な条件下で天然に存在するmiRNAとしての機能を果たし得るものであることが想定される。

20

【0057】

本明細書で用いる場合、用語「シード領域」(また、本明細書において「シード配列」とも称する)は、当該技術分野で一般に認められたその意味を示す。該用語は、一般的に、天然に存在する成熟miRNAの5'末端のヌクレオチド位置1~10の範囲内の少なくとも6個の連続するヌクレオチド、例えば、本出願の出願日現在において公衆に利用可能なmiRBase配列データベース(<http://www.mirbase.org/>)に示されたものから選択されるもの、および/または表1に示したものから選択されるものをいう。表1の配列において、1位~8位のシード配列のヌクレオチドを大文字で示す。天然に存在するmiRNAでは、典型的には、シード領域により、miRNAが結合して遺伝子調節がもたらされ得る標的mRNA配列が決定される。したがって、数多くの天然に存在するmiRNAは、シード領域を共有しているか、またはシード領域において実質的な相同性を共有したものであり得、このようなmiRNAは、同じmiRNAファミリーの構成員である。

30

【0058】

用語「siRNA」(また、「低分子干渉RNA」または「低分子干渉RNA」)は、当該技術分野で認められたその通常の意味で示しており、一般的に、相補的なRNAオリゴヌクレオチドの二本鎖(センス鎖とアンチセンス鎖)をいい、約1~約4個のヌクレオチドの3'突出端を含むものであっても含まないものであってもよく、RNA干渉を媒介するものである。

40

【0059】

用語「siRNA模倣物」または「一本鎖siRNA模倣物」は、本明細書で用いる場合、対応siRNA(一本鎖または二本鎖のいずれか)のガイド鎖またはアンチセンス鎖の模倣物である一本鎖RN Ai分子をいう。siRNA模倣物は、対応siRNAによつ

50

ても調節される標的RNAの発現をモジュレートし得るものであり、したがって、RISC内に負荷されるか、あるいはRISCと結合し、RNAi機構による遺伝子サイレンシングに関与する。本発明の一本鎖siRNA模倣物は、置換、化学修飾ヌクレオチド、および非ヌクレオチドを含むものであってもよい。本発明のsiRNA模倣物は、1つ以上のリボヌクレオチドを含むものであってもよく、すべてリボヌクレオチドで構成されたものであってもよい。本発明の一部の特定の実施形態は、主鎖、糖鎖、塩基またはヌクレオシドに置換または修飾を含むsiRNA模倣物を含む。

【0060】

用語「遺伝子」は、本明細書で用いる場合、特に、RNAi剤の「標的遺伝子」との関連において、当該技術分野で一般に認められた意味を示す。該用語は、一般的に、ポリペプチドの生成に必要な一部分の長さまたは全長のコード配列を含む核酸（例えば、DNAまたはRNA）配列をいう。また、標的遺伝子は、その核酸配列のUTR（すなわち、非翻訳領域）または非コード領域を含むものであってもよい。また、遺伝子または標的遺伝子は、機能性RNA（fRNA）または非コードRNA（ncRNA）、例えば、小分子一本鎖（small temporal）RNA（stRNA）、マイクロRNA（miRNA）、核内低分子RNA（snRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）、小核小体RNA（snRNA）、リボソームRNA（rRNA）、トランスクアーナ（tRNA）およびその前駆体RNAをコードするものであってもよい。かかる非コードRNAは、機能性または調節性の細胞プロセスに関与しているfRNAまたはncRNAの活性のモジュレーションにおけるRNA干渉の標的核酸分子のとしての機能を果たすものであり得る。したがって、疾患をもたらす異常なfRNAまたはncRNAの活性は、本発明のRNAi剤によってモジュレートされ得る。また、fRNAおよびncRNAを標的化するRNAi剤は、遺伝子（genetic）インプリンティング、転写、翻訳、または核酸プロセッシング（例えば、アミノ基転移、メチル化など）などの細胞プロセスに介在することにより、被検体、生物体または細胞の遺伝子型または表現型を操作または改変するために使用され得る。標的遺伝子は、細胞に由来する遺伝子、内在性遺伝子、導入遺伝子、または外来性遺伝子（感染後の細胞内に存在する病原体（例えば、ウイルス）の遺伝子など）であり得る。標的遺伝子を含む細胞は、任意の生物体、例えば、植物、動物、原生動物、ウイルス、細菌または真菌に由来するもの、またはこれらに含まれているものであり得る。植物の非限定的な例としては、单子葉植物、双子葉植物、または裸子植物が挙げられる。動物の非限定的な例としては、脊椎動物または無脊椎動物が挙げられる。真菌の非限定的な例としては、カビまたは酵母が挙げられる。概説については、例えば、SnyderおよびGerstein, 2003, Science, 300; 258-260を参照のこと。

【0061】

語句「標的部位」、「標的配列」および「標的領域」は、本明細書で用いる場合、当該技術分野で一般に認められた意味を示す。該用語は、一般的に、例えば、標的配列に一部、実質的に、または完璧に相補的なそのガイド/アンチセンス領域内の配列を含むRNAi分子によって媒介される切断のために「標的化される」標的核酸分子（例えば、mRNA）内の配列をいう。本発明の一本鎖RNAi分子「標的部位」は、該一本鎖RNAi剤に一部、実質的に、または完璧に相補的な核酸配列をいう。標的部位は、標的RNAのコード領域内に存在していても、または非コード（すなわち、非翻訳）領域内に存在してもよい。標的部位は、一本鎖RNAi分子が模倣物である対応の内在性miRNAの標的部位であってもよく、その場合、「標的部位」は、「miRNA標的部位」または「対応miRNA標的部位」と称されることもあり得る。

【0062】

語句「センス領域」は、本明細書で用いる場合、当該技術分野で一般に認められたその意味を示す。該用語は、一般的に、該RNAi分子のアンチセンス領域に対して相補性を有するRNAi分子のヌクレオチド配列をいう。また、RNAi分子のセンス領域は、標的核酸配列と相同性または配列同一性を有する核酸配列を含むものであってもよい。RN

10

20

30

40

50

A_i分子のセンス領域はセンス鎖またはパッセンジャー鎖とも称される。

【0063】

語句「アンチセンス領域」は、本明細書で用いる場合、当該技術分野で一般に認められたその意味を示す。該用語は、一般的に、標的核酸配列に対して相補性を有するRNA_i分子のヌクレオチド配列をいう。また、RNA_i分子のアンチセンス領域は、該RNA_i分子のセンス領域に対して相補性を有する核酸配列を含むものであってもよい。RNA_i分子のアンチセンス領域はアンチセンス鎖またはガイド鎖とも称される。

【0064】

本明細書で用いる場合、用語「スペーサー」は、いずれかの2つのヌクレオチドおよび/または非ヌクレオチド代替部分を連結することができる任意の化学基をいう。本明細書で用いる場合、「スペーサー」は、2つのヌクレオチドおよび/または非ヌクレオチド代替部分を従来のホスホジエステル結合または非ホスホジエステル接続部によって接続することができるものである。スペーサーは、典型的には、各ヌクレオチドまたは非ヌクレオチド代替部に共有結合によって結合されており、主鎖（すなわち、相補的ハイブリッドを形成している核酸塩基）を形成しているヌクレオチド間結合以外である有機存在体である。

10

【0065】

本明細書で用いる場合、用語「アルキル」は、指定された数の炭素原子を有する脂肪族飽和炭化水素基（分枝鎖および直鎖のどちらも）を包含することを意図する。また、用語「アルキル」は、非芳香族シクロアルキル基も指す。好ましくは、アルキル基は、1~20個の炭素を有するもの（すなわち、C₁~C₂₀）である。例えば、「C₁~C₁₀アルキル」の場合のようなC₁~C₁₀は、線状、分枝または環状（すなわち、シクロアルキル）の配置で1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の炭素を有する基が包含されることを規定している。用語「シクロアルキル」は、指定された数の炭素原子を有する単環式の脂肪族飽和炭化水素基を意味する。例えば、「アルキル」としては、具体的には、メチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、n-ブチル、t-ブチル、i-ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシルなど、ならびにシクロアルキル、例えば、シクロプロピル、メチル-シクロプロピル、2,2-ジメチル-シクロブチル、2-エチル-シクロペンチル、シクロヘキシルなどが挙げられる。アルキル基は、指示されれば置換されていてもよい。

20

【0066】

本明細書で用いる場合、用語「アルケニル」は、2個以上の炭素原子と少なくとも1つの炭素間二重結合を含む直鎖または分枝鎖の非芳香族炭化水素原子団基をいう。また、用語「アルケニル」は、非芳香族シクロアルケニル基も指す。好ましくは、アルケニル基は1~20個の炭素を有するもの（すなわち、C₁~C₂₀）である。アルケニル基としては、例えば、エテニル、プロペニル、ブテニルおよびシクロヘキセニルが挙げられる。アルケニル基は二重結合を含むものあり得、指示されれば置換されていてもよい。

30

【0067】

本明細書で用いる場合、用語「アルキニル」は、2個以上の炭素原子と少なくとも1つの炭素間三重結合を含む直鎖または分枝鎖の非芳香族炭化水素原子団基をいう。また、用語「アルキニル」は非芳香族シクロアルキニル基も指す。3つまでの炭素-炭素三重結合が存在してもよい。好ましくは、アルキニル基は1~20個の炭素を有するもの（すなわち、C₁~C₂₀）である。アルキニル基としては、例えば、エチニル、プロピニル、ブチニルおよびシクロオクチニル（octynyl）が挙げられる。アルキニル基は三重結合を含むものあり得、指示されれば置換されていてもよい。

40

【0068】

用語「脂肪族」は、化学基に関して本明細書で用いる場合、炭素と水素で構成され、芳香族環を含まない有機基をいう。脂肪族構造は環状および/または飽和型であり得る。炭素原子は、連接されて直鎖、分枝鎖または非芳香族環に一体化され得る。また、炭素原子は、単結合（アルカン）、二重結合（アルケン）または三重結合（アルキン）によって連

50

接されていてもよい。水素の他に、他の元素が炭素鎖に結合されていてもよく、該鎖内の炭素の代わりに置き換えられていてもよく、最も一般的なものは酸素、窒素、イオウおよび塩素である。

【0069】

用語「芳香族」は、化学基に関して本明細書で用いる場合、共有結合によって結合された一連の原子を含む有機基をいい、以下の具体的な特徴：(1) 非局在化共役系、最も一般的には、単結合と二重結合が交互に存在する配置；(2) すべての寄与原子が同じ平面上にあるコプラナー構造；(3) 寄与原子が1個以上の環内に配置；ならびに(4) いくつかの非局在化電子（偶数であるが、4の倍数でない）を有するものである。芳香族構造は、炭化水素だけで構成されたもの（例えば、アリール）であってもよい。他の元素が芳香族構造の炭素に結合されていてもよく、該炭素の代わりに置き換えられていてもよく、最も一般的なものは酸素、窒素、イオウおよび塩素である（例えば、ヘテロアリール、置換アリール、置換ヘテロアリール）。

【0070】

用語「置換されている」は、脂肪族または芳香族の有機構造（例えば、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール）に関して用いる場合、炭素鎖に結合されたさらなる化学部分および／または官能基の存在をいう。例えば、置換型炭化水素鎖としては、ヘテロ原子（例えば、N、OまたはS）が結合された炭化水素鎖が挙げられ得る。また、置換型炭化水素鎖としては、ヘテロ原子で分断された炭化水素鎖も挙げられ得る。置換されている場合、置換基は、好ましくは、ヒドロキシル、ハロゲン、シアノ、C₁～C₄アルコキシ、=O、=S、NO₂、SH、NH₂、またはNR₁R₂（式中、R₁およびR₂は、独立して、HまたはC₁～C₄アルキルである）である。置換型アルキルとしては、エチレンオキシドのオリゴマーまたはポリマー（例えば限定されないが、ポリエチレングリコール（「PEG」））が挙げられる。

【0071】

用語「非ヌクレオチド」または「非核酸」は、ヌクレオチドでない任意の化学的分子、部分、基または化合物をいう。

【0072】

本明細書で用いる場合、用語「代替非ヌクレオチド部分」（または「非ヌクレオチド代替部分」）は、本発明の一本鎖RNAi分子内の1個以上のヌクレオチドの代わりに置き換えられ得る化学部分をいう。代替非ヌクレオチド部分は、典型的には、非従来型塩基対形成を可能にする（すなわち、従来の水素結合を形成しない）ものである。一部の特定の実施形態において、本開示の代替非ヌクレオチド部分は、細胞内RNAi機構の1種類以上の成分、例えば、PAZドメイン、PIWIドメインおよび／またはRISCと結合している他のアルゴノートタンパク質ドメインなどと結合あるいは相互作用し得るものである。

【0073】

用語「合成の」は、本明細書の一部の特定の実施形態において、細胞内で天然に生成されるものでない核酸分子をいう。本発明の一本鎖RNAi分子は、典型的には合成のものである。

【0074】

一部の特定の実施形態において、本発明の一本鎖RNAi分子は単離されたものであってもよい。用語「単離された」は、オリゴヌクレオチドに関して本明細書で用いる場合、一般的に、自然界に見られる同一配列の任意の核酸分子と異なる物理形態で存在する核酸分子をいう。「単離された」は、核酸がその天然環境から物理的に取り出されたものであることを必要としない（が、禁じるものでない）。例えば、核酸は、自然界に見られないヌクレオチドおよび／またはヌクレオシド間結合を含んでいる場合、「単離された」ものということができる。核酸は、自然界に見られない純度で存在する場合（このとき、純度は、他の配列の核酸の存在に関して、タンパク質の存在に関して、脂質の存在に関して、もしくは生体細胞の任意の他の成分の存在に関して調整され得る）、または核酸に、生物

10

20

30

40

50

体のゲノムにおいて別の場所では同一の配列にランクインしている配列がない場合、または核酸が自然界に存在するものと同一でない配列を有する場合、「単離された」ものということができる。本発明の一本鎖RNAi分子は、インビトロで合成されたものであるため単離されたものであり得る。しかしながら、単離された核酸は、その後、一緒に混合またはプールされることは理解されよう。

【0075】

本明細書で用いる場合、「内在性」は、当該技術分野で一般に認められたその意味を示す。該用語は、一般的に、生物体、細胞、組織または系に由来する、またはその内部で生成された任意の物質をいう。本明細書で用いる場合、「内在性m_iRNA」は、細胞、組織、生物体、例えば哺乳動物（例えば、ヒトなど）に天然に存在するm_iRNAである。
「外来性」は、一般的に、生物体、細胞、組織または系の外部から導入された、または該外部で生成された任意の物質をいう。

10

【0076】

用語「発現」は、本明細書で用いる場合、当該技術分野で一般に認められたその意味を示す。該用語は、一般的に、そのプロモーターによって駆動される特定のヌクレオチド配列の転写および/または翻訳と定義される。

【0077】

一部の実施形態において、細胞が特定のm_iRNAを内因的に発現するかどうか、またはかかる発現が特定の条件下で、もしくは特定の疾患状態である場合に影響を受けるかどうかがわることは有用であり得る。したがって、本発明の一部の実施形態では、該方法は、細胞または細胞を含む試料を、1種類以上のマーカー遺伝子もしくはmRNAまたは対象遺伝子の発現レベルを示す他の被検物の存在についてアッセイすることを含むものである。そのため、一部の実施形態では、方法は、試料のRNAプロフィールを作成する工程を含むものである。用語「RNAプロフィール」または「遺伝子発現プロフィール」は、試料中の1種類以上の遺伝子または遺伝子マーカーの発現パターンに関するデータセットをいう（例えば、1種類以上のマーカーが同定される複数種の核酸プローブ）。

20

【0078】

「~し得る」により、RNAi活性を適当なインビオまたはインビトロでのアッセイまたは方法によって測定したとき、本発明の一本鎖RNAi分子が、標的配列に対して、内部非ヌクレオチドスペーサー部分がない対応一本鎖RNAi分子によって得られるノックダウン効果と比べて少なくとも5%以上のノックダウン効果を示すことを意図する。好ましくは、本発明の一本鎖RNAi分子は、同じ標的に対して、対応するRNAi分子（例えば、天然に存在するm_iRNAまたはこれまでに同定されたs_iRNAガイド鎖）よりも25%以上、35%以上、50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、99%以上、またはさらに100%以上（すなわち、同等またはより効力のあるRNAi活性）の標的ノックダウンを達成し得るものである。

30

【0079】

「ベクター」は、別の核酸セグメントが作動可能に挿入されて該挿入セグメント複製または発現がもたらされ得るようにされたプラスミド、ファージミド、コスミド、バキュロウイルス、バクミド、細菌人工染色体（BAC）、酵母人工染色体（YAC）、ならびに他の細菌系、酵母系またはウイルス系ベクターなどのレプリコンである。「発現ベクター」は、発現対象のヌクレオチド配列に作動可能に連結された発現制御配列を含むベクターをいう。発現ベクターは、充分なシス作用発現エレメントを含むものであり；他の発現エレメントは、宿主細胞によって、またはインビトロ発現系内で補給され得る。発現ベクターとしては、当該技術分野で知られたすべてのもの、例えば、コスミド、プラスミド（例えば、裸のものまたはリポソームに内包されたもの）、ならびにウイルス（例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス）が挙げられる。

40

【0080】

50

用語「組成物」または「製剤」は、本明細書で用いる場合、当該技術分野で一般に認められたその意味を示す。これらの用語は、一般的に、細胞または被検体（例えば、ヒトなど）への投与（例えば、全身投与または局所投与）に適した形態の、例えば、薬学的に許容され得る担体または希釈剤との組成物または製剤をいう。好適な形態は、一部において、用途または進入経路（例えば、経口、経皮、吸入もしくは注射）に依存する。かかる形態は、該組成物または製剤が標的細胞（すなわち、負電荷を有する核酸が送達に望ましい細胞）に到達するのを妨げないものであるのがよい。例えば、血流中に注射される組成物は、可溶性であるのがよい。他の要素は、当該技術分野で知られており、毒性および該組成物または製剤の奏功を妨げる形態などの考慮事項が挙げられる。本明細書で用いる場合、医薬製剤は、ヒト使用および獣医学的使用のための製剤を包含する。本発明の核酸分子との製剤化に適した薬剤の非限定的な例としては：脂質ナノ粒子（例えば、Sempelら, 2010, Nat Biotechnol. 28 (2) : 172-6. 参照）；P-糖タンパク質阻害薬（Pluronnic P85など）；生分解性ポリマー、例えば、徐放送達のためのポリ（DL-ラクチド-コグリコリド）ミクロスフィア（Emerich, DFら, 1999, Cell Transplant 8 : 47-58）；および負荷ナノ粒子（ポリブチルシアノアクリレートで作製されたものなど）が挙げられる。本発明の核酸分子の送達ストラテジーの他の非限定的な例としては、としては、Boadoら, 1998, J. Pharm. Sci. 87 : 1308-1315；Tylerら, 1999, FEBS Lett. 421 : 280-284；Pardridgeら, 1995, PNAS USA. 92 : 5592-5596；Boado, 1995, Adv. Drug Delivery Rev., 15 : 73-107；Aldrian-Herradaら, 1998, Nucleic Acids Res. 26 : 4910-4916；およびTylerら, 1999, PNAS 96 : 7053-7058に記載された物質が挙げられる。「薬学的に許容され得る組成物」または「薬学的に許容され得る製剤」は、その所望の活性に最も適した身体位置への本発明の核酸分子の有効な分布を可能にする組成物または製剤をいうものであり得る。
10

【0081】

用語「患者」、「被検体」、「個体」などは、本明細書において互換的に用いており、本明細書に記載の方法に適した（amendable）任意の動物またはその細胞もしくは組織（インビトロであれインサイチュであれ）をいう。該用語は、典型的には、本開示の一本鎖RNA分子のドナーまたはレシピエントである生物体をいう。一部の特定の非限定的な実施形態では、患者、被検体または個体は哺乳動物または哺乳動物細胞である。他の非限定的な実施形態では、患者、被検体または個体はヒトまたはヒト細胞である。
30

【0082】

本明細書で用いる場合、用語「治療有効量」は、投与対象の被検体（例えば、哺乳動物またはヒト）において疾患症状の重症度の低減、無疾患症状期間の頻度もしくは持続期間の増大、または疾患による機能障害もしくは能力障害の抑制がもたらされるのに充分な本発明の開示の一本鎖RNAi分子の量を意味する。当業者は、かかる治療有効量を、被検体の体格、症状の重症度、および具体的な組成物または選択される投与経路などの要素に基づいて決定することができよう。例えば、治療有効量の本発明の一本鎖RNAi分子は単独で、併用で、もしくは他の薬物とともに治療有効量で被検体に使用もしくは投与され得るか、または特定の細胞に処置に適した条件下で、例えば、腫瘍サイズを低減させるため、あるいは被検体の特定の障害と関連している症状を改善するために投与することにより使用もしくは投与され得る。
40

【0083】

用語「治療（の）」は、本明細書で用いる場合、処置および/または予防を意味する。治療効果は、疾患状態の抑制、寛解または根絶によって得られる。用語「処置」は、本明細書で用いる場合、疾患または障害の治療的処置ならびに予防的もしくは抑制的措置を包含することを意図する。したがって、例えば、用語「処置」は、疾患または障害の発生前または後での薬剤を投与し、それにより該疾患または障害のすべての徴候を予防または除
50

去することを含む。別の例として、疾患の臨床徵候後に該疾患の症状に対処するための薬剤の投与もまた用語「処置」に含まれる。

【0084】

用語「非経口」は、本明細書で用いる場合、当該技術分野で一般に認められたその意味を示す。該用語は、一般的に、消化管経由以外の様式で分子、薬物、薬剤または化合物を投与する方法または手法をいい、皮膚上、皮下、血管内（例えば、静脈内）、筋肉内、または髄腔内注射または注入手法などが挙げられる。

【0085】

語句「全身投与」は、本明細書で用いる場合、当該技術分野で一般に認められたその意味を示す。該用語は、一般的に、全身へ分布する前の血流中の薬物のインビボでの全身性の吸収または蓄積をいう。

10

【0086】

本発明の他の目的、特徴および利点は、以下の詳細説明から自明となろう。しかしながら、詳細説明および具体的な実施例は、本発明の具体的な実施形態を示したものであるが、詳細説明から当業者には本発明の精神および範囲内において種々の変更および改良が自明となるため、一例として示したものにすぎないことを理解されたい。

【0087】

B. 本発明の一本鎖RNAi分子

本開示により、少なくとも1つの内部非ヌクレオチドスペーサーを含む一本鎖RNA分子であって、該スペーサーにより該分子の2つのヌクレオチド部分が連結されて一体になっている一本鎖RNA分子を提供する。したがって、本発明の一本鎖RNA分子は連結したヌクレオチド鎖ではなく、1つ以上の非ヌクレオチドスペーサーによって分断された1つより多くのヌクレオチド部分を含むものであり、該ヌクレオチド部分は1個以上のヌクレオチド、非ヌクレオチド代替部分またはその組合せを含むものである。本発明の一本鎖RNA分子は、RNA干渉機構によって遺伝子発現を阻害し得るガイド鎖またはアンチセンス鎖としての機能を果たし、したがってRNAi剤である。本発明の一本鎖RNAi分子は、細胞内の1つ以上のRNA標的部位に一部、実質的に、または完璧に相補的な配列を含むものである。

20

【0088】

本発明の一本鎖RNAi分子は、(a)2つ以上のヌクレオチド部分に分断された核酸部分、および(b)少なくとも1つの非ヌクレオチドスペーサー部分を含む内部（「末端」と対照的）スペーサー部分を含む一本鎖オリゴヌクレオチド構造を有し、非ヌクレオチドスペーサー部分により、2個のヌクレオチド（各々は該分子内の相違するヌクレオチド部分である）が共有結合によって連結されている。本発明の一本鎖RNAi分子のヌクレオチド部分は、非ヌクレオチドスペーサー部分によって分断されており、ここで、各ヌクレオチド部分は少なくとも1個のヌクレオチドを含むものである。

30

【0089】

本発明の各実施形態において、一本鎖RNAi分子の核酸部分は少なくとも2つのヌクレオチド部分、第1のヌクレオチド部分(N1)（例えば、5'-ヌクレオチド部分）と第2のヌクレオチド部分(N2)（例えば、3'-ヌクレオチド部分）を含むものである。本発明の一本鎖RNAi分子の核酸部分は、2つより多くのヌクレオチド部分（例えば、第3のヌクレオチド部分(N3)、第4のヌクレオチド部分(N4)など）を含むものであってもよい。本発明のRNAi分子の各ヌクレオチド部分において、ヌクレオチド部分および/または非ヌクレオチド部分は、ホスホジエステル結合および/または非ホスホジエステル接続部によって接続されている。重要なことに、本発明の一本鎖RNAi分子のヌクレオチド部分は互いに相補的でなく、したがって、前記部分は有意な塩基対形成を形成しない。

40

【0090】

本発明の各実施形態において、一本鎖RNAi分子の内部スペーサー部分は、少なくとも1つの非ヌクレオチドスペーサー部分(S1)（本明細書において第1の非ヌクレオチ

50

ドスペーサー部分と称する)を含む。本発明の一実施形態では、該一本鎖RNAi分子は1つの内部非ヌクレオチドスペーサー部分を含むものである。本発明の一本鎖RNAi分子の内部スペーサー部分は、第1の非ヌクレオチドスペーサー部分より多く(例えば、第2の非ヌクレオチドスペーサー部分(S2)、第3の非ヌクレオチドスペーサー部分(S3)など)を含むものであってもよい。別の実施形態では、該一本鎖RNAi分子は2つの内部非ヌクレオチドスペーサー部分を含むものである。

【0091】

本発明の一本鎖RNAi分子の核酸部分内のヌクレオチド部分の数は、該分子内の非ヌクレオチドスペーサー部分の数に依存し、逆も同様である。例えば、該一本鎖RNAi分子が2つの非ヌクレオチドスペーサー部分を含むものである場合、これは、一般的には、以下のとおり: 5' - (第1のヌクレオチド部分) - (第1の非ヌクレオチドスペーサー部分) - (第2のヌクレオチド部分) - (第2の非ヌクレオチドスペーサー部分) - (第3のヌクレオチド部分) - 3' の3つのヌクレオチド部分を含むものである。本発明の一本鎖RNAi分子の各非ヌクレオチドスペーサー部分は、1つ以上の非ヌクレオチドスペーサーを含むものであってもよい。

【0092】

本発明の一本鎖RNAi分子は一本鎖オリゴヌクレオチド構造を有し、標的RNAに対するRNA干渉を媒介する。本発明の一本鎖RNAi分子は:(a)第1のヌクレオチド部分(N1)と第2のヌクレオチド部分(N2)を含む核酸部分(前記核酸部分は、標的RNA内の標的部位と塩基対形成し得る少なくとも8個のヌクレオチドを含み、該核酸部分内のヌクレオチドの総数は8~26ヌクレオチドである);および(b)第1のヌクレオチド部分と第2のヌクレオチド部分を共有結合によって連結する少なくとも第1の非ヌクレオチドスペーサー部分(S1)を含む内部スペーサー部分を含むものであり得る。第1のヌクレオチド部分と第2のヌクレオチド部分は自己相補的でない。本発明の一本鎖RNAi分子のすべてのヌクレオチド(例えば、8~26個)は、すべて核酸部分内に存在し、該分子のヌクレオチド部分間に分布しており、各ヌクレオチド部分は少なくとも1個のヌクレオチドを含むものである。

【0093】

一実施形態において、本発明の一本鎖RNAi分子は、該オリゴヌクレオチドのヌクレオチド部分間に分布した合計8~26個のヌクレオチドまたは非ヌクレオチド代替部分(例えば、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25または26個のヌクレオチドまたは非ヌクレオチド代替部分)を含む核酸部分を含むものであり、該分子内の該ヌクレオチドのうち少なくとも8個(例えば、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25または26個)が標的RNA内の標的部位と塩基対形成し得る。例えば、本発明の一本鎖RNAi分子は、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25または26個の総数のヌクレオチドを含むものであり得、該ヌクレオチドのうち8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25または26個が標的RNAと塩基対形成する。一実施形態において、本発明の一本鎖RNAi分子の核酸部分は、合計15~21個(例えば、15、16、17、18、19、20または21個)のヌクレオチドを含むものである。別の実施形態では、本発明の一本鎖RNAi分子の核酸部分は、合計18~20個(例えば、18、19または20個)のヌクレオチドを含むものである。さらなる実施形態では、本発明の一本鎖RNAi分子の核酸部分は、合計19個または20個のヌクレオチドを含むものである。

【0094】

本発明の一本鎖RNAi分子のヌクレオチド部分を構成するすべての数のヌクレオチドまたは非ヌクレオチド部分またはその組合せは、該分子の該部分間に任意の数の様式で分布している。一例として、非ヌクレオチドスペーサー部分を1つだけと2つのヌクレオチド部分(すなわち、第1のヌクレオチド部分と第2のヌクレオチド部分)を含む一本鎖R

10

20

30

40

50

N A i 分子は、合計 12 個のヌクレオチドを有するものであり得る。該分子の第 1 のヌクレオチド部分が 1 個のヌクレオチド（例えば、該分子の 5' 末端に）を含むものである場合、該分子の第 2 のヌクレオチド部分は 11 個の連続したヌクレオチドを含むものである。あるいはまた、該分子の第 1 のヌクレオチド部分が 5 個の連続したヌクレオチドを含むものである場合、該分子の第 2 のヌクレオチド部分は 7 個の連続したヌクレオチドを含むものである。各例において分子内のヌクレオチドの総数は 12 である。本発明の一本鎖 R N A i 分子のヌクレオチド部分内のヌクレオチドは互いに相補的でなく、したがって、前記部分は実質的な塩基対形成を形成することができない。該分子の各ヌクレオチド部分において、ヌクレオチド部分および / または非ヌクレオチド部分は、ホスホジエステル結合および / または非ホスホジエステル接続部によって接続されている。

10

【 0095 】

本発明の一本鎖 R N A i 分子の核酸部分内の少なくとも 8 個のヌクレオチドが、標的 R N A 内の標的配列と塩基対形成し得る。したがって、本発明の一本鎖 R N A i 分子は、R N A 標的部位（例えば、天然に存在する R N A 標的部位）に一部、実質的に、または完璧に相補的な連続ヌクレオチドの配列を含むものである。一実施形態において、本発明の一本鎖 R N A i 分子の核酸部分内の連続したヌクレオチドのすべてが標的 R N A 内の標的配列と塩基対形成する（すなわち、完璧に相補的）。別の実施形態では、本発明の一本鎖 R N A i 分子の核酸部分内の連続したヌクレオチドの少なくとも 50 % が標的 R N A 内の標的配列と塩基対形成する（すなわち、実質的に相補的）。別の実施形態では、本発明の一本鎖 R N A i 分子の核酸部分内の 8、9、10、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25 または 26 個のヌクレオチドが標的 R N A 内の標的配列と塩基対形成する。

20

【 0096 】

一実施形態において、本発明の一本鎖 R N A i 分子は：（a）2 つのヌクレオチド部分、第 1 のヌクレオチド部分（N 1）と第 2 のヌクレオチド部分（N 2）；および（b）1 つの内部非ヌクレオチドスペーサー部分（S 1）を含む一本鎖オリゴヌクレオチド構造を有し；該オリゴヌクレオチドは、合計 8 ~ 26 個のヌクレオチドまたは非ヌクレオチド代替部分（例えば、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25 または 26 個のヌクレオチドまたは非ヌクレオチド代替部分）を含み；該分子のヌクレオチドのうち少なくとも 8 個が標的 R N A 内の標的部位と塩基対形成し得る。この実施形態の一本鎖 R N A i 分子の 2 つのヌクレオチド部分は、合計で 8 ~ 26 個（例えば、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25 または 26 個）のヌクレオチドまたは非ヌクレオチド部分またはその組合せを含み、これらは、該 2 つのヌクレオチド部分間に任意の数の様式で分布している（上記のとおり）。一実施形態において、非ヌクレオチドスペーサー部分は 1 つの非ヌクレオチドスペーサーを含むものである。別の実施形態では、非ヌクレオチドスペーサー部分は、1 つより多くの非ヌクレオチドスペーサー（例えば、2、3、4 つ、またはそれ以上）を含むものである。該スペーサー部分により、該一本鎖 R N A i 分子の第 1 のヌクレオチド部分と第 2 のヌクレオチド部分が連結されている。したがって、該スペーサー部分は、該分子の第 1 のヌクレオチド部分の 3' 末端ヌクレオチドまたは非ヌクレオチド代替部分と、該分子の第 2 のヌクレオチド部分の 5' 末端ヌクレオチドまたは非ヌクレオチド代替部分の両方に共有結合によって連結されている。該分子のスペーサー部分は、該ヌクレオチド部分のリン酸主鎖に（すなわち、連結された 2 個のヌクレオチドの遊離リン酸基を介して）、従来のホスホジエステル結合または非ホスホジエステル接続部のいずれかによって共有結合によって接続されていてもよい。

30

【 0097 】

一実施形態において、本発明の一本鎖 R N A i 分子は、天然に存在する m i R N A のガイド鎖に一部、実質的に、または完璧に相同な連続ヌクレオチドの配列を含むものであり、したがって、m i R N A 模倣物としての機能を果たす。別の実施形態では、本発明の一本鎖 R N A i 分子は、一本鎖 s i R N A または二本鎖 s i R N A のガイド / アンチセンス

40

50

鎖のいずれかに一部、実質的に、または完璧に相同な連続ヌクレオチドの配列を含むものであり、したがって siRNA 模倣物としての機能を果たす。一本鎖 siRNA または二本鎖 siRNA は、RNAi 機構によって遺伝子発現を阻害することが知られているものであり得る。

【0098】

本発明の一本鎖 RNAi 分子が天然に存在する miRNA の類似体である場合、この天然に存在する miRNA を本明細書において「対応 miRNA」と称し、該一本鎖 RNAi 分子は対応 miRNA の模倣物である。本発明の一本鎖 miRNA 模倣物は天然に存在する対応 miRNA を基にして設計され、このとき、少なくとも 1 つの非ヌクレオチドスペーサー部分は、miRNA ガイド鎖配列の 2 個のヌクレオチド間に挿入されるか、または miRNA ガイド鎖配列の 1 個以上のヌクレオチドと置換されるかのいずれかである。10 本発明の一本鎖 miRNA 模倣物は、miRBase データベース内の公衆に利用可能な、および / または表 1 (後述) (配列番号: 1 ~ 1090) に含まれた成熟 miRNA 配列の類似体であってもよい。

【0099】

一実施形態において、本明細書に記載の一本鎖 RNAi 分子は miRNA 模倣物であり、該 RNAi 分子は、2 つ以上のヌクレオチド部分と、少なくとも 1 つの非ヌクレオチドスペーサー部分を含む内部スペーサー部分との核酸部分を含むものである。上記のように、該分子の核酸部分が 2 つのヌクレオチド部分 (すなわち、第 1 のヌクレオチド部分と第 2 のヌクレオチド部分) のみを含むものである場合、非ヌクレオチドスペーサー部分は 1 つだけ存在する。該分子の核酸部分が 3 つのヌクレオチド部分を含むものである場合、2 つの非ヌクレオチドスペーサー部分が存在する。各非ヌクレオチドスペーサー部分は、1 つより多くの非ヌクレオチドスペーサーを含んでいてもよい (例えば、2、3、4 個またはそれ以上)。一実施形態において、本発明の miRNA 模倣物の核酸部分は、8 ~ 26 個 (例えば、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25 または 26 個) のヌクレオチドまたは非ヌクレオチド部分またはその組合せからなり、該ヌクレオチドの少なくとも 8 個が、天然に存在する miRNA 標的部位と塩基対形成し得る。本発明の miRNA 模倣物の核酸部分内の連続ヌクレオチドの配列は、天然に存在する miRNA ガイド鎖のヌクレオチド配列に一部、実質的に、または完璧に相同である。一実施形態において、本発明の一本鎖 RNAi 分子の核酸部分内の連続ヌクレオチドの配列は、天然に存在する miRNA のシード配列の全部または一部と同一 (または完璧に相同) である 5 ~ 8 個 (すなわち、5、6、7 または 8 個) の連続したヌクレオチドを含むものである。例えば、一実施形態において、該一本鎖 RNAi 分子のヌクレオチド部分内の連続する 8 個のヌクレオチドの配列が、天然に存在する miRNA のシード領域の全部または一部と同一である (表 I (後述) 参照)。2030

【0100】

一実施形態において、本発明の miRNA 模倣物は非ヌクレオチドスペーサー部分と 2 つのヌクレオチド部分を有し、非ヌクレオチドスペーサー部分は、天然に存在する対応 miRNA 配列の 2 個のヌクレオチド間に挿入されており、天然に存在する完全長の miRNA を 2 つの相違するヌクレオチド部分に分断している。別の実施形態では、本発明の miRNA 模倣物内に 1 つより多くの非ヌクレオチドスペーサー部分が存在し、該 miRNA 模倣物の核酸部分が 2 つより多くのヌクレオチド部分に分断されるようになっている。かかる場合では、miRNA 模倣物のヌクレオチド配列全体が、天然に存在する対応 miRNA ヌクレオチド配列に完璧に相同である。天然に存在する miRNA とこの実施形態の miRNA 模倣物との違いは、非ヌクレオチドスペーサー部分の存在である。40

【0101】

別の実施形態では、本発明の miRNA 模倣物は、天然に存在する miRNA ガイド鎖配列の 1 個以上のヌクレオチドの代わりに置き換えられた非ヌクレオチドスペーサー部分を含むものである。例えば、まず、1 個以上のヌクレオチドを天然に存在する miRNA ガイド鎖配列から欠失させて該配列内にギャップをもたらすと、少なくとも 2 つの相違す50

るヌクレオチド部分が作製され得る。次いで、このギャップ内に非ヌクレオチドスペーサー部分を挿入し、該相違するヌクレオチド部分を共有結合によって連結させる。したがって、一実施形態では、本発明の一本鎖RNAi分子は、天然に存在する対応m_iRNA配列（配列番号：1～1090参照）の1～12個（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12個）のヌクレオチドが1つ以上の内部非ヌクレオチドスペーサー部分に置き換えられたm_iRNA模倣物である。m_iRNA模倣物は、1つより多くの非ヌクレオチドスペーサー部分を含むものであってもよい。一実施形態において、本発明の一本鎖m_iRNA模倣物は、天然に存在するm_iRNAヌクレオチド配列の1～4個（例えば、1、2、3または4個）のヌクレオチドの代わりに少なくとも1つの非ヌクレオチドスペーサー部分を含むものである。別の実施形態では、本発明の一本鎖m_iRNA模倣物は、対応m_iRNAヌクレオチド配列の1個または2個のヌクレオチドの代わりに少なくとも1つの内部非ヌクレオチドスペーサー部分を含むものである。非ヌクレオチドスペーサー部分は、m_iRNAガイド鎖配列から1個以上のヌクレオチドを除去することによってもたらされるギャップを橋絡し、従来のホスホジエステル結合または非ホスホジエステル接続部のいずれかによって該分子のヌクレオチド部分のリン酸主鎖に接続される。
10

【0102】

また、本発明の一本鎖RNAi分子は、二本鎖または一本鎖のsiRNAのガイド鎖またはアンチセンス鎖の類似体であってもよい。二本鎖または一本鎖のsiRNAは、RNAi機構によって、標的遺伝子の発現を阻害するか、または標的遺伝子の発現を阻害する潜在能を有することが知られているものであり得る。かかるシナリオにおいて、siRNAの対応物、具体的にはsiRNAのガイド鎖（一本鎖であれ二本鎖であれ）を本明細書において「対応siRNA」または「対応siRNAガイド鎖」と称し、該一本鎖RNAi分子は、対応siRNAガイド鎖の模倣物（すなわち、「一本鎖siRNA模倣物」）である。一本鎖siRNA模倣物は、対応siRNAのヌクレオチド配列を基にして、1つ以上の内部非ヌクレオチドスペーサー部分を対応siRNAのヌクレオチド配列ヌクレオチド配列内に挿入すること、または対応siRNAヌクレオチド配列の1個以上のヌクレオチドを1つ以上の非ヌクレオチドスペーサー部分で置き換えることのいずれかによって設計される。
20

【0103】

一実施形態において、本発明の一本鎖RNAi分子はsiRNA模倣物であり、該一本鎖RNAi分子の核酸部分は2つ以上のヌクレオチド部分を含むものであり、内部スペーサー部分は少なくとも1つの非ヌクレオチドスペーサー部分を含むものである。上記のように、該RNAi分子の核酸部分が2つのヌクレオチド部分（すなわち、第1のヌクレオチド部分と第2のヌクレオチド部分）のみを含むものである場合、非ヌクレオチドスペーサー部分は1つだけ存在する。該RNAi分子の核酸部分が3つのヌクレオチド部分を含むものである場合、2つの非ヌクレオチドスペーサー部分が存在する。非ヌクレオチドスペーサー部分は、1つより多くの非ヌクレオチドスペーサーを含むものであってもよい（例えば、2、3、4個またはそれ以上）。一実施形態において、siRNA模倣物の核酸部分は8～26個（例えば、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25または26個）のヌクレオチドまたは非ヌクレオチド部分またはその組合せからなり、該ヌクレオチドの少なくとも8個がRNA標的部位と塩基対形成し得る。本発明のsiRNA模倣物の核酸部分は、対応siRNAガイド鎖のヌクレオチド配列に一部、実質的に、または完璧に相同的な連続ヌクレオチドの配列を含むものである。
40

【0104】

一実施形態において、本発明のsiRNA模倣物は、非ヌクレオチドスペーサー部分と2つのヌクレオチド部分を有し、非ヌクレオチドスペーサー部分は、対応siRNAヌクレオチド配列の2個の隣接ヌクレオチド間に挿入されており、対応siRNAヌクレオチド配列を2つの相違するヌクレオチド部分に分断している。別の実施形態では、本発明の
50

s i RNA 模倣物は、対応 s i RNA のヌクレオチド配列が 2 つより多くのヌクレオチド部分に分断されるように 1 つより多くの非ヌクレオチドスペーサー部分を有するものであり得る。かかる場合では、s i RNA 模倣物のヌクレオチド配列全体が対応 s i RNA 又クレオチド配列に完璧に相同である。対応 s i RNA とこの実施形態の s i RNA 模倣物との違いは、非ヌクレオチドスペーサー領域の存在である。

【 0105 】

別の実施形態では、本発明の s i RNA 模倣物は、対応 s i RNA ガイド鎖のヌクレオチド配列の 1 個以上のヌクレオチドの代わりに置き換えられた 1 つ以上の非ヌクレオチドスペーサー部分を含むものである。例えば、まず、1 個以上のヌクレオチドを対応 s i RNA ヌクレオチド配列から欠失させて該配列内にギャップをもたらすと、少なくとも 2 つの相違するヌクレオチド部分が作製され得る。次いで、このギャップ内に非ヌクレオチドスペーサー部分を挿入し、該相違するヌクレオチド部分を連結させる。したがって、一実施形態において、本発明の一本鎖 RNA i 分子は、少なくとも 1 つの内部非ヌクレオチドスペーサー部分を含む s i RNA 模倣物であって、対応 s i RNA ヌクレオチド配列の 1 ~ 4 個（例えば、1、2、3 または 4 個）のヌクレオチドが前記非ヌクレオチドスペーサー部分に置き換えられた s i RNA 模倣物である。s i RNA 模倣物は、1 つより多くの非ヌクレオチドスペーサー部分を含むものであってもよい。別の実施形態では、本発明の一本鎖 RNA i 分子は、少なくとも 1 つの内部非ヌクレオチドスペーサー部分を含む s i RNA 模倣物であって、対応 s i RNA ヌクレオチド配列の 1 個または 2 個のヌクレオチドが前記非ヌクレオチドスペーサー部分に置き換えられた s i RNA 模倣物である。非ヌクレオチドスペーサー部分は、s i RNA ガイド鎖配列から 1 個以上のヌクレオチドを除去することによってもたらされるギャップを橋絡し、従来のホスホジエステル結合または非ホスホジエステル接続部のいずれかによって該分子のヌクレオチド部分のリン酸主鎖に接続される。

【 0106 】

別の実施形態では、本発明の一本鎖 RNA i 分子は、特定の RNA 標的（例えば、天然に存在する RNA 標的）の発現をノックダウンする目的でデノボ設計され得る。このシナリオでは、まず標的遺伝子を選択する。次いで、当業者は、遺伝子サイレンシングのために一本鎖 RNA i 分子で標的化する一般的に約 8 ~ 約 26 ヌクレオチド長の前記遺伝子の一部分（すなわち、標的部位）を特定する。本発明の一実施形態において、本明細書に記載の一本鎖 RNA i 分子の核酸部分内の連続ヌクレオチドの配列は、特定された標的部位の配列に一部、実質的に、または完璧に相補的であり、標的部位の対応配列の相補鎖に一部、実質的に、または完璧に相同である。このシナリオにおける一本鎖 RNA i 分子の対応物の配列（すなわち、標的部位の配列の相補鎖であるヌクレオチド配列）を本明細書において「標的部位の対応配列の相補鎖」と称する。該一本鎖 RNA i 分子は、上記の 1 つ以上の実施形態に記載のような 2 つ以上のヌクレオチド部分と少なくとも 1 つの内部非ヌクレオチドスペーサー部分を含むものである。

【 0107 】

本発明の一本鎖 RNA i 分子は、RNA 干渉成果をもたらし得るものである。本発明の一本鎖 m i RNA 模倣物の場合、該分子は、天然に存在する対応 m i RNA によっても調節される標的 m RNA の発現をモジュレートし得るものである。

【 0108 】

本開示の一本鎖 RNA i 分子は、さらに、終末端の一方または両方に存在する末端リン酸基（5' リン酸基または 5' , 3' ニリン酸基など）を含むものであってもよい。一部の実施形態において、本発明の一本鎖 RNA i 分子は、置換、化学修飾ヌクレオチド、および非ヌクレオチドを含むものであってもよい。一部の特定の他の実施形態では、本発明の一本鎖 RNA i 分子は、1 つ以上のリボヌクレオチドを含むもの、またはすべてリボヌクレオチドで構成されたものであってもよい。本発明の一部の特定の実施形態は、主鎖、糖鎖、塩基またはヌクレオシドに置換または修飾を含む一本鎖 RNA i 分子を含む。

【 0109 】

10

20

30

40

50

本開示の一本鎖RNAi分子の内部非ヌクレオチドスペーサー部分により、特に、得られるRNAi分子内のヌクレオチドの総数が一本鎖RNAi分子が類似体である対応RNAi剤（例えば、天然に存在するmiRNA；遺伝子ノックダウン能を有するsiRNAのガイド鎖）と比べて少なくなる状況において、該一本鎖RNAi分子のエンドヌクレアーゼに対する感受性が低減される。また、内部非ヌクレオチドスペーサー部分により、エクソヌクレアーゼによる損傷も制限され得、最終的に、一本鎖RNAi剤の完全性の保持が補助され得る。また、該スペーサー部分は、1つ以上の対象部分をRNAi分子（例えば、細胞内送達を助長する化学部分）に接続するための容易に到達可能な領域である。したがって、本開示の一本鎖RNAi分子の活性が、該スペーサー部分のない対応一本鎖RNAi分子（例えば、天然に存在するmiRNA；遺伝子ノックダウン能を有する事前に特定されたsiRNAのガイド鎖）と比べていくぶん低い場合であっても（例えば、約20%未満または30%未満またはさらに40%未満）、該類似体の全体活性は、該分子の改善された安定性または送達により、その対応物よりも大きくなり得る。さらに、合成收率は、通常、短いRNA鎖の方が高いため、本発明の一本鎖RNAi分子を使用すると、治療適用に関連する大規模合成のコストも相当低減され得る。

【0110】

一実施形態において、本発明の一本鎖RNAi分子は、

式I I I :

5' N1 - S1 - N2 3'

で表される、または示されるものであり得、

式中、N1は、第1のヌクレオチド部分を表し、1個のヌクレオチドまたは連続ヌクレオチド鎖のいずれかからなり；S1は、非ヌクレオチドスペーサー部分を表し、1つ以上の非ヌクレオチドスペーサーからなり；N2は、第2のヌクレオチド部分を表し、1個のヌクレオチドまたは連続ヌクレオチド鎖のいずれかからなる。N1とN2内のヌクレオチドの総数は、8～26個（例えば、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25または26個）のヌクレオチドであり、該分子の少なくとも8個のヌクレオチドが標的RNA内の標的部位と塩基対形成し得る。N1とN2内の「ヌクレオチド（1個または複数）」は、ヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体もしくは非ヌクレオチド代替部分のいずれか、またはその組合せである。一実施形態において、個々に、N1およびN2は1～25個のヌクレオチドからなるものであり得、ここで、N1とN2の和は8～26個（例えば、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25または26個）のヌクレオチドである。N1とN2は自己相補的でなく、したがって、互いの実質的な塩基対形成に関与し得ない。該分子の連続ヌクレオチド鎖において、ヌクレオチドは、ホスホジエステル結合および/または非ホスホジエステル接続部によって接続されている。スペーサー部分（S1）は、共有結合によって、該分子の第1のヌクレオチド部分（N1）の3'末端ヌクレオチドと第2のヌクレオチド部分（N2）の5'末端ヌクレオチドに結合されている。例えば、該スペーサー部分は、隣接ヌクレオチドの遊離リン酸基にホスホジエステル結合によって結合された1つ以上のホスホルアミダイトスペーサーを含むものであってもよい。該分子のスペーサー部分（S1）は、単一の非ヌクレオチドスペーサーからなるものであってもよく、連結されて一体になった1つより多くの非ヌクレオチドスペーサーからなるものであってもよい。該分子のS1部分内に1つより多くの非ヌクレオチドスペーサーが存在する場合、スペーサーは同じである（すなわち、同じ構造を有する）か、または異なっている（すなわち、異なる構造を有する）かのいずれかであり得る。2つの非ヌクレオチドスペーサーが該分子のS1部分内で連結されている場合、各スペーサーは、共有結合によって、それぞれ該分子のN1部分とN2部分内の1個のヌクレオチドに結合されている。3つの非ヌクレオチドスペーサーが該オリゴヌクレオチドのS1部分内で連続的に連結されている場合、内部（第2の）スペーサーは、該分子のN1部分またはN2部分のどちらとも共有結合を形成しない。その代わり、該内部スペーサーは、共有結合によって第1および第3のスペーサーに結合され、こ

10

20

30

40

50

これらを連結して一体にする。

【0111】

別の実施形態では、本発明の一本鎖RNAi分子は、式IV：

5' - N1 - S1 - N2 - S2 - N3 3'

で表される、または示されるものあり得、

式中、N1は、第1のヌクレオチド部分を表し、1個のヌクレオチドまたは連続ヌクレオチド鎖のいずれかからなり；S1は、第1の非ヌクレオチドスペーサー部分を表し、1つ以上の非ヌクレオチドスペーサーからなり；N2は、第2のヌクレオチド部分を表し、1個のヌクレオチドまたは連続ヌクレオチド鎖のいずれかからなり；S2は、第2の非ヌクレオチド内部スペーサー部分を表し、1つ以上の非ヌクレオチドスペーサーからなり；N3は、第3のヌクレオチド部分を表し、1個のヌクレオチドまたは連続ヌクレオチド鎖のいずれかからなる。一実施形態において、N1、N2およびN3内のヌクレオチドの総数は8～約26個（例えば、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25または26個）のヌクレオチドであり、該分子の少なくとも8個のヌクレオチドが標的RNA内の標的部位と塩基対形成し得る。N1、N2およびN3内の「ヌクレオチド（1個または複数）」は、ヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体もしくは非ヌクレオチド代替部分のいずれか、またはその組合せである。一実施形態において、個々に、該ヌクレオチド部分（N1、N2、N3）は1～24個のヌクレオチドからなるものあり得、ここで、該分子内のヌクレオチドの合計は8～26個のヌクレオチドである。該RNAi分子のヌクレオチド部分は自己相補的でなく、したがって、互いとの実質的な塩基対形成に関与し得ない。各連続ヌクレオチド鎖において、ヌクレオチドは、ホスホジエステル結合および/または非ホスホジエステル接続部によって接続されている。該スペーサー部分は、共有結合によって該分子のヌクレオチド部分の末端ヌクレオチドに結合されている。一実施形態において、該スペーサー部分は、隣接ヌクレオチドの遊離リン酸基にホスホジエステル結合によって結合された1つ以上のホスホルアミダイトスペーサーを含むものである。該分子の各スペーサー部分は、単一の非ヌクレオチドスペーサーからなるものであってもよく、連結されて一体になった1つより多くの非ヌクレオチドスペーサーからなるものであってもよい。該分子のスペーサー部分内に1つより多くの非ヌクレオチドスペーサーが存在する場合、スペーサーは同じである（すなわち、同じ構造を有する）か、または異なっている（すなわち、異なる構造を有する）かのいずれかあり得る。2つの非ヌクレオチドスペーサーが該分子のスペーサー部分内で連結されている場合、各スペーサーは、共有結合によって、該分子の隣接ヌクレオチド部分内の末端ヌクレオチドに結合されている。3つの非ヌクレオチドスペーサーが該分子のスペーサー部分内で連続的に連結されている場合、内部（第2の）スペーサーは該分子のヌクレオチド部分と共有結合を形成しない。その代わり、該内部スペーサーは、共有結合によって第1および第3のスペーサーに結合され、これらを連結して一体にする。

【0112】

本発明の一態様において、本明細書に記載の一本鎖RNAi分子の少なくとも1つのヌクレオチド部分（例えば、式IIIIおよび/またはIVに示したN1、N2またはN3）は、1～20個（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19もしくは20個）のヌクレオチド、5～20個（例えば、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19もしくは20個）のヌクレオチド、10～20個（例えば、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19もしくは20個）のヌクレオチド、13～20個（例えば、13、14、15、16、17、18、19もしくは20個）のヌクレオチド、5～15個（例えば、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14もしくは15個）のヌクレオチド、または1～14個（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13もしくは14個）のヌクレオチドのいずれかからなる連続ヌクレオチド鎖である。別の態様では、本発明の一本鎖RNAi分子の少なくとも1つ

のヌクレオチド部分の長さは、連続 1 8 ヌクレオチド、連続 1 9 ヌクレオチドまたは連続 2 0 ヌクレオチドからなる群より選択される。なおさらなる態様では、本発明の一本鎖 R N A i 分子の少なくとも 1 つのヌクレオチド部分の長さは、連続 1 3 ヌクレオチド、連続 1 4 ヌクレオチドまたは連続 1 5 ヌクレオチドからなる群より選択される。本発明の一本鎖 R N A i 分子の少なくとも 1 つのヌクレオチド部分の長さは 1 8 ヌクレオチドであり得る。本発明の一本鎖 R N A i 分子の少なくとも 1 つのヌクレオチド部分の長さは 1 9 ヌクレオチドであり得る。本発明の一本鎖 R N A i 分子の少なくとも 1 つのヌクレオチド部分の長さは 2 0 ヌクレオチドであり得る。本発明の一本鎖 R N A i 分子の少なくとも 1 つのヌクレオチド部分の長さは 2 1 ヌクレオチドであり得る。

【 0 1 1 3 】

10

一実施形態において、本発明の一本鎖 R N A i 分子は、N 1 が連続 1 8 ヌクレオチドからなり；S 1 が非ヌクレオチドスペーサーからなり；N 2 が 2 個の連続したヌクレオチドからなる式 I I I で表されるものである。別の実施形態では、本発明の一本鎖 R N A i 分子は、N 1 が連続 1 9 ヌクレオチドからなり；S 1 が非ヌクレオチドスペーサーからなり；N 2 が 1 個のヌクレオチドからなる式 I I I で表されるものである。これらの実施形態において、S 1 は C 3 - または C 6 - アルキルスペーサーであり得る。

【 0 1 1 4 】

本発明の別の態様では、該一本鎖 R N A i 分子のヌクレオチド部分（例えば、式 I I I および / または I V に示した N 1 、 N 2 または N 3 ）は、R N A 標的領域に実質的または完璧に相補的な少なくとも 1 0 個（例えば、1 0 、 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 1 7 、 1 8 、 1 9 、 2 0 個など）のヌクレオチドの配列を含む連続ヌクレオチド鎖である。別の態様では、該一本鎖 R N A i 分子のヌクレオチド部分は、R N A 標的領域に実質的または完璧に相補的な 5 ~ 8 個の連続したヌクレオチドの配列を含むものである。本発明のこの部分において、該分子の前記ヌクレオチド部分は、1 ~ 2 0 個のヌクレオチド、5 ~ 2 0 個のヌクレオチド、1 0 ~ 2 0 個のヌクレオチド、1 3 ~ 2 0 個のヌクレオチド、5 ~ 1 5 個のヌクレオチド、または 1 ~ 1 4 個のヌクレオチドのいずれかからなる連続ヌクレオチド鎖である。別の態様では、前記ヌクレオチド部分は連続 1 8 、 1 9 または 2 0 ヌクレオチド長である。なおさらなる態様では、前記ヌクレオチド部分は連続 1 3 、 1 4 または 1 5 ヌクレオチド長である。別の態様では、前記ヌクレオチド部分の長さは、連続 1 8 ヌクレオチド、連続 1 9 ヌクレオチド、または連続 2 0 ヌクレオチドからなる群より選択される。なおさらなる態様では、前記ヌクレオチド部分の長さは、連続 1 3 ヌクレオチド、連続 1 4 ヌクレオチドまたは連続 1 5 ヌクレオチドからなる群より選択される。前記ヌクレオチド部分の長さは 1 8 ヌクレオチドであり得る。前記ヌクレオチド部分の長さは 1 9 ヌクレオチドであり得る。前記ヌクレオチド部分の長さは 2 0 ヌクレオチドであり得る。前記ヌクレオチド部分の長さは 2 1 ヌクレオチドであり得る。

20

【 0 1 1 5 】

30

一実施形態において、本発明の一本鎖 R N A i 分子のヌクレオチド部分は、天然に存在する m i R N A 配列のシード配列の全部または一部と同一（または完璧に相同）である 5 ~ 8 個（例えば、5 、 6 、 7 または 8 個）の連続したヌクレオチドを含むものである。一実施形態において、天然に存在する m i R N A 配列は表 1 (後述) に示した配列である。例えば、一実施形態において、該一本鎖 R N A i 分子のヌクレオチド部分内の 6 ヌクレオチド配列が、天然に存在する m i R N A 配列（例えば、表 1 から選択される天然に存在する m i R N A 配列）のシード領域の全部または一部と同一である。

40

【 0 1 1 6 】

一実施形態において、本発明の一本鎖 R N A i 分子は式 I I I または式 I V で表される、または示されるものであり得る。式 I I I および I V は、本発明の一本鎖 R N A i 分子の特定の例を代表していることを認識されたい。本発明に包含されるさらなる例としては、限定されないが、3 つより多くのヌクレオチド部分を有する R N A i 分子が挙げられる。

【 0 1 1 7 】

50

本発明の一態様において、該一本鎖RNAi分子の核酸部分内の連続ヌクレオチドの配列は、天然に存在する内在性m_iRNAまたはs_iRNAのガイド鎖に一部、実質的に、または完璧に相同である。本発明の別の態様では、該一本鎖RNAi分子の核酸部分内の連続ヌクレオチドの配列は、RNA標的配列内の標的部位に一部、実質的に、または完璧に相補的である。別の実施形態では、本開示の一本鎖RNAi分子の少なくとも1つのヌクレオチド部分が、天然に存在する内在性m_iRNAのある領域もしくはs_iRNAのガイド鎖に一部、実質的に、または完璧に相同である、および/またはRNA標的配列内の標的部位に一部、実質的に、または完璧に相補的である。

【0118】

本発明の一本鎖RNAi分子の内部スペーサー部分は、少なくとも第1の非ヌクレオチドスペーサー部分を含むものである。前記非ヌクレオチドスペーサー部分は化学基（典型的には、有機存在体）を含み、該化学基は少なくとも2つのヌクレオチドに共有結合によって結合され、かくして該ヌクレオチドを連結している。該2つのヌクレオチドは該分子の相違するヌクレオチド部分に存在している。非ヌクレオチドスペーサー部分の長さは、該分子がRNA標的配列と従来型もしくは非従来型のワトソンクリック塩基対形成を形成する能力および/またはRNAiを媒介する能力に深刻な影響を与えない限り、特に制限はない。非ヌクレオチドスペーサー部分は、従来のホスホジエステル結合または非ホスホジエステル接続部によって2つのヌクレオチドおよび/または非ヌクレオチド代替部分を接続することができる。ヌクレオチドおよび/または非ヌクレオチドをスペーサーに連結する非ホスホジエステル系接続部を含む本発明の一本鎖RNAi分子は、例えば、ペプチド系接続部（例えば、オリゴペプチド核酸（PNA）単位を連結するもの）を含むものである（Boffaら, 2000, Gene Ther. Mol. Biol. 5: 47-53参照）。

【0119】

本明細書に示した、あるいは当該技術分野で知られた種々の非ヌクレオチド部分が、本発明の一本鎖RNAi分子の内部スペーサー部分に含有され得る。本発明の一本鎖RNAi分子の内部スペーサー部分内に含まれる非ヌクレオチドスペーサーとしては、2つのヌクレオチドおよび/または非ヌクレオチド代替部分を従来のホスホジエステル結合または非ホスホジエステル接続部のいずれかによって連結することができる任意の非核酸スペーサーが挙げられ得る。該スペーサーは、典型的には脂肪族または芳香族の有機存在体であり、該オリゴヌクレオチド（すなわち、相補的ハイブリッドを形成している核酸塩基）の主鎖を形成しているヌクレオチド間結合以外である。

【0120】

非ヌクレオチドスペーサーの非限定的な例としては、以下のもの：ポリエーテル、ポリアミン、ポリアミド、ペプチド、糖質、脂質、高分子炭化水素（polyhydrocarbon）、または他の高分子化合物（例えば、ポリエチレングリコール2~100個のエチレングリコール単位を有するものなど）が挙げられる。具体例としては、SeelaおよびKaiser, 1990, Nucleic Acids Res. 18: 6353; SeelaおよびKaiser, 1987, Nucleic Acids Res. 15: 3113; CloadおよびScheパート, 1991, J. Am. Chem. Soc. 113: 6324; RichardsonおよびScheパート, 1991, J. Am. Chem. Soc. 113: 5109; Maら, 1993, Nucleic Acids Res. 27: 2585; Maら, 1993, Biochemistry 32: 1751; Durandら, 1990, Nucleic Acids Res. 18: 6353; McCurdyら, 1991, Nucleosides & Nucleotides 70: 287; Jaschkeら, 1993, Tetrahedron Lett. 34: 301; Onoら, 1991, Biochemistry 30: 9914; などに記載されたものが挙げられる。

【0121】

本発明の一実施形態において、スペーサーは、炭素数1~20（すなわち、C1~C2

10

20

30

40

50

0)、好ましくは炭素数1～12(すなわち、C1～C12)の置換されていてよいアルキル、アルケニルまたはアルキニル鎖である。該炭化水素鎖は、さらなる化学基および/または官能基(例えば、対象の標的分子に特異的に結合する部分)で置換されていてよい。

【0122】

該一本鎖RNAi分子にさらなる官能部を提供する(例えば、対象の標的分子に特異的に結合する、または該分子の細胞内送達を助長/増進する)化学部分は、スペーサーの一部であってもよく、スペーサーに共有結合によって結合または連結されて(例えば、置換されて)いてよい。例えば、さらなる官能基は、RNAi分子化合物が細胞膜を通過して移動するのを補助すること、薬物動態を改変すること、および/または本発明のRNAi分子の局在をモジュレートすることにより、該一本鎖RNAi分子に治療活性を付与するものであり得る。

【0123】

非ヌクレオチドスペーサー自体に組み込まれ得るおよび/または該スペーサーに共有結合によって結合され、本開示によって想定される具体的なコンジュゲート分子の例は、小分子、脂質または脂肪親和性物質、テルペン、リン脂質、抗体、毒素、コレステロール、タンパク質結合剤(例えば、細胞内取込みを助長し得る細胞受容体のリガンド)、ビタミン、負電荷ポリマーおよび他のポリマー、例えば、タンパク質(例えば、ヒト血清アルブミン)、ペプチド、ホルモン、糖質、ポリエチレングリコール、またはポリアミン、ならびに例えば、米国特許公開公報第2005/0196781号および米国特許公開公報第2006/0293271号(これらの開示は引用により本明細書に組み込まれる)に記載されたものである。このような化合物により、血清の存在下または非存在下において、異なる組織に由来するいくつかの細胞型への本発明の一本鎖RNAi分子の送達および/または局在が改善されることが予測される(SullengerおよびCeche, 米国特許第5,854,038号参照)。例えば、コンジュゲート構成員は、ナプロキセン、ニトロインドール(またはスタッキング相互作用に寄与する別のコンジュゲート)、葉酸類、イブプロフェン、またはC5ピリミジンリンカーであり得る。他の実施形態では、コンジュゲート構成員は、グリセリド脂質コンジュゲート(例えば、ジアルキルグリセリド誘導体)、ビタミンEコンジュゲート、またはチオコレステロールである。別の実施形態では、コンジュゲート分子は、該一本鎖RNAi分子にコンジュゲートさせたとき標的細胞内への該分子の送達を助長する機能を果たす、あるいは生物学的試料と接触させたとき該分子の送達、安定性または活性を向上する機能を果たすペプチドである。本開示のこのような態様における使用のための例示的なペプチドコンジュゲート構成員としては、例えば、米国特許出願公開第2006/0040882号および同第2006/0014289号ならびに米国特許仮出願第60/939,578号(これらはすべて、引用により本明細書に組み込まれる)に記載のペプチドPN27、PN28、PN29、PN58、PN61、PN73、PN158、PN159、PN173、PN182、PN202、PN204、PN250、PN361、PN365、PN404、PN453、およびPN509が挙げられる。

【0124】

一実施形態において、非ヌクレオチドスペーサーは、標的分子に特異的に結合する部分を含むものである。標的分子は任意の対象分子であり得る。例えば、標的分子は、タンパク質のリガンド結合ドメインであり得、それにより該タンパク質と天然に存在するリガンドとの相互作用を抑制するか、または該相互作用と競合する。これは非限定的な例であり、当業者には、当該技術分野で一般的に知られた手法を用いて他の実施形態が容易に作製され得ることが認識されよう(例えば、Goldら, 1995, *Ann. Rev. Biomed. Chem.* 64:163; BrodyおよびGold, 2000, *J. Biotechnol.* 74:5; Sun, 2000, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2:100; Kusser, J., 2000, *Biotechnol.* 74:21; HermannおよびPatel, 2000, *Science* 257:820;ならびにJaya

10

20

30

40

50

sena, 1999, Clinical Chem. 45: 1628を参照のこと)。また、本開示の一本鎖RNAi分子の該スペーサー部分は、細胞内送達と関連する特性を向上させるためにRNAi分子に官能性化学基を導入するためにも簡便に使用され得る。

【0125】

一実施形態において、該一本鎖RNAi分子のスペーサー領域によって結合されたコンジュゲート分子または官能性化学部分は、特定の細胞型(肝細胞など)に前記RNAi分子を投与できる能力をもたらすものである。例えば、アシアロ糖タンパク質受容体(ASGPr)(WuおよびWu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429)は肝細胞に特有であり、分枝ガラクトース末端糖タンパク質(アシアロオロソムコイド(ASOR)など)に結合する。かかる糖タンパク質または合成複合糖質の該受容体への結合は、該オリゴ糖鎖の分岐度に強く依存する親和性で起こり、例えば、トリアンテナ型(tri antennary)構造は、ビアンテナ型(bi antennary)またはモノアンテナ型(monooantennary)鎖よりも大きな親和性で結合される(BaenningerおよびFiette, 1980, Cell 22: 611; Connollyら, 1982, J. Biol. Chem. 257: 939)。LeeおよびLee(1987, Glycoconjugate J. 4: 317)により、ガラクトースと比べて該受容体に対する親和性が高いN-アセチル-D-ガラクトサミンを糖質部分として使用することによって、この高特異性が得られた。また、この「クラスタリング効果」は、マンノシル末端糖タンパク質または複合糖質の結合および取込みでも報告されている(Ponpipomら, 1981, J. Med. Chem. 24: 1388)。外来性化合物を細胞膜を通過して輸送するためのガラクトースおよびガラクトサミン系コンジュゲートの使用により、肝臓疾患の処置に対するターゲット送達アプローチが提供され得る。また、バイオコンジュゲートの使用により、処置に必要とされる治療用化合物の必要用量の低減がもたらされ得る。さらに、治療的バイオアベイラビリティ、薬力学、および薬物動態パラメータが、本開示のバイオコンジュゲートの使用によってモジュレートされ得る。

【0126】

本明細書に記載のコンジュゲート分子は該一本鎖RNAi分子に、生分解性の非核酸リンカーによって結合され得る。用語「生分解性リンカー」は、本文脈において用いる場合、ある分子を別の分子に接続するため(例えば、コンジュゲート分子を本発明の一本鎖RNAi分子に接続するため)の生分解性リンカーとして設計される非核酸リンカー分子をいう。生分解性リンカーは、その安定性が特定の目的(特定の組織または細胞型への送達など)のためにモジュレートされ得るように設計される。用語「生分解性の」は、本明細書で用いる場合、生物学的系内での分解(例えば、酵素分解または化学分解)をいう。

【0127】

一実施形態において、本発明の一本鎖RNAi分子は、1つ以上の非ヌクレオチドスペーサー部分を含む内部スペーサー部分を含むものであり、前記1つ以上の非ヌクレオチドスペーサー部分(例えば、式I IIおよびIVにおけるS1またはS2)は、C3、C6、C9、およびC12脂肪族スペーサーからなる群より選択される非ヌクレオチドスペーサーを含むもの、または該非ヌクレオチドスペーサーからなるものである。「C」の後の数字は、コアスペーサー構造(例えば、さらなる化学部分で非置換の場合)内の炭素原子の数を示す。前記スペーサーは、アルキル、アルケニルまたはアルキニル基であり得る。また、前記スペーサーは、該分子のヌクレオチド部分のリン酸主鎖に対する共有結合を助長するためのホスホルアミダイト部分を含むものであってもよい。一実施形態において、スペーサー(S)部分はC3ホスホルアミダイトスペーサーである。別の実施形態では、スペーサーはC6ホスホルアミダイトスペーサーである。さらなる実施形態では、C3、C6、C9またはC12スペーサーは置換されていてもよい(例えば、標的化部分で)。

【0128】

本開示の一本鎖RNAi分子のヌクレオチド部分内のヌクレオチドの1個以上または全部がリボヌクレオチド、修飾リボヌクレオチド、または適当なヌクレオチド類似体であり得る。ヌクレオチド類似体(種々の既知の糖鎖、塩基および主鎖の修飾など)ならびにL

10

20

30

40

50

N A モノマー単位が破壊された鎖に組み込まれることにより、血清安定性が有意に向上し、標的ノックダウンまたは発現調節効果が長期化され得る。本発明の一本鎖 R N A 分子は、機能的に適合され得、種々の化学修飾を種々の程度まで適合性がある。例えば、本発明の一本鎖 R N A 分子のリボヌクレオチドの 5 % ~ 1 0 0 % が修飾されたものであり得る（例えば、本発明の一本鎖 R N A i 分子のリボヌクレオチドの 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 % または 100 % が化学修飾されたものであり得るか、またはヌクレオチド類似体残基で置き換えられるものである）。糖鎖、塩基および / または主鎖に対する機能的に適合性の化学修飾によって付与された改善された特性、あるいは適当なヌクレオチド類似体残基によって付与された改善された特性は、例えば、治療用薬剤としての使用のため、または機能的ゲノムツールとしての、この一本鎖 R N A i 分子のインビオでの適用に特に重要である。

【 0 1 2 9 】

さらなる態様において、本明細書における任意の実施形態による本発明の一本鎖 R N A i 分子は、R N A 標的、例えば内在性 R N A 標的に対する R N A i に関与し得るものである。一実施形態において、内在性 R N A 標的は、天然に存在する m i R N A 標的である。R N A 標的の阻害は、標準的な R N A 特異的干渉機構（例えば、m i R N A 依存性 R N A 干渉）によって行なわれ得る。例えば、m i R N A 標的の阻害は、内在性対応 m i R N A と相互作用する非翻訳 m R N A 領域との相互作用（例えば、塩基対形成、結合など）（これにより、1つ以上の下流遺伝子の翻訳調節が達成される）によるものであり得る。あるいはまた、m i R N A 標的の阻害は、m i R N A 模倣物である本発明の一本鎖 R N A i 分子による m i R N A 標的の結合により非翻訳 m i R N A 標的の切断がもたらされる s i R N A 様干渉機構によって行なわれ得る。また、本発明の一本鎖 R N A i 分子は、本発明の一本鎖 R N A i 分子による m R N A 標的の（むしろ非コード非翻訳領域よりも）配列内のコード領域での結合により m R N A 標的コード配列の切断がもたらされる s i R N A 様干渉機構によって m R N A 標的を阻害するものであり得る。

【 0 1 3 0 】

C . 置換型および / または修飾型一本鎖 R N A i 分子

置換ヌクレオチドおよび修飾ヌクレオチドを本発明の一本鎖 R N A i 分子に導入することにより、外来的に送達される天然 R N A 分子（すなわち、標準ヌクレオチドを有する）に固有のインビオ安定性およびバイオアベイラビリティの潜在的限界を克服するためのツールが提供される。一部の特定の実施形態において、本開示の置換型または修飾型一本鎖 R N A i 分子の使用により、この分子は被検体または生物学的試料中（例えば、血清中）において半減期が増大するように設計されたものであり得るため、低用量で所与の治療効果の達成が可能となり得る。さらに、特定の細胞もしくは組織を標的化することによって、または一本鎖 R N A i 分子の細胞内取込みを改善することによって、一本鎖 R N A i 分子のバイオアベイラビリティを改善するために特定の置換または修飾が使用され得る。したがって、本開示の一本鎖 R N A i 分子の活性が、同じ構造の非修飾型または非置換型 R N A i 分子と比べていくぶん低い場合であっても（例えば、約 20 % 未満または 30 % 未満またはさらに 40 % 未満）、置換型または修飾型 R N A i 分子の全体活性は、該分子の改善された安定性または送達により、その天然対応物よりも大きくなり得る。また、置換型およびまたは修飾型一本鎖 R N A i 分子により、例えばヒトにおいてインターフェロン応答が活性化される可能性が最小限となり得る。

【 0 1 3 1 】

一部の特定の実施形態において、本発明の一本鎖 R N A i 分子は、ヌクレオチド位置の約 5 % ~ 約 9 5 % にリボヌクレオチドを含むものである。例えば、本発明の一本鎖 R N A i 分子のリボヌクレオチドの 1 個 ~ 全部（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26 または 27 個）が修飾されたものであり得る。

【 0 1 3 2 】

10

20

30

40

50

関連する実施形態において、本開示による一本鎖RNAi分子は1個以上の天然または合成の非標準ヌクレオシドを含むものである。関連する実施形態において、非標準ヌクレオシドは、1個以上のデオキシリジン、L-もしくはD-ロックド核酸(LNA)分子(例えば、5-メチルウリジンLNA)もしくは置換LNA(例えば、ピレンを有する)、またはユニバーサル結合ヌクレオチド、またはGクランプ、またはその任意の組合せである。一部の特定の実施形態において、ユニバーサル結合ヌクレオチドは、C-フェニル、C-ナフチル、イノシン、アゾールカルボキサミド、1---D-リボフラノシル-4-ニトロインドール、1---D-リボフラノシル-5-ニトロインドール、1---D-リボフラノシル-6-ニトロインドール、または1---D-リボフラノシル-3-ニトロピロールであり得る。

10

【0133】

本発明の一本鎖RNAi分子に存在し得る置換型または修飾型ヌクレオチドは、天然または標準リボヌクレオチドと類似した特徴を有する修飾型または置換型ヌクレオチドを含むものである。例えば、本開示は、少なくともsiRNA分子に適用した場合にヌクレアーゼ分解に対する抵抗性が付与される可能性があるがRNAiを媒介する能力は維持されることが知られたノザンコンホメーション(例えば、ノザンプソイドロテーションサイクル, Saenger, Springer-Verlag編, 1984参照)を有するヌクレオチドを含む一本鎖RNAi分子を特色とする。ノザン立体配置を有する例示的なヌクレオチドとしては、ロックド核酸(LNA)ヌクレオチド(例えば、2'-O, 4'-C-メチレン-(D)-リボフラノシル)ヌクレオチド)、2'-メトキシエチル(MOE)ヌクレオチド、2'-メチル-チオ-エチル、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-クロロヌクレオチド、2'-アジドヌクレオチド、5'-メチルウリジン、または2'-O-メチルヌクレオチド)が挙げられる。これらの任意の実施形態において、1個以上の置換型または修飾型ヌクレオチドは、Gクランプ(例えば、グアニンに対してさらなる水素結合を形成しているシトシン類似体、例えば、9-(アミノエトキシ)フェノキサジン)であり得る。例えば、LinおよびMatteucci, 1998, J. Am. Chem. Soc. 720: 8531を参照のこと。

20

【0134】

一部の特定の実施形態において、本発明の一本鎖RNAi分子の5'終末端はリン酸化されている。本明細書に記載の一本鎖RNAi分子の任意の実施形態において、該分子は、さらに、5'リン酸基(Martinezら, 2002, Cell 110: 563; Schwarzら, 2002, Mol. Cell 70: 537参照)または5'3'二リン酸基などの末端リン酸基を含むものであってもよい。

30

【0135】

別の態様では、本発明の一本鎖RNAi分子は、1つ以上の5'-および/または3'-キャップ構造を該分子の終末端に含むものである。「キャップ構造」により、オリゴヌクレオチドの末端に組み込まれた化学修飾を意図する(例えば、Matulic-Adamicら, 米国特許第5,998,203号(引用により本明細書に組み込まれる)参照)。このような末端修飾により、特定の核酸分子がエクソヌクレアーゼ分解から保護され得、送達および/または細胞内局在において特定の利点が付与され得る。非限定的な例において: 適当な5'-キャップは、逆位無塩基残基(部分); 4', 5'-メチレンヌクレオチド; 1-(---D-エリトロフラノシル)ヌクレオチド、4'-チオヌクレオチド; 炭素環式ヌクレオチド; 1, 5-アンヒドロヘキシトールヌクレオチド; L-ヌクレオチド; ---ヌクレオチド; 修飾塩基ヌクレオチド; ホスホジチオエート結合; トレオ-ペントフラノシルヌクレオチド; 非環式3', 4'-セコヌクレオチド; 非環式3', 4-ジヒドロキシブチルヌクレオチド; 非環式3, 5-ジヒドロキシペンチルヌクレオチド、3'-3'-逆位ヌクレオチド部分; 3'-3'-逆位無塩基部分; 3'-2'-逆位ヌクレオチド部分; 3'-2'-逆位無塩基部分; 1, 4-ブタンジオールホスフェート; 3'-ホスホルアミデート; ヘキシルホスフェート; アミノヘキシルホスフェート; 3'-リン酸基; 3'-ホスホロチオエート; ホスホロジチオエート; または橋絡もしくは非橋

40

50

絡メチルホスホネート部分を含む群から選択され得る。

【0136】

別の非限定的な例において、適當な3' - キャップは、4' , 5' - メチレンヌクレオチド；1 - (- D - エリトロフラノシリ) ヌクレオチド；4' - チオヌクレオチド、炭素環式ヌクレオチド；5' - アミノ - アルキルホスフェート；1 , 3 - ジアミノ - 2 - プロピルホスフェート；3 - アミノプロピルホスフェート；6 - アミノヘキシルホスフェート；1 , 2 - アミノドデシルホスフェート；ヒドロキシプロピルホスフェート；1 , 5 - アンヒドロヘキシトールヌクレオチド；L - ヌクレオチド； - ヌクレオチド；修飾塩基ヌクレオチド；ホスホロジチオエート；トレオ - ペントフラノシリヌクレオチド；非環式3' , 4' - セコヌクレオチド；3 , 4 - ジヒドロキシプロピルヌクレオチド；3 , 5 - ジヒドロキシペンチルヌクレオチド、5' - 5' - 逆位ヌクレオチド部分；5' - 5' - 逆位無塩基部分；5' - ホスホルアミデート；5' - ホスホロチオエート；1 , 4 - プタンジオールホスフェート；5' - アミノ；橋絡および / または非橋絡5' - ホスホルアミデート、ホスホロチオエートおよび / またはホスホロジチオエート、橋絡または非橋絡メチルホスホネートならびに5' - メルカプト部分を含む群から選択され得る。さらなる詳細については、BeauchageおよびIyer, 1993, *Tetrahedron* 49: 1925 (これは引用により本明細書に組み込まれる) を参照のこと。

【0137】

一部の特定の実施形態において、本開示は、リン酸主鎖の修飾、例えば、1つ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、モルホリノ、アミデート カルバメート、カルボキシメチル、アセトアミデート、ポリアミド、スルホネート、スルホンアミド、スルファメート、ホルムアセタール、チオホルムアセタール、またはアルキルシリル置換などを含む修飾型一本鎖RNAi分子を特色とする。オリゴヌクレオチド主鎖の修飾の概説については、HunzikerおよびLeumann, 1995, *Nucleic Acid Analogues: Synthesis and Properties, in Modern Synthetic Methods*. VCH, 331; Mesmaekerら, 1994, ACS 24-39を参照のこと。

【0138】

さらなる実施形態において、該一本鎖RNAi分子は、1個以上(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25または26個)の2' - 糖鎖置換、例えば、2' - デオキシ、2' - O - 2 - メトキシエチル、2' - O - メトキシエチル、2' - O - メチル、2' - ハロゲン(例えば、2' - フルオロ)、2' - O - アリルなど、またはその任意の組合せを含むものである。なおさらなる実施形態において、該一本鎖RNAi分子は、末端キャップ置換基、例えば、アルキル、無塩基、デオキシ無塩基、グリセリル、ジヌクレオチド、非環式ヌクレオチド、逆位デオキシヌクレオチド部分など、またはその任意の組合せを一方または両方の終末端に含むものである。一部の特定の実施形態において、少なくとも1個の5' 終末端リボヌクレオチドは2' - 糖鎖置換を有する。

【0139】

他の実施形態において、該一本鎖RNAi分子は、1個以上(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25または26個)の置換、例えば、リボシリル、2' - デオキシリボシリル、テトロフラノシリル(例えば、L - - トレオフラノシリル)、ヘキソピラノシリル(例えば、 - アロピラノシリル、 - アルトロピラノシリルおよび - グルコピラノシリル)、ペントピラノシリル(例えば、 - リボピラノシリル、 - リキソピラノシリル、 - キシロピラノシリルおよび - アラビノピラノシリル)、炭素環式類似体、ピラノース、フラノース、モルホリノ、またはその類似体もしくは誘導体の任意の組合せを糖鎖主鎖内に含むものである。

【0140】

10

20

30

40

50

また他の実施形態において、該一本鎖RNAi分子は、少なくとも1個（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25または26個）の修飾ヌクレオシド間結合、例えば、独立して、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチルホスホネート、アルキルホスホネート、3'-アルキレンホスホネート、5'-アルキレンホスホネート、キラルホスホネート、ホスホノアセテート、チオホスホノアセテート、ホスフィネート、ホスホルアミデート、3'-アミノホスホルアミデート、アミノアルキルホスホルアミデート、チオノホスホルアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、セレノホスフェート、ボラノホスフェート結合、またはその任意の組合せを含むものである。

【0141】

該一本鎖RNAi分子は、1つ以上の修飾ヌクレオチド間結合を該分子の3'終末端、5'終末端、または3'末端と5'終末端の両方に含むものであってもよい。一実施形態において、本発明の一本鎖RNAi分子は、3'終末端にホスホロチオエート結合などの修飾ヌクレオチド間を有する。例示的な一本鎖RNAi分子は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むものである。さらなる例示的な一本鎖RNAi分子は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の連続するホスホロチオエートヌクレオチド間結合を、例えば該分子の5'終末端に含むものである。また別の例示的な一本鎖RNAi分子では、1つ以上のピリミジンホスホロチオエートヌクレオチド間結合が存在し得る。さらなる例示的な一本鎖RNAi分子では、1つ以上のプリンホスホロチオエートヌクレオチド間結合が存在し得る。

【0142】

本開示の一本鎖RNAi分子において有用な多くの例示的な修飾ヌクレオチド塩基またはその類似体としては、5'-メチルシトシン；5'-ヒドロキシメチルシトシン；キサンチン；ヒポキサンチン；2'-アミノアデニン；6'-メチル、2'-プロピル、またはアデニンおよびグアニンの他のアルキル誘導体；8'-置換アデニンおよびグアニン（例えば、8'-アザ、8'-ハロ、8'-アミノ、8'-チオール、8'-チオアルキル、8'-ヒドロキシルなど）；7'-メチル、7'-デアザおよび3'-デアザアデニンおよびグアニン；2'-チオウラシル；2'-チオチミン；2'-チオシトシン；5'-メチル、5'-プロピニル、5'-ハロ（例えば、5'-プロモもしくは5'-フルオロ）、5'-トリフルオロメチル、または他の5'-置換ウラシルおよびシトシン；ならびに6'-アゾウラシルが挙げられる。さらなる有用なヌクレオチド塩基は、Kurreck, 2003, Eur. J. Biochem. 270: 1628; Herdewijn, 2000, Guide Nucleic Acid Develop. 10: 297; Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, pp. 858-859, Kroschwitz, J. L. 編. John Wiley & Sons, 1990；米国特許3,687,808、および同様の参考文献（これらはすべて、引用により本明細書に組み込まれる）において知得され得る。

【0143】

特定の置換型または修飾型ヌクレオチド塩基部分もまた想定される。このようなものとしては、5'-置換ピリミジン；6'-アザピリミジン；ならびにN-2、N-6、またはO-6置換プリン（例えば、2'-アミノプロピルアデニン、5'-プロピニルウラシルおよび5'-プロピニルシトシン）が挙げられる。さらに、例えば、5'-メチルウリジン置換および5'-メチルシトシン置換は、核酸二本鎖の安定性を増大させることが知られており、これを、2'-糖鎖修飾（例えば、2'-O-メチルもしくは2'-メトキシエチル）またはヌクレオシド間結合（例えば、ホスホロチオエート）と組み合わせると、修飾型または置換型の一本鎖RNAi分子に対して所望のヌクレアーゼ抵抗性がもたらされ得る。

【0144】

10

20

30

40

50

さらなる実施形態において、本発明の一本鎖RNAi分子の少なくとも1個のピリミジンは、二環式の糖の形態のロックド核酸(LNA)である。関連する実施形態において、LNAは塩基置換を含む(5-メチルウリジンLNAまたは2-チオ-5-メチルウリジンLNAなど)。さらなる実施形態において、ピリミジンヌクレオシドまたはヌクレオシド間結合のリボースは修飾されていてもよい。

【0145】

これらの任意の実施形態において、1個以上の置換型または修飾型ヌクレオチドは、Gクランプ(例えば、グアニンに対してさらなる水素結合を形成しているシトシン類似体、例えば、9-(アミノエトキシ)フェノキサジン)であり得る。例えば、LinおよびMateucci, 1998, Nucleic Acids Res. 19: 3111を参考のこと。

10

【0146】

本明細書に記載の任意の実施形態において、該一本鎖RNAi分子は多種類の型の修飾を含むものであってもよい。例えば、少なくとも1個のリボチミジンまたは2-チオリボチミジンを有する一本鎖RNAi分子は、さらに、少なくとも1つのLNA、2'-メトキシ、2'-フルオロ、2-デオキシ、ホスホロチオエート結合、逆位塩基末端キャップ、またはその任意の組合せを含むものであってもよい。一部の特定の例示的な実施形態において、該一本鎖RNAi分子は、リボチミジンで置換されたウリジンを1個以上含むもの、または全部置換されたウリジンで構成されたものであり、約75%までのLNA置換を有するものであり得る。他の例示的な実施形態では、該一本鎖RNAi分子は、リボチミジンで置換されたウリジンを1個以上含むもの、または全部置換されたウリジンで構成されたものであり、約25%までの2'-メトキシ置換を有するものであり得る。さらに他の例示的な実施形態では、該一本鎖RNAi分子は、リボチミジンで置換されたウリジンを1個以上含むもの、または全部置換されたウリジンで構成されたもので構成されており、約100%までの2'-フルオロ置換を有するものであり得る。

20

【0147】

また、一部の特定の態様において、本発明の開示により、1個以上のユニバーサル塩基ヌクレオチドを含む一本鎖RNAi分子を提供する。用語「ユニバーサル塩基」は、本明細書で用いる場合、1種類より多くの型のヌクレオチドと塩基対または水素結合ヌクレオチド対を形成するヌクレオチド塩基類似体をいう。ユニバーサル塩基の非限定的な例としては、当該技術分野で知られたC-フェニル、C-ナフチルおよび他の芳香族の誘導体、イノシン、アゾールカルボキシアミド、ならびにニトロアゾール誘導体(3-ニトロピロール、4-ニトロインドール、5-ニトロインドール、および6-ニトロインドールなど)が挙げられる(例えば、Loakes, 2001, Nucleic Acids Research 29: 2437-2447を参考のこと)。一部の特定の態様において、本明細書に開示した一本鎖RNAi分子には、得られるRNAi分子が1種類以上のその内在性標的をモジュレートする能力が保持される限り、約1個～約10個のユニバーサル塩基ヌクレオチドを含めることができる。

30

D. 一本鎖RNAi分子の合成

本開示の例示的な分子は当業者に知られたいくつかの手法を用いて得ることができる。例えば、本発明のRNAi分子は、化学合成されるもの、組換え產生される(例えば、プラスミドにコードされる)もの、またはその組合せであり得る。

40

【0148】

オリゴヌクレオチドまたは個々の連続ヌクレオチド鎖(例えば、特定の修飾オリゴヌクレオチドまたはリボヌクレオチドがないオリゴヌクレオチドの一部分)は、当該技術分野で知られた、例えば、Caruthersら, 1992, Methods in Enzymol 211: 3; Thompsonら, PCT国際公開第99/54459号パンフレット; Wincottら, 1995, Nucleic Acids Res. 23: 2677; Wincottら, 1997 Methods Mol. Bio. 74: 59; Brennanら, 1998, Biotechnol. Bioeng. 67: 33; お

50

およびBrennan, 米国特許第6,001,311号に記載のプロトコルを用いて合成される。オリゴヌクレオチドの合成では、一般的な核酸保護基およびカップリング基(5'末端のジメトキシトリチル、および3'末端のホスホルアミダイトなど)が利用される。修飾なしのRNA、例えば、本開示の特定の一本鎖RNAi分子のもの合成は、Usmansら, 1987, J. Am. Chem. Soc. 109: 7845; Scaringerら, 1990, Nucleic Acids Res. 18: 5433; ならびにWincottら, 1995, Nucleic Acids Res. 23: 2677; およびWincoffら, 1997, Methods Mol. Bio. 74: 59に記載の手順を用いて行われ得る。一部の特定の実施形態において、本発明の開示の一本鎖RNAi分子のヌクレオチド部分は、別々に合成してもよく、合成後に非ヌクレオチドスペーサー部分と、例えばライゲーションによって連接して一体にしてもよい。(Mooreら, 1992, Science 256: 9923; Draperら, PCT国際公開第93/23569号パンフレット; Shabarovら, 1991, Nucleic Acids Res. 19: 4247; Bellonら, 1997, Nucleosides & Nucleotides 16: 951; Bellonら, 1997, Bioconjugate Chem. 8: 204)。さらなる実施形態では、本開示の一本鎖RNAi分子のヌクレオチド部分は、1種類以上の連続RNA鎖をコードし、宿主細胞内でのその発現を指令するポリヌクレオチド(DNAまたはRNA)ベクターによって発現される单一の転写産物として作製されるものであっても、多種類の転写産物として作製されるものであってもよい。次いで該ヌクレオチド部分を単離し、ライゲーションによって非ヌクレオチドスペーサー部分と連接する。

【0149】

一部の実施形態では、pol III系構築物を用いて本発明の核酸分子を発現させる。該一本鎖RNAi分子配列の転写は、真核生物のRNAポリメラーゼI (pol I)、RNAポリメラーゼII (pol II)、またはRNAポリメラーゼIII (pol III)のためのプロモーターにより駆動され得る(例えば、Thompson, 米国特許第5,902,880号および同第6,146,886号を参照のこと)。(また、IzantおよびWeintraub, 1985, Science, 229, 345; McGarryおよびLindquist, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 83, 399; Scanlonら, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 10591-5; Kashani-Sabetら, 1992, Antisense Res. Dev., 2, 3-15; Dropulicら, 1992, J. Virol., 66, 1432-41; Weerasingheら, 1991, J. Virol., 65, 5531-4; Ojwangら, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10802-6; Chenら, 1992, Nucleic Acids Res., 20, 4581-9; Sarverら, 1990 Science, 247, 1222-1225; Thompsonら, 1995, Nucleic Acids Res., 23, 2259; Goodら, 1997, Gene Therapy, 4, 45も参照のこと。pol IIまたはpol IIIプロモーターでの転写物は、あらゆる細胞において高レベルで発現される; 所与の細胞型における所与のpol IIプロモーターレベルは、近くに存在する遺伝子調節配列(エンハンサー、サイレンサーなど)の性質に依存する。また、原核生物のRNAポリメラーゼプロモーターも使用されるが、原核生物のRNAポリメラーゼ酵素は適切な細胞において発現させるものとする(Elroy-SteinおよびMoss, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 6743-7; GaoおよびHuang 1993, Nucleic Acids Res., 21, 2867-72; Lieberら, 1993, Methods Enzymol., 217, 47-66; Zhouら, 1990, Mol. Cell Biol., 10, 4529-37)。数名の研究者らにより、かかるプロモーターにより発現される核酸分子は、哺乳動物細胞において機能を果たし得ることが示されている(例えば、Kashani-Sabetら, 1992, Antisense 50

R e s . D e v . , 2 , 3 - 1 5 ; O j w a n g ら , 1 9 9 2 , P r o c . N a t l A c a d . S c i . U S A , 8 9 , 1 0 8 0 2 - 6 ; C h e n ら , 1 9 9 2 , N u c l e i c A c i d s R e s . , 2 0 , 4 5 8 1 - 9 ; Y u ら , 1 9 9 3 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 9 0 , 6 3 4 0 - 4 ; L ' H u i l l i e r ら , 1 9 9 2 , E M B O J . , 1 1 , 4 4 1 1 - 8 ; L i s z i e w i c z ら , 1 9 9 3 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A , 9 0 , 8 0 0 0 - 4 ; T h o m p s o n ら , 1 9 9 5 , N u c l e i c A c i d s R e s . , 2 3 , 2 2 5 9 ; S u l l e n g e r & C e c h , 1 9 9 3 , S c i e n c e , 2 6 2 , 1 5 6 6) 。より具体的には、U 6 核内低分子 (s n R N A) 、トランスクアーニ R N A (t R N A) およびアデノウイルス V A R N A をコードしている遺伝子に由来するものなどの転写単位は、高濃度の所望の R N A 分子の作製に有用である (T h o m p s o n ら (上掲) ; C o u t u r e および S t i n c h c o m b , 1 9 9 6 (上掲) ; N o o n b e r g ら , 1 9 9 4 , N u c l e i c A c i d R e s . , 2 2 , 2 8 3 0 ; N o o n b e r g ら , 米国特許第 5 , 6 2 4 , 8 0 3 号 ; G o o d ら , 1 9 9 7 , G e n e T h e r . , 4 , 4 5 ; B e i g e l m a n ら , P C T 国際公開第 9 6 / 1 8 7 3 6 号パンフレット。上記の転写単位は、哺乳動物細胞内への導入のためのさまざまなベクター、例えば限定されないが、プラスミド D N A ベクター、ウイルス D N A ベクター (アデノウイルスもしくはアデノ随伴ウイルスベクターなど) 、またはウイルス R N A ベクター (レトロウイルスもしくはアルファウイルスベクターなど) に組み込まれ得る (概説については、C o u t u r e および S t i n c h c o m b , 1 9 9 6 (上掲) を参照のこと)。 10

【 0 1 5 0 】

置換または修飾 (塩基、糖鎖、リン酸基またはその任意の組合せ) を有する核酸分子の化学合成により、血清リボヌクレアーゼによる分解に対する抵抗性が付与され得、これにより効力ならびに他の薬理学的および治療的有益性の増大がもたらされ得る。例えば、E c k s t e i n ら , P C T 国際公開第 9 2 / 0 7 0 6 5 号パンフレット ; P e r r a u l t ら , 1 9 9 0 , N a t u r e 3 4 4 : 5 6 5 ; P i e k e n ら , 1 9 9 1 , S c i e n c e 2 5 3 : 3 1 4 ; U s m a n および C e d e r g r e n , 1 9 9 2 , T r e n d s i n B i o c h e m . S c i . 7 7 : 3 3 4 ; U s m a n ら , 1 9 9 4 , N u c l e i c A c i d s S y m p . S e r . 3 1 : 1 6 3 ; B e i g e l m a n ら , 1 9 9 5 , J . B i o l C h e m . 2 7 0 : 2 5 7 0 2 ; B u r l i n a ら , 1 9 9 7 , B i o o r g M e d . C h e m . 5 : 1 9 9 9 ; K a r p e i s k y ら , 1 9 9 8 , T e t r a h e d r o n L e t t 3 9 : 1 1 3 1 ; E a r n s h a w および G a i t , 1 9 9 8 , B i o p o l y m e r s (N u c l e i c A c i d S c i e n c e s) 4 8 : 3 9 ; V e r m a および E c k s t e i n , 1 9 9 8 , A n n u . R e v . B i o c h e m . 6 7 : 9 9 ; H e r d e w i j n , 2 0 0 0 , G u i d e N u c l e i c A c i d D r u g D e v . 1 0 : 2 9 1 ; K u r r e c k , 2 0 0 3 , E u r . J . B i o c h e m . 2 7 0 : 1 6 2 8 ; D o r s e t t および T u s c h l , 2 0 0 4 , N a t u r e R e v . D r u g D i s c o v . 3 : 3 1 8 ; R o s s i ら , P C T 国際公開第 9 1 / 0 3 1 6 2 号パンフレット ; U s m a n ら , P C T 国際公開第 9 3 / 1 5 1 8 7 号パンフレット ; B e i g e l m a n ら , P C T 国際公開第 9 7 / 2 6 2 7 0 号パンフレット ; W o o l f ら , P C T 国際公開第 9 8 / 1 3 5 2 6 号パンフレット ; S p r o a t , 米国特許第 5 , 3 3 4 , 7 1 1 号 ; U s m a n ら , 米国特許第 5 , 6 2 7 , 0 5 3 号 ; B e i g e l m a n ら , 米国特許第 5 , 7 1 6 , 8 2 4 号 ; O t v o s ら , 米国特許第 5 , 7 6 7 , 2 6 4 号 ; G o l d ら , 米国特許第 6 , 3 0 0 , 0 7 4 号を参照のこと。上記の各参考文献には、本明細書に記載の一本鎖 R N A i 分子において使用され得る核酸分子の塩基、リン酸または糖鎖部分に対する種々の置換および化学修飾が開示されている。 30

【 0 1 5 1 】

E . 一本鎖 R N A i 分子の設計方法

本明細書に記載のように、本発明の一本鎖 R N A 分子は、R N A i 機構によって標的配列の発現を阻害し得るものである。一実施形態において、該一本鎖 R N A i 分子は、所望 40

のノックダウン機能を有する事前に特定されたRNAi剤（例えば、siRNA、miRNA）を基にして設計され得る。例えば、本発明の一本鎖RNAi分子がmiRNA模倣物である場合、これは、天然に存在する対応miRNA分子（表1参照）またはその類似体（例えば、化学修飾形態）から得られる。本出願の出願日の時点で、さまざまな種に内在性の3000種類を超えるmiRNA分子が公衆に利用可能なデータベースにおいて知得され得る（例えば、公衆に利用可能なmiRBase配列データベースを参照のこと（Griffith-Jonesら, 2004, Nucleic Acids Research 32:D109-D111およびGriffith-Jonesら, 2006, Nucleic Acids Research 34:D140-D144に記載，ワールドワイドウェブにおいてWellcome Trust Sanger Instituteのウェブサイトでアクセス可能）。本明細書の表1に、1090種類の成熟ヒトmiRNA配列の一覧（配列番号：1～1090）を示している。別の例では、本発明の一本鎖RNAi分子は、選択した標的配列の発現を阻害することがわかっているか、または標的mRNA配列の発現を阻害する潜在性を有するかのいずれかである事前に特定されたsiRNAから得られ得る。具体的には、事前に特定されたRNAi分子（すなわち、参照RNAi分子）から得られる一本鎖RNAi分子は、1つ以上の内部非ヌクレオチドスペーサー部分を参照RNAi分子のガイド鎖内に導入することにより設計され得る。別の実施形態では、該一本鎖RNAi分子は、特定の標的配列の発現をノックダウンする目的のためにデノボ設計され得る（すなわち、既知のRNAi剤を基にしない）。

【0152】

10

20

本発明の所与の一本鎖RNAi分子のRNAi活性は、既知の方法、例えば、Fireら, PCT国際公開第99/32619号パンフレットに一般的に記載のもの、および後述する実施例のセクションに記載のものを用いて測定され得る。一部の実施形態において、本明細書により、構成的プロモーター（サイトメガロウイルス（CMV）またはホスホグリセラートキナーゼ（PGK）プロモーターなど）を含み、1種類以上のレポーター遺伝子（ルシフェラーゼ、クロラムフェニコール（CAT）または-ガラクトシダーゼなど）に作動可能に融合され（さらに、該レポーター遺伝子は、試験対象のssRNAiに完全にまたは一部相補的な標的配列の一部分にインフレームで作動可能に融合される）、その発現を改変することができる1種類以上のレポーター遺伝子構築物を使用することにより、より有効な一本鎖RNAi分子設計物を選択するための方法を提供する。このようなレポーター遺伝子発現構築物は、1種類以上のssRNAi分子および対照（例えば、内部非ヌクレオチドスペーサーを含まない対応miRNA模倣物）とコトランスフェクトされ得る。所与のssRNAi分子が標的mRNAのRNAiを媒介する能力は、ssRNAi分子でトランスフェクトした細胞において測定されたレポーター遺伝子の活性と、陰性対照でトランスフェクトした細胞（すなわち、ssRNAi分子でトランスフェクトしていない細胞）および陽性対照でトランスフェクトした細胞（例えば、内部非ヌクレオチドスペーサーを含まない対応miRNA模倣物でトランスフェクトした細胞）における活性とを比較することにより測定され得る。例えば内部非ヌクレオチドスペーサーを含まないその対応RNAi分子の活性の少なくとも20%以上、好ましくは少なくとも40%以上、または60%以上、または80%以上を有するssRNAi分子を選択する。

30

40

【0153】

当業者は、改善された特性（例えば、薬物動態プロフィール、バイオアベイラビリティ、安定性）を有するがRNAiを媒介する能力は維持されている分子がどれであるかを判定するために、例えば、本明細書に記載の、または当該技術分野で一般的に知られた動物モデルにおいて、種々の非ヌクレオチドスペーサーを含む本開示の一本鎖RNAi分子をスクリーニングすることができよう。また、同様に、当業者は、改善された特性を有するがRNAiを媒介する能力は維持されているRNAi分子-コンジュゲート複合体がどれであるかを判定するために、種々のコンジュゲートを有する本開示の一本鎖RNAi分子をスクリーニングすることができよう。

【0154】

50

F. 組成物および使用方法

本明細書に示すように、本発明の一本鎖RNA分子は、好ましくは細胞内RNAi経路に関与し得る、あるいは同じまたは関連経路をモジュレートして病的または疾患状態と関連している標的遺伝子の阻害をもたらし得るRNAi剤である。miRNA模倣物である一本鎖RNA分子の場合、該ssRNAi分子は、レベルの低下あるいはレベルが不適切に低いことが病的または疾患状態と関連している天然に存在する対応miRNAが補足されるように、または置き換えられるように設計される。したがって、本発明の一本鎖RNAi分子は、さまざまな治療的、診断的、標的確認、ゲノム知得、遺伝子操作および薬理ゲノミクスの適用用途のための方法において使用され得る有用な試薬である。

【0155】

10

本発明の一本鎖RNA分子は細胞、組織、生物体、インビトロ系またはインビオ系に、標的配列に対するRNAiを媒介するために導入され得る。該標的配列は、内在性の標的遺伝子または配列であり得る。一実施形態において、本発明の一本鎖RNAi分子は、不要なタンパク質産生を特徴とする疾患を有する生物体の処置に使用され得る。

【0156】

miRNA模倣物である本発明の一本鎖RNAi分子の場合、標的配列は、天然に存在する対応miRNA標的である。かかる場合において、一本鎖miRNA模倣物は、例えば、そのmRNA標的の下流のいくつかの遺伝子を調節するものであり得、その発現レベルは天然に存在する対応miRNAと関連しているか、あるいは該対応miRNAによって調節される。天然に存在する特定のmiRNAの異常な発現レベルは種々のヒトの病気（例えば限定されないが、過剰増殖性、血管形成性または炎症性の疾患、状態、または有害な病状）に関与しているため、本発明の一本鎖miRNA模倣物により有益な治療機会がもたらされ得る。これとの関連において、本開示の一本鎖miRNA模倣物は、その対応内在性miRNAの1つ以上の下流遺伝子の発現を調節（例えば、ノックダウンまたは上方調節）し得るものであり、そのため、1つ以上の関連疾患症状の重症度または再発の予防、緩和または低減が達成され得る。あるいはまた、疾患または他の有害な病状の結果として1種類以上の標的mRNAの発現が必ずしも低下しない、または正常より低いレベルでない種々の相違する疾患モデルであっても、本発明の1種類以上の一本鎖miRNA模倣物などの外来性miRNA模倣物を導入すると、疾患経路と関連している遺伝子の発現レベルに影響を及ぼすことにより治療成果がもたらされることがそれでもなおり得る。

20

【0157】

また、本発明の一本鎖RNAi分子は、標的遺伝子のコード領域を標的化し、該遺伝子の発現を阻害し、したがってタンパク質産生を低減させることにおいて、siRNA分子と同様の作用を行うことができるものである。該一本鎖RNAi分子の導入がなければ產生されたであろうタンパク質は、病的または疾患状態（例えば、がん）と関連しているものであり得る。

【0158】

本明細書における開示によれば、細胞内または生物体の1種類以上の対応する標的mRNAの発現を阻害するための本発明の一本鎖RNAi分子、その組成物および方法を提供する。本開示により、被検体（例えば、ヒトの細胞、組織または個体）を処置するための方法および一本鎖RNAi分子組成物を提供する。

40

【0159】

(i) 医薬組成物および製剤

本開示は、保存または投与のために調製される一本鎖RNAi分子組成物であって、医薬有効量の所望のRNAi分子を薬学的に許容され得る担体または希釈剤中に含む一本鎖RNAi分子組成物を含む。本開示の一本鎖RNAi分子組成物は薬学的に許容され得る製剤として有效地に使用され得る。薬学的に許容され得る製剤は、被検体の疾患状態または他の有害な病状を予防、その発症もしくは重症度を改変、または該疾患状態または該病状を処置（1つ以上の症状を検出可能もしくは測定可能な程度まで緩和する）するものであ

50

る。したがって、医薬組成物または製剤は、細胞内または被検体（ヒトなど）への投与（例えば、全身投与）に適した形態の組成物または製剤をいう。本発明の開示の医薬組成物は、内包された一本鎖RNAi分子（1種類または複数種）が被検体に投与するとバイオアベイラブルとなることが可能なように製剤化される。

【0160】

一部の特定の実施形態において、本開示の医薬組成物に、保存料、酸化防止剤、安定剤、色素、フレーバー剤またはその任意の組合せを含めてよい。例示的な保存料としては、安息香酸ナトリウム、p-ヒドロキシ安息香酸のエステル、およびソルビン酸が挙げられる。薬学的に許容され得る製剤としては、上記の化合物の塩、例えば、酸付加塩（塩酸、臭化水素酸、酢酸またはベンゼンスルホン酸の塩など）が挙げられる。治療的使用のための許容され得る担体または希釈剤は製薬技術分野でよく知られており、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., A.R. Gennaro edit, 第21版, 2005に記載されている。

【0161】

一部の特定の実施形態において、本発明の1種類以上一本鎖RNAi分子を含む水性懸濁剤は、適当な賦形剤（懸濁化剤または分散化剤もしくは湿潤剤など）と混合物して調製され得る。例示的な懸濁化剤としては、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロプロピル-メチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、ガムトラガカントおよびガムアカシアが挙げられる。代表的な分散化剤または湿潤剤としては、天然に存在するホスファチド（例えば、レシチン）、アルキレンオキシドと脂肪酸との縮合生成物（例えば、ポリオキシエチレンステアレート）、エチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールとの縮合生成物（例えば、ヘプタデカエチレンオキシセタノール）、エチレンオキシドと脂肪酸およびヘキシトールから得られる部分エステルとの縮合生成物（例えば、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート）、またはエチレンオキシドと、脂肪酸およびヘキシトール無水物から得られる部分エステルとの縮合生成物（例えば、ポリエチレンソルビタンモノオレエート）が挙げられる。一部の特定の実施形態において、該水性懸濁剤に、1種類以上の保存料（例えば、エチルまたはw-プロピル-p-ヒドロキシベンゾエート）、1種類以上の着色剤、1種類以上のフレーバー剤、または1種類以上の甘味剤（例えば、スクロース、サッカリン）を含有させてもよい。さらなる実施形態において、本発明の1種類以上一本鎖RNAi分子を含む水性懸濁剤の調製に適した分散性の粉末剤および顆粒剤は、該一本鎖RNAi分子が分散化剤または湿潤剤、懸濁化剤と混合された状態で（1種類以上の保存料、着色剤、フレーバー剤または甘味剤が混合されていてもよい）水を添加することによって調製され得る。

【0162】

さらなる実施形態では、本開示の一本鎖RNAi分子は、ssRNAiを、例えば、植物油（例えば、ラッカセイ油、オリーブ油、ゴマ油もしくはココナッツ油）、または鉛油（例えば、液状パラフィン）に懸濁させることにより、油性懸濁剤または乳剤（例えば、水中油型）として製剤化され得る。好適な乳化剤は、天然に存在するガム（例えば、ガムアカシアもしくはガムトラガカント）、天然に存在するホスファチド（例えば、ダイズ、レシチン、脂肪酸とヘキシトールから得られるエステルもしくは部分エステル）、無水物（例えば、ソルビタンモノオレエート）、または部分エステルとエチレンオキシドとの縮合生成物（例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート）であり得る。一部の特定の実施形態において、油性懸濁剤または乳剤に、増粘剤（蜜蠟、硬質パラフィンまたはセチルアルコールなど）を含有させてもよい。関連する実施形態において、口あたりのよい経口調製物を得るために、甘味剤およびフレーバー剤を添加してもよい。また他の実施形態では、このような組成物は、アスコルビン酸などの添加してもよい酸化防止剤によって保存され得る。

【0163】

さらなる実施形態において、一本鎖RNAi分子は、甘味剤（例えば、グリセロール、

10

20

30

40

50

プロピレングリコール、ソルビトール、グルコースまたはスクロース)を用いて、シロップ剤およびエリキシル剤として製剤化され得る。また、かかる製剤に粘滑剤、保存料、フレーバー剤、着色剤、またはその任意の組合せを含有させててもよい。

【0164】

他の実施形態では、本発明の一本鎖RNAi分子を含む医薬組成物は、滅菌された注射用の水性または油性懸濁剤の形態であり得る。また、滅菌された注射用調製物は、無毒性の非経口に許容され得る希釈剤または溶媒中の滅菌された注射用の液剤または懸濁剤(例えば、1,3-ブタンジオール中の液剤)であり得る。中でも、本開示の組成物に有用な例示的な許容され得るビヒクルおよび溶媒は、水、リンゲル液または等張性塩化ナトリウム溶液である。また、滅菌された固定油も、溶媒または懸濁媒体として使用され得る。この目的には、任意の無刺激性固定油(例えば、合成のモノ-またはジグリセリド)が使用され得る。また、オレイン酸などの脂肪酸は、非経口製剤の調製に有用性が見い出されている。

【0165】

本発明の一本鎖RNAi分子は直接投与してもよく、例えばカチオン性脂質と複合体形成しても、リポソーム内に封入しても、別 の方法で標的細胞もしくは組織に送達してもよい。核酸分子の送達方法は、Akhtarら, 1992, Trends Cell Bio., 2:139; Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics編. Akhtar, 1995; Maurerら, 1999, Mol. Membr. Biol 16:129-140; HoflandおよびHuang, 1999, Handb. Exp. Pharmacol. 137:165-192; ならびにLeeら, 2000, ACS Symp. Ser. 752:184-192に記載されている。Beigelmanらの米国特許第6,395,713号およびSullivanらのPCT国際公開第94/02595号パンフレットには、さらに、核酸分子の送達のための一般法が記載されている。このようなプロトコルは、事実上どのような核酸分子の送達にも使用することができる。核酸分子は細胞に、当業者に知られたさまざまな方法、例えば限定されないが、リポソーム内への封入、イオン導入、もしくは他の媒体、例えば、生分解性ポリマー、ヒドロゲル、シクロデキストリン(例えば、Gonzalezら, 1999, Bioconjugate Chem., 10, 1068-1074; Wangら, PCT国際公開第03/47518号パンフレットおよび同第03/46185号パンフレット参照)、ポリ(乳酸-コ-グリコール酸)(PLGA)およびPLCAミクロスフィア(例えば、米国特許6,447,796および米国特許出願公開第2002130430号参照)、生分解性ナノカプセル、ならびに生体接着性ミクロスフィアへの組込みによって、またはタンパク質性ベクター(O'HareおよびNormand, PCT国際公開第00/53722号パンフレット)によって投与され得る。

【0166】

(i) 担体 / 送達系

一態様において、本発明は、本明細書に記載の一本鎖RNAi分子を内包する担体系を提供する。一部の実施形態において、担体系は、脂質系担体系、カチオン性脂質もしくはリポソーム核酸複合体、リポソーム、ミセル、ビロソーム、脂質ナノ粒子またはその混合物である。他の実施形態では、担体系は、ポリマー系担体系(カチオン性ポリマー-核酸複合体など)である。さらなる実施形態では、担体系は、シクロデキストリン系担体系(シクロデキストリンポリマー-核酸複合体など)である。さらなる実施形態において、担体系は、タンパク質系担体系(カチオン性ペプチド-核酸複合体など)である。好ましくは、担体系は脂質ナノ粒子(「LNP」)製剤である(in)。

【0167】

一部の特定の実施形態において、本発明の一本鎖RNAi分子は、米国特許出願第11/353,630号、同第11/586,102号、同第61/189,295号、同第61/204,878号、同第61/235,476号、同第61/249,807号、

10

20

30

40

50

および同第61/298, 022号に記載されているような脂質ナノ粒子組成物を用いて製剤化される。一部の特定の好ましい実施形態では、本発明のssRNAi分子は、カチオン性脂質/コレステロール/PEG-C-DMA/DSPCを40/48/2/10の比で、またはカチオン性脂質/コレステロール/PEG-DMG/DSPCを40/48/2/10の比で含む脂質ナノ粒子組成物を用いて製剤化される。一部の特定の他の実施形態では、本発明は、米国特許出願第61/189, 295号、同第61/204, 878号、同第61/235, 476号、同第61/249, 807号、および同第61/298, 022号に記載のいずれかのカチオン性脂質配合物を用いて製剤化された本発明のssRNAi分子を含む組成物を特色とする。

【0168】

10

本開示の一部の特定の実施形態では、官能性部分と合わせた、複合体形成した、またはコンジュゲートした1種類以上一本鎖RNAi分子（例えば、希釈剤、安定剤、バッファーなどの薬学的に許容され得る担体を用いて製剤化してもよい）の存在または投与を特色とする医薬組成物および方法を提供する。かかるコンジュゲートおよび/または複合体は、生物学的系（細胞など）へのRNAi分子の送達を助長するために使用され得る。本発明によって提供されるコンジュゲートおよび複合体は、治療用化合物を細胞膜を通過して移動させること、薬物動態を改変すること、および/または本発明の核酸分子の局在をモジュレートすることにより、治療活性を付与するものであり得る。かかるコンジュゲートの非限定的な例は、米国特許出願公開第2008/0152661号および同第2004/0162260号（例えば、CDM-LBA、CDM-Pip-LBA、CDM-PEG、CDM-NAGなど）ならびに米国特許出願第10/427, 160号および同第10/201, 394号；ならびに米国特許第6, 528, 631号；同第6, 335, 434号；同第6, 235, 886号；同第6, 153, 737号；同第5, 214, 136号および；同第5, 138, 045に記載されている。

20

【0169】

30

本開示の一本鎖RNAi分子は、該分子の末端位置および/または内部位置（1つ以上または複数）のヌクレオチドの1つ以上および/またはスペーサー部分にコンジュゲート構成員を含むものである。コンジュゲート構成員は、例えば、脂肪親和性物質、テルペン、タンパク質結合剤、ビタミン、糖質、またはペプチドであり得る。例えば、コンジュゲート構成員は、ナプロキセン、ニトロインドール（もしくはスタッキング相互作用に寄与する別のコンジュゲート）、フォレート、イブプロフェン、またはC5ピリミジンリンカーであり得る。他の実施形態では、コンジュゲート構成員は、グリセリド脂質コンジュゲート（例えば、ジアルキルグリセリド誘導体）、ビタミンEコンジュゲート、またはチオコレステロールである。種々の実施形態において、ポリエチレングリコール（PEG）が本発明の一本鎖RNAi分子に共有結合によって結合され得る。結合されるPEGは、任意の分子量（好ましくは、約100～約50, 000ドルトン（Da））であり得る。

【0170】

40

本開示の一部の特定の実施形態では、ポリペプチドまたはペプチドと合わせた、複合体形成した、またはコンジュゲートした1種類以上一本鎖RNAi分子（例えば、希釈剤、安定剤、バッファーなどの薬学的に許容され得る担体を用いて製剤化してもよい）の存在または投与を特色とする医薬組成物および方法を提供する。一部の特定の実施形態において、ペプチドコンジュゲートパートナーが、標的細胞への本開示の1種類以上一本鎖RNAi分子の送達を向上させるため、あるいは、生物学的試料を接触させた場合の該分子の安定性または活性を向上させるために使用される場合。本開示のこのような態様における使用のための例示的なペプチドコンジュゲート構成員としては、例えば、米国特許出願公開第2006/0040882号および同第2006/0014289号ならびに米国特許仮出願第60/939, 578号（これらはすべて、引用により本明細書に組み込まれる）に記載のペプチドPN27、PN28、PN29、PN58、PN61、PN73、PN158、PN159、PN173、PN182、PN202、PN204、PN250、PN361、PN365、PN404、PN453およびPN509が挙げられ

50

る。

【0171】

一実施形態において、本開示により、肝細胞などへの特定の細胞型への本開示の一本鎖 RNAi 分子の投与に適した組成物を提供する。例えば、アシアロ糖タンパク質受容体 (ASGPr) (Wu および Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429) は、は肝細胞に特有であり、分枝ガラクトース末端糖タンパク質 (アシアロオロソムコイド (ASOR) など) に結合する。かかる糖タンパク質または合成複合糖質の該受容体への結合は、該オリゴ糖鎖の分岐度に強く依存する親和性で起こり、例えば、トリアンテナ型構造は、ビアンテナ型またはモノアンテナ型鎖よりも大きな親和性で結合される (Baenziger および Fiette, 1980, Cell 22: 611; Connolly, 1982, J. Biol. Chem. 257: 939)。Lee および Lee (1987, Glycoconjugate J. 4: 317) により、ガラクトースと比べて該受容体に対する親和性が高い N - アセチル - D - ガラクトサミンを糖質部分として使用することによって、この高特異性が得られた。また、この「クラスタリング効果」は、マンノシル末端糖タンパク質または複合糖質の結合および取込みでも報告されている (Ponpipom, 1981, J. Med. Chem. 24: 1388)。外来性化合物を細胞膜を通過して輸送するためのガラクトースおよびガラクトサミン系コンジュゲートの使用により、肝臓疾患の処置に対するターゲット送達アプローチが提供され得る。また、バイオコンジュゲートの使用により、処置に必要とされる治療用化合物の必要用量の低減がもたらされ得る。さらに、治療的バイオアベイラビリティ、薬力学、および薬物動態パラメータが、本開示のバイオコンジュゲートの使用によってモジュレートされ得る。

【0172】

さらに別の実施形態では、本発明の一本鎖 RNAi 分子をポリペプチドにコンジュゲートさせ、1種類以上の非カチオン性脂質または非カチオン性脂質とカチオン性脂質の組合せと混合すると、標的細胞を該脂質なしの裸の RNAi 分子と接触させることによる送達と比べて RNAi 分子の細胞内送達が向上する組成物が形成され得る。本開示のより詳細な態様では、該一本鎖 RNAi 分子とポリペプチドを含む混合物、複合体またはコンジュゲートは、Lipofectine (商標) などのカチオン性脂質と合わされ (例えば、混合または複合体形成され) てもよい。ポリペプチド、一本鎖 RNAi 分子およびカチオン性脂質で構成されたこのような組成物を作製するためには、RNAi 分子とポリペプチドがまず適当な培地 (例えば、細胞培養培地) 中で一緒に混合され得、その後でカチオン性脂質を混合物に添加し、RNAi 分子 / 送達ペプチド / カチオン性脂質組成物を形成する。状況によっては、ペプチドとカチオン性脂質をまず適当な培地 (例えば、細胞培養培地) 中で混合した後、一本鎖 RNAi 分子を添加し、RNAi 分子 / 送達ペプチド / カチオン性脂質組成物を形成してもよい。

【0173】

また、本開示は、ポリ (エチレングリコール) 脂質 (PEG 修飾型、または長期循環性のリポソームまたはステルスリポソーム) を内包している表面修飾リポソームを含む一本鎖 RNAi 分子組成物の使用を特色とする。このような製剤により、標的組織内での薬物の蓄積の増大がもたらされ得る (Lasic, 1995, Chem. Rev. 95: 2601; Ishiwata, 1995, Chem. Pharm. Bull. 43: 1005)。かかるリポソームは、おそらく、新たに血管が形成された標的組織内での管外遊出および捕捉により腫瘍内に選択的に蓄積されることが示されている (Lasic, 1995, Science 267: 1215; Oku, 1995, Biochim. Biophys. Acta 1238: 86)。長期循環リポソームにより、単核食細胞系 (MPS) の組織内に蓄積することがわかっている慣用的なカチオン性リポソームと比べて核酸分子の薬物動態と薬力学が向上する (Liu, 1995, J. Biol. Chem. 262: 24864; Choi, PCT 国際公開第 96/10391 号パンフレット; Ansell, PCT 国際公開第 96/10390 号パンフレット; Holland 50

ら、PCT国際公開第96/10392号パンフレット)。また、長期循環性のリポソームにより、理論的には代謝的に攻撃的なMPS組織(肝臓および脾臓など)への蓄積が回避されるため、カチオン性リポソームと比べてヌクレアーゼ分解からのさらなる保護がもたらされ得る。

【0174】

また、一部の実施形態では、本発明のRNAi分子は、ポリエチレンイミンおよびその誘導体、例えば、ポリエチレンイミン-ポリエチレングリコル-N-アセチルガラクトサミン(PEI-PEG-GAL)またはポリエチレンイミン-ポリエチレングリコル-トリ-N-アセチルガラクトサミン(PEI-PEG-TRIGAL)誘導体を用いて製剤化または複合体形成され得る。一実施形態において、本発明の核酸分子は米国特許出願公開第20030077829号に記載のようにして製剤化される。

10

【0175】

他の実施形態では、本発明の一本鎖RNAi分子を、膜破壊剤(米国特許出願公開公報第20010007666号に記載のものなど)と複合体形成させる。また、さらに他の実施形態では、膜破壊剤(1種類または複数種)と該RNAi分子を、カチオン性脂質またはヘルパー脂質分子(米国特許第6,235,310号に記載のもののような脂質など)と複合体形成させる。

【0176】

一部の特定の実施形態において、本発明の一本鎖RNAi分子を米国特許出願公開第2003077829号；同第20050287551号；同第20050164220号；同第20050191627号；同第20050118594号；同第20050153919号；同第20050085486号；および同第20030158133号；ならびにPCT国際公開第00/03683号パンフレットおよび国際公開第02/087541号パンフレットに記載のような送達系と複合体形成させる。

20

【0177】

一部の実施形態において、本発明のリポソーム製剤は、米国特許第6,858,224号；同第6,534,484号；同第6,287,591号；同第6,835,395号；同第6,586,410号；同第6,858,225号；同第6,815,432号；同第6,586,001号；同第6,120,798号；同第6,977,223号；同第6,998,115号；同第5,981,501号；同第5,976,567号；同第5,705,385号；ならびに米国特許出願公開第2006/0019912号；同第2006/0019258号；同第2006/0008909号；同第2005/0255153号；同第2005/0079212号；同第2005/0008689号；同第2003/0077829号、同第2005/0064595号、同第2005/0175682号、同第2005/0118253号；同第2004/0071654号；同第2005/0244504号；同第2005/0265961号および同第2003/0077829号に記載の化合物および組成物を用いて製剤化または複合体形成された本発明のRNAi分子を含むものである。

30

【0178】

また、本開示は、一本鎖RNAi分子のナノ粒子の調製方法を特色とする。メラミン誘導体を含む第1の溶液を、HClなどの酸を添加しておいた有機溶媒(ジメチルスルホキシドまたはジメチルホルムアミドなど)に溶解させる。HClの濃度は、メラミン誘導体1モルに対して約3.3モルのHClであり得る。次いで、第1の溶液を、極性または親水性の溶媒(例えば、エチレンジアミン四(tra)酢酸(EDTA)またはトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(TRIS)またはその組合せを含む水性バッファー溶液など)に溶解または懸濁させた核酸を含む第2の溶液と混合する。この混合物は第1の乳剤を形成している。混合は、任意の標準的な手法、例えば、超音波処理、ポルテックスまたはマイクロフルイダイザーなどを用いて行われ得る。得られた核酸粒子を精製してもよく、有機溶媒は、サイズ排除クロマトグラフィーまたは透析または両方を用いて除去することができる。複合体形成された核酸ナノ粒子は、次いで、ポリアルギニンもしくはG1

40

50

n - A *s* *n* ポリマーのいずれか、または両方を水溶液中に含む水溶液と混合され得る。各ポリマーの好ましい分子量は約 5 0 0 0 ~ 約 1 5 , 0 0 0 ドルトンである。これにより、メラミン誘導体と複合体形成された核酸のナノ粒子と、ポリアルギニンおよび G 1 *n* - A *s* *n* ポリマーとを含む溶液が形成される。混合工程は、核酸の剪断は最小限であるが平均して約 2 0 0 ナノメートルより小さい直径のナノ粒子が作製される様式で行われる。ポリアルギニンが核酸の副溝内でリン酸基の負電荷と複合体形成し、このポリアルギニンによって該三量体核酸複合体が覆われていると考えられる。ポリアルギニンのいずれかの末端に T A T ポリペプチド、マンノースまたはガラクトースなどの他の部分を該ポリマーに共有結合によって結合させ、特定の組織（ガラクトースを使用する場合は肝臓など）に核酸複合体の結合を指向させてもよい。理論に拘束されることを望まないが、G 1 *n* - A *s* *n* ポリマーが核酸の主溝内で核酸複合体と、該核酸の塩基との水素結合形成によって複合体形成すると考えられる。ポリアルギニンおよび G 1 *n* - A *s* *n* ポリマーは、2 0 塩基対を有する核酸 1 モルに対して 2 モルの濃度で存在させるのがよい。該濃度は、2 0 塩基対より多くを有する核酸では比例して増大させるのがよい。例えば、核酸が 2 5 塩基対を有する場合、該ポリマーの濃度は該二本鎖核酸 1 モルに対して 2 . 5 ~ 3 モルにするのがよい。得られたナノ粒子は、標準的な手段（サイズ排除クロマトグラフィーなど）によって精製した後、透析され得る。精製された複合体形成ナノ粒子は、次いで、当該技術分野でよく知られた手法を用いて凍結乾燥され得る。本発明の開示の一実施形態では、一本鎖 R N A i 分子を含む 1 0 0 ナノメートル (n m) 未満のナノ粒子を提供する。

【 0 1 7 9 】

10

(i i i) 処置

本発明の一本鎖 R N A i 分子（置換されていても修飾されていてもコンジュゲートされているよい）、その組成物、および本発明の開示の方法を用いた処置に適した被検体（例えば、哺乳動物の、ヒト）としては、少なくとも一部において標的遺伝子もしくは配列の異常な発現レベルによって媒介される 1 つ以上の疾患もしくは病状に苦しんでいる被検体、標的遺伝子 / 配列の異常レベルによって引き起こされる疾患もしくは該異常レベルと関連している疾患を発症するリスクがある被検体、または対応する s s R N A i 分子によって媒介される R N A i レベルを補足もしくは増大させることによる処置に適した被検体が挙げられる（例えば、過剰増殖性（例えば、がん）、血管形成性、代謝性または炎症性（例えば、関節炎）の疾患または障害または病状）。

30

【 0 1 8 0 】

本明細書に開示した組成物および方法は、多種多様な標的ウイルス、例えば、レトロウイルス（ヒト免疫不全ウイルス（H I V）、C 型肝炎ウイルス、B 型肝炎ウイルス、コロナウイルスなど）、ならびに呼吸器系ウイルス、例えば、ヒト呼吸器合抱体ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス、ライノウイルスおよびインフルエンザウイルスの処置に有用である。

【 0 1 8 1 】

40

他の例において、本開示の組成物および方法は、例えば過剰増殖性障害の症状を処置または予防するための治療ツールとして有用である。例示的な過剰増殖性障害としては、新生物、癌腫、肉腫、腫瘍、またはがんが挙げられる。より例示的な過剰増殖性障害としては、口腔がん、咽喉（t h r o a t）がん、喉頭がん、食道がん、咽頭（p h a r y n g e a l）がん、鼻咽腔がん、口腔咽頭がん、消化器がん、消化管間質腫瘍（G I S T）、小腸のがん、結腸がん、直腸がん、結腸直腸がん、肛門がん、脾がん、乳がん、子宮頸がん、子宮がん、外陰がん、膣がん、尿路がん、膀胱がん、腎臓がん、副腎皮質がん、島細胞がん、胆嚢がん、胃がん、前立腺がん、卵巣がん、子宮内膜がん、絨毛性腫瘍、精巣がん、陰茎がん、骨のがん、骨肉腫、肝臓がん、肝外胆管がん、皮膚がん、基底細胞がん（B C C）、肺がん、小細胞肺がん、非小細胞肺がん（N S C L C）、脳のがん、黒色腫、カポジ肉腫、目のがん、頭頸部がん、頭頸部の扁平上皮がん、胸腺腫（t y m o m a）、胸腺がん、甲状腺がん、上皮小体がん、ヒッペル リンダウ症候群、白血病、急性骨髓性（m y e l o i d）白血病、慢性骨髓性（m y e l o g e n o u s）白血病、急性リンパ

50

芽球性白血病、ヘアリーセル白血病、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、T細胞リンパ腫、多発性骨髄腫、悪性胸膜中皮腫、バレット腺がん、ウィルムス腫瘍などが挙げられる。他の例において、本開示の組成物および方法は、例えば炎症性障害の症状を処置または予防するために1種類以上の標的遺伝子の発現を調節するための治療ツールとして有用である。例示的な炎症性障害としては、真性糖尿病、関節リウマチ、炎症滑膜表層のパンヌスの増殖、コラーゲン誘導性関節炎、脊椎関節炎、強直性脊椎炎、多発性硬化症、脳脊髄炎、炎症性腸疾患、クローン病、乾癬または乾癬性関節炎、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、対宿主性移植片病、アテローム性動脈硬化、およびアレルギーが挙げられる。

【0182】

10

本開示の一本鎖RNAi分子、組成物および方法で処置され得る他の例示的な障害としては、代謝障害、心疾患、肺疾患、新生血管形成、虚血性障害、加齢性黄斑変性、糖尿病性網膜症、糸球体腎炎、糖尿病、喘息、慢性閉塞性肺疾患、慢性気管支炎、リンパ脈管新生、およびアテローム性動脈硬化が挙げられる。

【0183】

20

さらなる態様において、本明細書に記載の1つ以上の標的遺伝子関連疾患または病状をコントロールするために本発明の一本鎖RNAi分子と一緒に製剤化される、または協働的に投与される1種類以上の二次的または補助的活性薬剤と併用された有効量の1種類以上の一本鎖RNAi分子を含む併用製剤および方法を提供する。このようなコンビナトリアル製剤および協働的処置方法に有用な補助的治療用薬剤としては、例えば、酵素性核酸分子、アロステリック核酸分子、ガイド、デコイまたはアプタマー核酸分子、抗体（モノクローナル抗体など）、小分子および他の有機または無機化合物、例えば、金属、塩およびイオン、ならびに1つ以上の標的遺伝子関連疾患または病状の処置のために指示される他の薬物および活性薬剤、例えば、がんを処置するために使用される化学療法剤、ステロイド、非ステロイド系抗炎症薬（NSAID）などが挙げられる。例示的な化学療法剤としては、アルキル化剤（例えば、シスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチン、ブスルファン、ニトロソ尿素、ナイトロジエンマスター、ウラムスチン、テモゾロミド）、代謝拮抗薬（例えば、アミノブテリン、メトトレキサート、メルカブトプリン、フルオロウラシル、シタラビン）、タキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル）、アントラサイクリン系（例えば、ドキソルビシン、ダウノルビシン、エピルビシン、イダルビシン（idarubicin）、ミトザントロン、バルルビシン）、ブレオマイシン、マイトマイシン、アクチノマイシン、ヒドロキシ尿素、トポイソメラーゼ阻害薬（例えば、カンプトテシン、トポテカン、イリノテカン、エトポシド、テニポシド）、モノクローナル抗体（例えば、アレムツズマブ、ベバシズマブ、セツキシマブ、ゲムツズマブ、パニツムマブ、リツキシマブ、トシツモマブ、トラスツズマブ）、ピンカアルカロイド（例えば、ピンクリスチン、ピンプラスチン、ピンデシン、ビノレルビン）、シクロホスファミド、ブレドニゾン、ロイコボリン、オキサリプラチンが挙げられる。

【0184】

30

本開示の協働的投与方法を実施するため、一本鎖RNAi分子を協働的処置プロトコルにおいて、本明細書に記載の、または当該技術分野で知られた1種類以上の二次的または補助的治療用薬剤と同時に、または逐次投与する。協働的投与はいずれの順序で行ってもよく、1種類のみまたは両方（あるいは全部）の活性治療用薬剤が個々に、または総合的にその生物学的活性を奏している間に時限があってもよい。かかるすべての協働的処置法の特徴的な態様は、組成物中に存在する該一本鎖RNAi分子（1種類または複数種）によってある程度の好都合な臨床応答が誘起されるものであり、該臨床応答は、二次的治療用薬剤によってもたらされる二次的臨床応答と併せたものであってもそうでなくともよい。例えば、一本鎖RNAi分子と本明細書において想定される二次的治療用薬剤との協働的投与は、単独での精製された一本鎖RNAi分子および二次的治療用薬剤のいずれかまたは両方によって誘起される治療応答を超える向上した（例えば、相乗的な）治療応答がもたらされ得るものである。

40

50

【0185】

医薬有効用量は、疾患状態を予防する、その発症を抑止する、または疾患状態を処置する（症状をある程度、好ましくはあらゆる症状を緩和する）ために必要とされる用量である。医薬有効用量は、疾患の型、使用される組成物、投与経路、処置対象の被検体の類型、処置の考慮対象の具体的な被検体の身体的特徴（例えば、年齢、体重、一般健康状態、性別、食事）、並行薬物治療、排出速度、薬物併用、治療を行う具体的な疾患の重症度、および医療技術分野の当業者に認識される他の要素に依存する。例えば、約0.1mg/kg～約140mg/kg体重/日の量の活性成分が、本開示の一本鎖RNAi分子の効力に応じて投与され得る（患者1人について1日あたり約0.5mg～約7g）。単回投薬形態を作製するために担体物質と合わされ得る活性成分の量は、処置される宿主および具体的な投与様式に応じて異なる。単位投薬形態には、一般的に約1mg～約500mgの活性成分が含有される。

【0186】

核酸分子は細胞または生物体に、当業者に知られたさまざまな方法、例えば、一本鎖RNAi分子を含む製剤、またはさらに1種類以上のさらなる成分（例えば、薬学的に許容され得る担体、希釈剤、賦形剤、佐剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、保存料など）を含む製剤の投与によって投与され得る。一部の特定の実施形態において、本発明の一本鎖RNAi分子および/またはポリペプチドは、リポソーム内に封入してもよく、イオン導入によって投与してもよく、他の媒体（ヒドロゲル、シクロデキストリン、生分解性ナノカプセル、生体接着性マイクロスフィア、またはタンパク質性ベクターなど）に組み込んでもよい。（例えば、PCT国際公開第00/53722号パンフレットを参照のこと）。あるいはまた、核酸/ペプチド/ビヒクルの組合せを、直接注射または注入ポンプの使用によって局所送達してもよい。本開示の核酸分子の直接注射は、皮下、筋肉内または皮内のいずれであれ、標準的な針と注射器の方法論を用いて、または無針技術（Conroyら、(1999, Clin. Cancer Res. 5: 2330) およびPCT国際公開第99/31262号パンフレットに記載のものなど）によって行なわれ得る。

【0187】

標的遺伝子の発現と関連している障害が処置または予防されるのに充分な量の一本鎖RNAi分子を有する本発明の開示の製剤は、例えば、経表面（例えば、クリーム剤、軟膏、皮膚貼付剤、点眼薬、点耳薬）適用または投与に適したものである。他の投与経路としては、経口、非経口、舌下、膀胱洗浄、経膣、経直腸、腸内、座薬、経鼻、および吸入が挙げられる。用語「非経口」は、本明細書で用いる場合、皮下、静脈内、筋肉内、動脈内、腹内、腹腔内、関節内、眼内または球後、耳内、髄腔内、腔内、腔内、髄腔内、肺内または経肺、滑液囊内、および尿管内注射または注入手法を包含する。また、本発明の開示の組成物は、経口投与のための錠剤、カプセル剤またはエリキシル剤として、経直腸投与のための座剤として、注射による投与のための滅菌された液剤または懸濁剤として、当該技術分野で知られた他の化合物を用いて、またはなしのいずれかで製剤化され、使用され得る。また、非ヒト動物への投与では、該組成物を動物用の飼料または飲料水に添加してもよい。動物が治療に適切な量の該組成物を食餌とともに摂取するように動物用の飼料組成物および飲料水組成物を製剤化することは簡便であり得る。また、該組成物を飼料または飲料水に添加するためのプレミックスとして提示することも簡便であり得る。

【0188】

本発明の一本鎖RNAi分子などの核酸分子の送達のためのさらなる方法は、例えば、Boadoら、1998, J. Pharm. Sci. 87: 1308; Tylerら, 1999, FEBS Lett. 421: 2m; Pardridgeら, 1995, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 92: 5592; Boado, 1995, Adv. Drug Delivery Rev. 15: 73; Aldrian-Herradaら 1998, Nucleic Acids Res. 26: 4910; Tylerら, 1999, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 96: 7053; Akhtarら, 1992, Trends Cell Bio. 2: 139; Deli

10

20

30

40

50

very Strategies for Guide Oligonucleotide Therapeutics」, Akhtar 編, 1995, Maurerら, 1999 Mol. Membr. Biol. 16:129; Leeら, 2000, ACS Symp. Ser. 752:184 に記載されている。インピボ適用および治療適用に加え、当業者には、本発明の開示の一本鎖 RNAi 分子が多種多様なインピトロ適用用途、例えば、科学的および商業的研究（例えば、生理学的経路の解明、創薬および薬物の開発）、ならびに医学的および獣医学的診断に有用であることが認識されよう。

【0189】

本明細書において言及している米国特許、米国特許公開公報、米国特許出願、外国特許、外国特許出願、非特許刊行物、図面およびウェブサイトはすべて、明示的に引用によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0190】

表 1 に、一部の特定の内在性ヒト miRNA 配列を示す。表中、シード配列（確認済または推定）を大文字で示している。表 1 の miRNA 配列はすべて、5' から 3' の向きに示している。本発明の他の miRNA 配列は、miRBase データベース（その内容は引用により本明細書に組み込まれる）において知得され得る。

【0191】

【表 1】

miRNA 名	miRBase 番号	配列	配列番号
hsa-let-7a	MIMAT0000062	UGAGGUAGuagguuguguauaguu	1
hsa-let-7a*	MIMAT0004481	CUAUACAAucuacugucuuuc	2
hsa-let-7a-2*	MIMAT0010195	CUGUACAGccuccuagcuuucc	3
hsa-let-7b	MIMAT0000063	UGAGGUAGuagguugugugguu	4
hsa-let-7b*	MIMAT0004482	CUAUACAAccuacugccuuucc	5
hsa-let-7c	MIMAT0000064	UGAGGUAGuagguuguaugguu	6
hsa-let-7c*	MIMAT0004483	UAGAGUUAcacccuggaguu	7
hsa-let-7d	MIMAT0000065	AGAGGUAGuagguugcauaguu	8
hsa-let-7d*	MIMAT0004484	CUAUACGAccugcugccuuucu	9
hsa-let-7e	MIMAT0000066	UGAGGUAGgagguguguauaguu	10
hsa-let-7e*	MIMAT0004485	CUAUACG Gccuccuagcuuucc	11
hsa-let-7f	MIMAT0000067	UGAGGUAGuagauuguguauaguu	12
hsa-let-7f-1*	MIMAT0004486	CUAUACAAucuauugccuuucc	13
hsa-let-7f-2*	MIMAT0004487	CUAUACAGcuuacugcuuucc	14
hsa-miR-15a	MIMAT0000068	UAGCAGCAcauaaugguuugug	15
hsa-miR-15a*	MIMAT0004488	CAGGCCAUauugugcugccuca	16
hsa-miR-16	MIMAT0000069	UAGCAGCAcguuaauauuggcg	17
hsa-miR-16-1*	MIMAT0004489	CCAGUAUaacugugcugcuga	18
hsa-miR-17	MIMAT0000070	CAAAGUGCuuacagugcaggug	19
hsa-miR-17*	MIMAT0000071	ACUGCAGUGaaggcacuuguag	20
hsa-miR-18a	MIMAT0000072	UAAGGUGCaucuagugcagauag	21
hsa-miR-18a*	MIMAT0002891	ACUGCCCUaagugcuccuucugg	22
hsa-miR-19a*	MIMAT0004490	AGUUUUGCauaguugcacuaca	23
hsa-miR-19a	MIMAT0000073	UGUGCAA Aucuaugcaaaacuga	24
hsa-miR-19b-1*	MIMAT0004491	AGUUUUGCaggugcaggugc	25
hsa-miR-19b	MIMAT0000074	UGUGCAA Auccaugcaaaacuga	26
hsa-miR-19b-2*	MIMAT0004492	AGUUUUGCaggugcaggugcauuu	27
hsa-miR-20a	MIMAT0000075	UAAAGUGCuuauagugcaggug	28
hsa-miR-20a*	MIMAT0004493	ACUGCAUUAugagcacuuuaag	29
hsa-miR-21	MIMAT0000076	UAGCUUAUcagacugauguuga	30

20

30

40

hsa-miR-21*	MIMAT0004494	CAACACCAAgcgaugggcugu	31
hsa-miR-22*	MIMAT0004495	AGUUCUUUAguggcaagcuuua	32
hsa-miR-22	MIMAT0000077	AAGCUGCCaguagaagaacugu	33
hsa-miR-23a*	MIMAT0004496	GGGGUUCCUggggaugggauuu	34
hsa-miR-23a	MIMAT0000078	AUCACAUUgccaggauuucc	35
hsa-miR-24-1*	MIMAT0000079	UGCCUACUgagcugauaucagu	36
hsa-miR-24	MIMAT0000080	UGGCUCAGuucagcaggaaacag	37
hsa-miR-24-2*	MIMAT0004497	UGCCUACUgagcugaaacacag	38
hsa-miR-25*	MIMAT0004498	AGGCGGA Gacuuggcaauug	39
hsa-miR-25	MIMAT0000081	CAUUGCACuugucucggucuga	40
hsa-miR-26a	MIMAT0000082	UUCAAGUAauccaggauaggcu	41
hsa-miR-26a-1*	MIMAT0004499	CCUAUUCUugguuacuuggcag	42
hsa-miR-26b	MIMAT0000083	UUCAAGUAauucaggauagggu	43
hsa-miR-26b*	MIMAT0004500	CCUGUUCUccauuuacuuggcuc	44
hsa-miR-27a*	MIMAT0004501	AGGGCUUAgcugcuugugagca	45
hsa-miR-27a	MIMAT0000084	UUCACAGUggcuaaguuccgc	46
hsa-miR-28-5p	MIMAT0000085	AAGGAGCUcacagucuaauugag	47
hsa-miR-28-3p	MIMAT0004502	CACUAGAUugugagcuccugga	48
hsa-miR-29a*	MIMAT0004503	ACUGAUU Ucuuuugguguucag	49
hsa-miR-29a	MIMAT0000086	UAGCACCAucugaaaucgguua	50
hsa-miR-30a	MIMAT0000087	UGUAAACAAuccucgacuggaag	51
hsa-miR-30a*	MIMAT0000088	CUUUCAGUcggauguuuggcagc	52
hsa-miR-31	MIMAT0000089	AGGCAAGAugcuggcauagcu	53
hsa-miR-31*	MIMAT0004504	UGCUALUGCcaacauuuugccau	54
hsa-miR-32	MIMAT0000090	UAUUGCA Cauuacuaaguugca	55
hsa-miR-32*	MIMAT0004505	CAAUUUA Gugugugugauuuuu	56
hsa-miR-33a	MIMAT0000091	GUGCAUU Guaguugcauugca	57
hsa-miR-33a*	MIMAT0004506	CAAUGUU Uccacagugcaucac	58
hsa-miR-92a-1*	MIMAT0004507	AGGUUGG Gaucggauugcaaugcu	59
hsa-miR-92a	MIMAT0000092	UAUUGCA Cuugccggccugu	60
hsa-miR-92a-2*	MIMAT0004508	GGGUGGG Gauuuguugcauuac	61
hsa-miR-93	MIMAT0000093	CAAAGUGCuguucgugcagguaug	62
hsa-miR-93*	MIMAT0004509	ACUGCUG Agcuagcacuucccg	63
hsa-miR-95	MIMAT0000094	UUCAACGGguuuuuauugagca	64
hsa-miR-96	MIMAT0000095	UUUGGCCA Cauagcacauuuuugcu	65
hsa-miR-96*	MIMAT0004510	AAUCAUG Ugcagugccaaauaug	66
hsa-miR-98	MIMAT0000096	UGAGGUAGuaaguuguaauuguu	67
hsa-miR-99a	MIMAT0000097	AACCCGU Agauccgaucuugug	68
hsa-miR-99a*	MIMAT0004511	CAAGCUCG Cuuucuaugggucug	69
hsa-miR-100	MIMAT0000098	AACCCGU Agauccgaacuugug	70
hsa-miR-100*	MIMAT0004512	CAAGCUU Guaucauauagguaug	71
hsa-miR-101*	MIMAT0004513	CAGUUAU Cacagugcugaugcu	72
hsa-miR-101	MIMAT0000099	UACAGUA Cugugauaacugaa	73
hsa-miR-29b-1*	MIMAT0004514	GCUGGUU Ucauauggugguuuaga	74
hsa-miR-29b	MIMAT0000100	UAGCACCAu uugaaaucaguguu	75
hsa-miR-29b-2*	MIMAT0004515	CUGGUUU Cacaugguggccuuag	76
hsa-miR-103-2*	MIMAT0009196	AGCUUCUU acagugcugccuuug	77
hsa-miR-103	MIMAT0000101	AGCAGCA Uuguacaggccuuga	78
hsa-miR-105	MIMAT0000102	UCAAAUUG Cucagacuccuguggu	79
hsa-miR-105*	MIMAT0004516	ACGGAUGUuugagcaugugcua	80

10

20

30

40

hsa-miR-106a	MIMAT0000103	AAAAGUGCuuacagugcagguag	81
hsa-miR-106a*	MIMAT0004517	CUGCAAUGuaagcaciuuciuac	82
hsa-miR-107	MIMAT0000104	AGCAGCAUuguacaggcuaaca	83
hsa-miR-16-2*	MIMAT0004518	CCAAUAUUacugugcugcuaa	84
hsa-miR-192	MIMAT0000222	CUGACCUAAugaaauugacagcc	85
hsa-miR-192*	MIMAT0004543	CUGCCAAUuccauaggucacag	86
hsa-miR-196a	MIMAT0000226	UAGGUAGUuucauguguuggg	87
hsa-miR-197	MIMAT0000227	UUCACCACCCuucchccacccagc	88
hsa-miR-198	MIMAT0000228	GGUCCAGAGgggagaaaggguuc	89
hsa-miR-199a-5p	MIMAT0000231	CCCAGUGUucagacuaccguuc	90
hsa-miR-199a-3p	MIMAT0000232	ACAGUAGUcugcacauuugguua	91
hsa-miR-208a	MIMAT0000241	AUAAGACCGagcaaaaagcugug	92
hsa-miR-129-5p	MIMAT0000242	CUUUUUGCggucugggcuugc	93
hsa-miR-129*	MIMAT0004548	AAGCCCUUacccaaaaaguau	94
hsa-miR-148a*	MIMAT0004549	AAAGUUCUgagacacuccgacu	95
hsa-miR-148a	MIMAT0000243	UCAGUGCAuacagaacuuugu	96
hsa-miR-30c	MIMAT0000244	UGUAACAAuccuacacucucagc	97
hsa-miR-30c-2*	MIMAT0004550	CUGGGAGAaggcuguuuacu	98
hsa-miR-30d	MIMAT0000245	UGUAAACAAucccgacuggaag	99
hsa-miR-30d*	MIMAT0004551	CUUUCAGUcagauguuuggcugc	100
hsa-miR-139-5p	MIMAT0000250	UCUACAGUgcacgugucuccag	101
hsa-miR-139-3p	MIMAT0004552	GGAGACGCGggccuguuggagu	102
hsa-miR-147	MIMAT0000251	GUGUGUGGaaaugcucugc	103
hsa-miR-7	MIMAT0000252	UGGAAGACuagugauuuugu	104
hsa-miR-7-1*	MIMAT0004553	CAACAAAUcacagucugccaua	105
hsa-miR-7-2*	MIMAT0004554	CAACAAAUcccagucuaccuaa	106
hsa-miR-10a	MIMAT0000253	UACCCUGUUagauccgaaauuugug	107
hsa-miR-10a*	MIMAT0004555	CAAUUCGUaucuaggggaaaua	108
hsa-miR-10b	MIMAT0000254	UACCCUGUagaaccgaauuugug	109
hsa-miR-10b*	MIMAT0004556	ACAGAUUCgauucuaggggaa	110
hsa-miR-34a	MIMAT0000255	UGGCAGUGcucuuagcugguugu	111
hsa-miR-34a*	MIMAT0004557	CAAUCAGCaagauacugccu	112
hsa-miR-181a	MIMAT0000256	AACAUUCAacgcugcugcggugag	113
hsa-miR-181a-2*	MIMAT0004558	ACCACUGAccguugacuguacc	114
hsa-miR-181b	MIMAT0000257	AACAUUCUuugcugcugcgguggu	115
hsa-miR-181c	MIMAT0000258	AACAUUCUAcccugcugcggugag	116
hsa-miR-181c*	MIMAT0004559	AACCAUCGAccguugagggac	117
hsa-miR-182	MIMAT0000259	UUUGGCAAugguagaacucacacu	118
hsa-miR-182*	MIMAT0000260	UGGUUCUAGacuugccaaacua	119
hsa-miR-183	MIMAT0000261	UAUGGCAUgguaaaucacu	120
hsa-miR-183*	MIMAT0004560	GUGAAUUAccgaaggcccauaa	121
hsa-miR-187*	MIMAT0004561	GGCUACAAcacaggaccggc	122
hsa-miR-187	MIMAT0000262	UCGUGUCUuguguugcagccgg	123
hsa-miR-196a*	MIMAT0004562	CGGCAACAAagaaacugccugag	124
hsa-miR-199b-5p	MIMAT0000263	CCCAGUGUuuagacuaucguuc	125
hsa-miR-199b-3p	MIMAT0004563	ACAGUAGUcugcacauuugguua	91
hsa-miR-203	MIMAT0000264	GUGAAAUGuuuaggaccacuag	126
hsa-miR-204	MIMAT0000265	UUCCCCUUUgcuauccuauugccu	127
hsa-miR-205	MIMAT0000266	UCCUUCAUuccaccggagucug	128
hsa-miR-205*	MIMAT0009197	GAUUUCAGuggagugaaguuc	129

10

20

30

40

hsa-miR-210	MIMAT0000267	CUGUGCGUgugacagccgcuga	130
hsa-miR-211	MIMAT0000268	UUCCCUUUgucauccuucgccu	131
hsa-miR-212	MIMAT0000269	UAACAGUCUccagucacggcc	132
hsa-miR-181a*	MIMAT0000270	ACCAUCGAccguugauuguacc	133
hsa-miR-214*	MIMAT0004564	UGCCUGUCuacaciuugcuguc	134
hsa-miR-214	MIMAT0000271	ACAGCAGGcacagacaggcagu	135
hsa-miR-215	MIMAT0000272	AUGACCUAAugaauugacagac	136
hsa-miR-216a	MIMAT0000273	UAAUCUCAGcuggcaacuguga	137
hsa-miR-217	MIMAT0000274	UACUGCAUcaggaacugauugga	138
hsa-miR-218	MIMAT0000275	UUGUGCUUgaucaaccaaugu	139
hsa-miR-218-1*	MIMAT0004565	AUGGUUCCgucaaggccacugg	140
hsa-miR-218-2*	MIMAT0004566	CAUGGUUCgucaaggccacgcg	141
hsa-miR-219-5p	MIMAT0000276	UGAUUGUCcaaacgc当地	142
hsa-miR-219-1-3p	MIMAT0004567	AGAGUUGAgucuggacgucgg	143
hsa-miR-220a	MIMAT0000277	CCACACCGGuauacugacacuuu	144
hsa-miR-221*	MIMAT0004568	ACCUGGCAuacaauguagauuu	145
hsa-miR-221	MIMAT0000278	AGCUACAUugucugcuggguuu	146
hsa-miR-222*	MIMAT0004569	CUCAGUAAGccaguguagaacccu	147
hsa-miR-222	MIMAT0000279	AGCUACAUcuggguacugggu	148
hsa-miR-223*	MIMAT0004570	CGUGUAUUugacaaggcugaguu	149
hsa-miR-223	MIMAT0000280	UGUCAGUUugucaaauacccca	150
hsa-miR-224	MIMAT0000281	CAAGUCACuaguggguuccguu	151
hsa-miR-224*	MIMAT0009198	AAAAUGGUgcccuaagugacuaca	152
hsa-miR-200b*	MIMAT0004571	CAUCUUACugggcagc当地	153
hsa-miR-200b	MIMAT0000318	UAAUACUGccugguaaugauga	154
hsa-let-7g	MIMAT0000414	UGAGGUAGuaguuuguacaguu	155
hsa-let-7g*	MIMAT0004584	CUGUACAGgc当地	156
hsa-let-7i	MIMAT0000415	UGAGGUAGuaguuugugcuguu	157
hsa-let-7i*	MIMAT0004585	CUGCGCAAGcuacugccuugcu	158
hsa-miR-1	MIMAT0000416	UGGAAUGUaaagaaguauuuau	159
hsa-miR-15b	MIMAT0000417	UAGCAGCAcaucaugguuuaca	160
hsa-miR-15b*	MIMAT0004586	CGAAUCAUuauuuugcugcucua	161
hsa-miR-23b*	MIMAT0004587	UGGGUUCCuggcaugcugauuu	162
hsa-miR-23b	MIMAT0000418	AUCACAUUgccc当地	163
hsa-miR-27b*	MIMAT0004588	AGAGCUUAgcugauuggugaac	164
hsa-miR-27b	MIMAT0000419	UUCACAGUggcuaagucugc	165
hsa-miR-30b	MIMAT0000420	UGUAAACAAuccuacacucageu	166
hsa-miR-30b*	MIMAT0004589	CUGGGAGGuggaugguuuacuuc	167
hsa-miR-122	MIMAT0000421	UGGAGUGUgacaauugguuug	168
hsa-miR-122*	MIMAT0004590	AACGCCAUuauccacacuaauua	169
hsa-miR-124*	MIMAT0004591	CGUGUUCAcagccgaccuugau	170
hsa-miR-124	MIMAT0000422	UAAGGCCACgc当地	171
hsa-miR-125b	MIMAT0000423	UCCCCUGAGaccuaacuuguga	172
hsa-miR-125b-1*	MIMAT0004592	ACGGGUUAggc当地	173
hsa-miR-128	MIMAT0000424	UCACAGUGaaccggucucuuu	174
hsa-miR-130a*	MIMAT0004593	UUCACAUUgugcuaucugcugc	175
hsa-miR-130a	MIMAT0000425	CAGUGCAAuguaaaaggccau	176
hsa-miR-132*	MIMAT0004594	ACCGUGGGuuucgauuguacu	177
hsa-miR-132	MIMAT0000426	UAACAGUCuacagccaauggucg	178
hsa-miR-133a	MIMAT0000427	UUUGGUCCccuacaaccagcug	179

10

20

30

40

hsa-miR-135a	MIMAT0000428	UAUGGCUUuuuauuccuauguga	180
hsa-miR-135a*	MIMAT0004595	UAUAGGGAuuggagccguggcg	181
hsa-miR-137	MIMAT0000429	UUAUUGCUsaagaaauacgcguag	182
hsa-miR-138	MIMAT0000430	AGCUGGUGuuguguaucaggccg	183
hsa-miR-138-2*	MIMAT0004596	GCUAUUUCacgcacaccaggguu	184
hsa-miR-140-5p	MIMAT0000431	CAGUGGUUuuuacccuaugguag	185
hsa-miR-140-3p	MIMAT0004597	UACCACAGguagaaccacgg	186
hsa-miR-141*	MIMAT0004598	CAUCUCCAguaacaguguugga	187
hsa-miR-141	MIMAT0000432	UAACACUGucugguaagaugg	188
hsa-miR-142-5p	MIMAT0000433	CAUAAAGUagaaagcacuacu	189
hsa-miR-142-3p	MIMAT0000434	UGUAGUGUuuccuacuuuugga	190
hsa-miR-143*	MIMAT0004599	GGUGCAGUGcugcaucucuggu	191
hsa-miR-143	MIMAT0000435	UGAGAUGAagcacuguagcuc	192
hsa-miR-144*	MIMAT0004600	GGAAUACAucaauacuguaag	193
hsa-miR-144	MIMAT0000436	UACAGUAUagaugauguacu	194
hsa-miR-145	MIMAT0000437	GUCCAGUUuucccaggaaucucc	195
hsa-miR-145*	MIMAT0004601	GGAUUCCUggaaauacuguuu	196
hsa-miR-152	MIMAT0000438	UCAGUGCAugacagaacuugg	197
hsa-miR-153	MIMAT0000439	UUGCAUAGucacaaaagugauc	198
hsa-miR-191	MIMAT0000440	CAACGGAAucccaaagcagcug	199
hsa-miR-191*	MIMAT0001618	GCUGCGCUugguuuucgcccc	200
hsa-miR-9	MIMAT0000441	UCUUUGGUuaucuagcuguauga	201
hsa-miR-9*	MIMAT0000442	AUAAAGCUagauaaccgaaagu	202
hsa-miR-125a-5p	MIMAT0000443	UCCCUGAGaccuuuaaccuguga	203
hsa-miR-125a-3p	MIMAT0004602	ACAGGUGAGguucuugggagcc	204
hsa-miR-125b-2*	MIMAT0004603	UCACAAGUcaggecucuugggac	205
hsa-miR-126*	MIMAT0000444	CAUUAUUAcuuuugguacgcg	206
hsa-miR-126	MIMAT0000445	UCGUACCGugaguaauauggcg	207
hsa-miR-127-5p	MIMAT0004604	CUGAAGCUcagaggcucugau	208
hsa-miR-127-3p	MIMAT0000446	UCGGAUCCgucugagcuiuggcu	209
hsa-miR-129-3p	MIMAT0004605	AAGCCCUUacccaaaaagcau	210
hsa-miR-134	MIMAT0000447	UGUGACUGguugaccagaggg	211
hsa-miR-136	MIMAT0000448	ACUCCAUUuguuuugaugauugga	212
hsa-miR-136*	MIMAT0004606	CAUCAUCCGucucaaauugagcu	213
hsa-miR-138-1*	MIMAT0004607	GCUACUUcacaacaccaggcc	214
hsa-miR-146a	MIMAT0000449	UGAGAACUgaaauuccauggguu	215
hsa-miR-146a*	MIMAT0004608	CCUCUGAAauucagucuucag	216
hsa-miR-149	MIMAT0000450	UCUGGCUCgugucuucacuccc	217
hsa-miR-149*	MIMAT0004609	AGGGAGGGGacggggcugugc	218
hsa-miR-150	MIMAT0000451	UCUCCCAAccuuguaccagug	219
hsa-miR-150*	MIMAT0004610	CUGGUACAGgcugggggacag	220
hsa-miR-154	MIMAT0000452	UAGGUUAUccgugugccuucg	221
hsa-miR-154*	MIMAT0000453	AAUCAUAcacggugaccuauu	222
hsa-miR-184	MIMAT0000454	UGGACGGAgacugauaagggu	223
hsa-miR-185	MIMAT0000455	UGGAGAGAaaggcaguuccuga	224
hsa-miR-185*	MIMAT0004611	AGGGGCUGgcuuiuccucuguc	225
hsa-miR-186	MIMAT0000456	CAAAGAAUucuccuuuuggcuc	226
hsa-miR-186*	MIMAT0004612	GCCCAAAgugaaauuuuugggg	227
hsa-miR-188-5p	MIMAT0000457	CAUCCCUUgcaugguggaggg	228
hsa-miR-188-3p	MIMAT0004613	CUCCCACAAugcaggguuugca	229

10

20

30

40

hsa-miR-190	MIMAT0000458	UGAUUAUGUuugauauauuagg	230
hsa-miR-193a-5p	MIMAT0004614	UGGGUCUUugcgggcgagauga	231
hsa-miR-193a-3p	MIMAT0000459	AACUGGCCuacaaagucccagu	232
hsa-miR-194	MIMAT0000460	UGUAACAGcaacuccauggugga	233
hsa-miR-195	MIMAT0000461	UAGCAGCACagaaaaauuuggc	234
hsa-miR-195*	MIMAT0004615	CCAAUAUUGgcugugcugcucc	235
hsa-miR-206	MIMAT0000462	UGGAAUGUAaggaagugugugg	236
hsa-miR-320a	MIMAT0000510	AAAAGCUGGguugagaggcga	237
hsa-miR-200c*	MIMAT0004657	CGUCUUACccagcaguguuugg	238
hsa-miR-200c	MIMAT0000617	UAUAUCUGccgguaaugaugga	239
hsa-miR-155	MIMAT0000646	UUAAUGCUaaucgugauaggggu	240
hsa-miR-155*	MIMAT0004658	CUCCUACAuauuagcaauaaca	241
hsa-miR-194*	MIMAT0004671	CCAGUGGGGcugcuguuaucug	242
hsa-miR-106b	MIMAT0000680	UAAAGUGCugacagugcagau	243
hsa-miR-106b*	MIMAT0004672	CCGCACUGGggguacuugcugc	244
hsa-miR-29c*	MIMAT0004673	UGACCGAUuucuccugguguiuc	245
hsa-miR-29c	MIMAT0000681	UAGCACCAuugaaaaucggiua	246
hsa-miR-30c-1*	MIMAT0004674	CUGGGAGAGgguuguuuacucc	247
hsa-miR-200a*	MIMAT0001620	CAUCUUACggacagugcugga	248
hsa-miR-200a	MIMAT0000682	UAACACUGucugguaacgaugu	249
hsa-miR-302a*	MIMAT0000683	ACUUAAAACguggaughacuugcu	250
hsa-miR-302a	MIMAT0000684	UAAGUGCUuccauguuuugguga	251
hsa-miR-219-2-3p	MIMAT0004675	AGAAUUGUggcuggacaucugu	252
hsa-miR-34b*	MIMAT0000685	UAGGCAGUgucauuagcugauug	253
hsa-miR-34b	MIMAT0004676	CAAUCACUAacuccacugccau	254
hsa-miR-34c-5p	MIMAT0000686	AGGCAGUGaaguagcugauugc	255
hsa-miR-34c-3p	MIMAT0004677	AAUCACUAaccacacggccagg	256
hsa-miR-299-5p	MIMAT0002890	UGGUUUACcgccccacauacau	257
hsa-miR-299-3p	MIMAT0000687	UAUGUGGGAugghuaaccgcuu	258
hsa-miR-301a	MIMAT0000688	CAGUGCAuaguauuugucaaagc	259
hsa-miR-99b	MIMAT0000689	CACCGUAGaaccgaccuugcgc	260
hsa-miR-99b*	MIMAT0004678	CAAGCUCGugucuguggguccg	261
hsa-miR-296-5p	MIMAT0000690	AGGGCCCCCccucaauccugu	262
hsa-miR-296-3p	MIMAT0004679	GAGGGUUGgguggaggcucucc	263
hsa-miR-130b*	MIMAT0004680	ACUCUUUCcugugcacuac	264
hsa-miR-130b	MIMAT0000691	CAGUGCAAugaugaaaggcau	265
hsa-miR-30e	MIMAT0000692	UGUAAACAuccuugacuggaa	266
hsa-miR-30e*	MIMAT0000693	CUUUCAGUcggauguuuacagc	267
hsa-miR-26a-2*	MIMAT0004681	CCUAUUCUugauuacuuguuuuc	268
hsa-miR-361-5p	MIMAT0000703	UUAUCAGAaucuccagggguac	269
hsa-miR-361-3p	MIMAT0004682	UCCCCCAGgugugauucugauuu	270
hsa-miR-362-5p	MIMAT0000705	AAUCCUUGgaaccuaggugugagu	271
hsa-miR-362-3p	MIMAT0004683	AACACACCuauucaaggauca	272
hsa-miR-363*	MIMAT0003385	CGGGUGGAucacgaugcaauuu	273
hsa-miR-363	MIMAT0000707	AAUUGCACgguauccaucugua	274
hsa-miR-365	MIMAT0000710	UAAUGGCCcuaaaaauccuuau	275
hsa-miR-365*	MIMAT0009199	AGGGACUUcaggggcagcugu	276
hsa-miR-302b*	MIMAT0000714	ACUUUAAACauggaagugcuiuc	277
hsa-miR-302b	MIMAT0000715	UAAGUGCUuccauguuuaguag	278
hsa-miR-302c*	MIMAT0000716	UUUAACAUgggguaccugcug	279

10

20

30

40

hsa-miR-302c	MIMAT0000717	UAAGUGCUuccauguuuucagugg	280
hsa-miR-302d*	MIMAT0004685	ACUUUAACauggaggcacuugc	281
hsa-miR-302d	MIMAT0000718	UAAGUGCUuccauguuugagugu	282
hsa-miR-367*	MIMAT0004686	ACUGUUGCuaauaungcaacucu	283
hsa-miR-367	MIMAT0000719	AAUUGCACuuuagcaaugguga	284
hsa-miR-376c	MIMAT0000720	AACAUAGAgaaaaauccacgu	285
hsa-miR-369-5p	MIMAT0001621	AGAUCGACcguguuaauucgc	286
hsa-miR-369-3p	MIMAT0000721	AAUAAUACaugguugaucuuu	287
hsa-miR-370	MIMAT0000722	GCCUGCUGggguggaaccuggu	288
hsa-miR-371-5p	MIMAT0004687	ACUAAAACugugggggcacu	289
hsa-miR-371-3p	MIMAT0000723	AAGUGCCGccaucuuuugagugu	290
hsa-miR-372	MIMAT0000724	AAAGUGCUgcgacauuugagcgu	291
hsa-miR-373*	MIMAT0000725	ACUAAAIAuggggcgcuuucc	292
hsa-miR-373	MIMAT0000726	GAAGUGCUUcgauuuuggggugu	293
hsa-miR-374a	MIMAT0000727	UUUAUAAUAcaccugauaagug	294
hsa-miR-374a*	MIMAT0004688	CUUAUCAGauuguauuguaauu	295
hsa-miR-375	MIMAT0000728	UUUGUUCGuucggcucgcguga	296
hsa-miR-376a*	MIMAT0003386	GUAGAUUCuccuucuaugagua	297
hsa-miR-376a	MIMAT0000729	AUCAUAGAgaaaaauccacgu	298
hsa-miR-377*	MIMAT0004689	AGAGGUUGccuuggugaaauuc	299
hsa-miR-377	MIMAT0000730	AUCACACAAaggcaacuuuugu	300
hsa-miR-378*	MIMAT0000731	CUCCUGACuccaggcucugugu	301
hsa-miR-378	MIMAT0000732	ACUGGACUuggagucagaagg	302
hsa-miR-379	MIMAT0000733	UGGUAGACuauggaacguagg	303
hsa-miR-379*	MIMAT0004690	UAUGUAACaugguccacacuacu	304
hsa-miR-380*	MIMAT0000734	UGGUUGACcauagaacaugegc	305
hsa-miR-380	MIMAT0000735	UAUGUAUAugguccacacuuu	306
hsa-miR-381	MIMAT0000736	UAUACAAAGgcacugcucugu	307
hsa-miR-382	MIMAT0000737	GAAGUUGUucgugguggauucg	308
hsa-miR-383	MIMAT0000738	AGAUCAGAaggugauuguggcu	309
hsa-miR-340	MIMAT0004692	UUUAUAAAGcaaugagacugauu	310
hsa-miR-340*	MIMAT0000750	UCCGUCUCaguuaacuuuauagc	311
hsa-miR-330-5p	MIMAT0004693	UCUCUGGGuucugugucuuaggc	312
hsa-miR-330-3p	MIMAT0000751	GCAAAGCAcacggccugcagaga	313
hsa-miR-328	MIMAT0000752	CUGGCCCUcucugccuuccgu	314
hsa-miR-342-5p	MIMAT0004694	AGGGGUGCaucugugauuga	315
hsa-miR-342-3p	MIMAT0000753	UCUCACACagaaaaugcaccggu	316
hsa-miR-337-5p	MIMAT0004695	GAACGGCUucauacaggaguu	317
hsa-miR-337-3p	MIMAT0000754	CUCCUAUAugaugccuuuucuuc	318
hsa-miR-323-5p	MIMAT0004696	AGGUGGUUcguggcgcguiucgc	319
hsa-miR-323-3p	MIMAT0000755	CACAUUAACacggucgaccuuu	320
hsa-miR-326	MIMAT0000756	CCUCUGGGuccuuccuccag	321
hsa-miR-151-5p	MIMAT0004697	UCGAGGAAGcucacagucuagu	322
hsa-miR-151-3p	MIMAT0000757	CUAGACUGaagccuugagg	323
hsa-miR-135b	MIMAT0000758	UAUGGCUUucauuccuauguga	324
hsa-miR-135b*	MIMAT0004698	AUGUAGGGGuaaaaagccauggg	325
hsa-miR-148b*	MIMAT0004699	AAGUUCUGuuaacacucaggc	326
hsa-miR-148b	MIMAT0000759	UCAGUGCAucacagaacuuugu	327
hsa-miR-331-5p	MIMAT0004700	CUAGGUAUggucccagggaucc	328
hsa-miR-331-3p	MIMAT0000760	GCCCCUGGGuccuaucuagaa	329

10

20

30

40

hsa-miR-324-5p	MIMAT0000761	CGCAUCCCcuagggcauuggugu	330
hsa-miR-324-3p	MIMAT0000762	ACUGCCCCaggugcugcugg	331
hsa-miR-338-5p	MIMAT0004701	AACAAUAUccuggugcugagug	332
hsa-miR-338-3p	MIMAT0000763	UCCAGCAUcaguguuuuuguug	333
hsa-miR-339-5p	MIMAT0000764	UCCCUGUCCuuccaggagcucacg	334
hsa-miR-339-3p	MIMAT0004702	UGAGCGCCUcgacgacagagccg	335
hsa-miR-335	MIMAT0000765	UCAAGAGCaauaacgaaaaaugu	336
hsa-miR-335*	MIMAT0004703	UUUUUCAUuaauugcuccugacc	337
hsa-miR-133b	MIMAT0000770	UUUGGUCCCcuaaccaggcua	338
hsa-miR-325	MIMAT0000771	CCUAGUAGguguccaguaagugu	339
hsa-miR-345	MIMAT0000772	GCUGACUCUcuagguccaggcuc	340
hsa-miR-346	MIMAT0000773	UGUCUGCCcgcaugccugccucu	341
hsa-miR-384	MIMAT0001075	AUUCCUAGaaauuugucaua	342
hsa-miR-196b	MIMAT0001080	UAGGUAGUuuccuguuguuggg	343
hsa-miR-196b*	MIMAT0009201	UCGACAGCacgacacugccuuc	344
hsa-miR-422a	MIMAT0001339	ACUGGACUuagggucagaaggc	345
hsa-miR-423-5p	MIMAT0004748	UGAGGGGCagagagcgagacuuu	346
hsa-miR-423-3p	MIMAT0001340	AGCUCGGUcugaggccccucagu	347
hsa-miR-424	MIMAT0001341	CAGCAGCAauucauguuuugaa	348
hsa-miR-424*	MIMAT0004749	CAAAACGUgaggcgcugcuau	349
hsa-miR-425	MIMAT0003393	AAUGACACGaucacucccguuga	350
hsa-miR-425*	MIMAT0001343	AUCGGGAAugucguguccgccc	351
hsa-miR-18b	MIMAT0001412	UAAGGUGCaucuagugcaguuag	352
hsa-miR-18b*	MIMAT0004751	UGCCCUAAAaugccccuucuggc	353
hsa-miR-20b	MIMAT0001413	CAAAGUGCaucuagugcaggua	354
hsa-miR-20b*	MIMAT0004752	ACUGUAGUaugggcacuuccag	355
hsa-miR-448	MIMAT0001532	UUGCAUAUguaggauguccau	356
hsa-miR-429	MIMAT0001536	UAAAACUGucugguaaaaccgu	357
hsa-miR-449a	MIMAT0001541	UGGCAGUGuauuguuagcuggu	358
hsa-miR-450a	MIMAT0001545	UUUUGCGAUGuguuccuauau	359
hsa-miR-431	MIMAT0001625	UGCUUUGCaggccgucaugca	360
hsa-miR-431*	MIMAT0004757	CAGGUCGUcuugcaggccuucu	361
hsa-miR-433	MIMAT0001627	AUCAUGAUgggcuccucggugu	362
hsa-miR-329	MIMAT0001629	AACACACCugguuaacccuuu	363
hsa-miR-451	MIMAT0001631	AAACCGUUaccuuacugaguu	364
hsa-miR-452	MIMAT0001635	AACUGUUUUgcagagggaaacuga	365
hsa-miR-452*	MIMAT0001636	CUCAUCUGcaaagaaguagug	366
hsa-miR-409-5p	MIMAT0001638	AGGUUACCCgagcaacuungcau	367
hsa-miR-409-3p	MIMAT0001639	GAAUGUUGcucggugaaccccu	368
hsa-miR-412	MIMAT0002170	ACUUCACCuggucccacuagccgu	369
hsa-miR-410	MIMAT0002171	AAUAUAACacagaugggcugu	370
hsa-miR-376b	MIMAT0002172	AUCAUAGAggaaaauccaunguu	371
hsa-miR-483-5p	MIMAT0004761	AAGACGGGAGggaaagaagggag	372
hsa-miR-483-3p	MIMAT0002173	UCACUCCUcuuccuccgucuu	373
hsa-miR-484	MIMAT0002174	UCAGGCCUAGccccucccgau	374
hsa-miR-485-5p	MIMAT0002175	AGAGGCUGgcgcugugaauuc	375
hsa-miR-485-3p	MIMAT0002176	GUCAUACACggcucuccucuu	376
hsa-miR-486-5p	MIMAT0002177	UCCUGUACugagcugcccgag	377
hsa-miR-486-3p	MIMAT0004762	CGGGGCCAGGucaguacaggau	378
hsa-miR-487a	MIMAT0002178	AAUCAUACaggacauccaguu	379

10

20

30

40

hsa-miR-488*	MIMAT0002804	CCCAGAUAAuggcacucucaa	380
hsa-miR-488	MIMAT0004763	UUGAAAGGGuauuuucuugguc	381
hsa-miR-489	MIMAT0002805	GUGACAUCCacauauacggcagc	382
hsa-miR-490-5p	MIMAT0004764	CCAUGGAUCuccaggugggu	383
hsa-miR-490-3p	MIMAT0002806	CAACCUGGAGggacuccaungcug	384
hsa-miR-491-5p	MIMAT0002807	AGUGGGGAacccuuuccaungagg	385
hsa-miR-491-3p	MIMAT0004765	CUUAUGCAagauuuccuucuac	386
hsa-miR-511	MIMAT0002808	GUGUCUUUUugcucugcaguca	387
hsa-miR-146b-5p	MIMAT0002809	UGAGAACUgaauuccaunggu	388
hsa-miR-146b-3p	MIMAT0004766	UGCCCUUGUggacucaguuucugg	389
hsa-miR-202*	MIMAT0002810	UUCCUAUGcauaucuuucuug	390
hsa-miR-202	MIMAT0002811	AGAGGUUAugggcuaagggaa	391
hsa-miR-492	MIMAT0002812	AGGACCUGCgggacaagauucuu	392
hsa-miR-493*	MIMAT0002813	UUGUACAUUggguaggcuuuucuu	393
hsa-miR-493	MIMAT0003161	UGAAGGUUCuacugugugccagg	394
hsa-miR-432	MIMAT0002814	UCUUGGAGuaggcauugggugg	395
hsa-miR-432*	MIMAT0002815	CUGGAUGGGuuccuccaungcuc	396
hsa-miR-494	MIMAT0002816	UGAAACAUacacgggaaaccuc	397
hsa-miR-495	MIMAT0002817	AAACAAAACaugggcacaucuu	398
hsa-miR-496	MIMAT0002818	UGAGUAUUacauggccaaucuc	399
hsa-miR-193b*	MIMAT0004767	CGGGGUUUugagggcgagaauga	400
hsa-miR-193b	MIMAT0002819	AACUGGCCuuccaaagucccgcu	401
hsa-miR-497	MIMAT0002820	CAGCAGCACacugugguuugu	402
hsa-miR-497*	MIMAT0004768	CAAACCAACacugugguguaga	403
hsa-miR-181d	MIMAT0002821	AAACAUUCAnuguugucggugggu	404
hsa-miR-512-5p	MIMAT0002822	CACUCAGCCuugagggcacuuuc	405
hsa-miR-512-3p	MIMAT0002823	AAGUGCUGucauagcugagguc	406
hsa-miR-498	MIMAT0002824	UUUCAAGCcacggggcguuuuuc	407
hsa-miR-520e	MIMAT0002825	AAAGUGCUUccuuuuuugaggg	408
hsa-miR-515-5p	MIMAT0002826	UUCUCCAAAagaaagcacuuucug	409
hsa-miR-515-3p	MIMAT0002827	GAGUGCCUucuuuuuggagcguu	410
hsa-miR-519e*	MIMAT0002828	UUCUCCAAAagggagcacuuuc	411
hsa-miR-519e	MIMAT0002829	AAGUGCCUccuuuuuagagugu	412
hsa-miR-520f	MIMAT0002830	AAGUGCUCuuuuuagaggggu	413
hsa-miR-519c-5p	MIMAT0002831	CUCUAGAGgaaagcgcuuucug	414
hsa-miR-519c-3p	MIMAT0002832	AAAGUGCAucuuuuuagaggau	415
hsa-miR-520a-5p	MIMAT0002833	CUCCAGAGggaaguacuuucu	416
hsa-miR-520a-3p	MIMAT0002834	AAAGUGCUUccuuuuuggacugu	417
hsa-miR-526b	MIMAT0002835	CUCUUGAGggaagcacuuucug	418
hsa-miR-526b*	MIMAT0002836	GAAAGUGCUCuuuuuagaggc	419
hsa-miR-519b-5p	MIMAT0005454	CUCUAGAGggaagcgcuuucug	414
hsa-miR-519b-3p	MIMAT0002837	AAAGUGCAuccuuuuuagagguu	420
hsa-miR-525-5p	MIMAT0002838	CUCCAGAGggaagcacuuucu	421
hsa-miR-525-3p	MIMAT0002839	GAAGGCGCUCuuuuuagaggcg	422
hsa-miR-523*	MIMAT0005449	CUCUAGAGggaagcgcuuucug	414
hsa-miR-523	MIMAT0002840	GAACGCGCUCuuuuuagagggu	423
hsa-miR-518f*	MIMAT0002841	CUCUAGAGggaagcacuuucue	424
hsa-miR-518f	MIMAT0002842	GAAAGCGCUCuuuuuagagg	425
hsa-miR-520b	MIMAT0002843	AAAGUGCUUccuuuuuagaggg	426
hsa-miR-518b	MIMAT0002844	CAAAGCGCUCuuuuuagaggu	427

10

20

30

40

hsa-miR-526a	MIMAT0002845	CUCUAGAGggaagcacuuucug	428
hsa-miR-520c-5p	MIMAT0005455	CUCUAGAGggaagcacuuucug	428
hsa-miR-520c-3p	MIMAT0002846	AAAGUGCUuccuuuagagggu	429
hsa-miR-518c*	MIMAT0002847	UCUCUGGAggaaagcacuuucug	430
hsa-miR-518c	MIMAT0002848	CAAAGCGCuucuuuagagugu	431
hsa-miR-524-5p	MIMAT0002849	CUACAAAGggaagcacuuucuc	432
hsa-miR-524-3p	MIMAT0002850	GAAGGCGCuuccuuuggaguu	433
hsa-miR-517*	MIMAT0002851	CCUCUAGAuggaagcacuguc	434
hsa-miR-517a	MIMAT0002852	AUCGUGCAuccuuuagagugu	435
hsa-miR-519d	MIMAT0002853	CAAAGUGCcuuccuuuagagug	436
hsa-miR-521	MIMAT0002854	AACGCACUuccuuuagagugu	437
hsa-miR-520d-5p	MIMAT0002855	CUACAAAGggaagcccuuuc	438
hsa-miR-520d-3p	MIMAT0002856	AAAGUGCUucuuugggggg	439
hsa-miR-517b	MIMAT0002857	UCGUGCAUccuuuagagugu	440
hsa-miR-520g	MIMAT0002858	ACAAAGUGcuuuccuuuagagugu	441
hsa-miR-516b	MIMAT0002859	AUCUGGAAGuaagaagcacuuu	442
hsa-miR-516b*	MIMAT0002860	UGCUUCCUuucagagggu	443
hsa-miR-518e*	MIMAT0005450	CUCUAGAGggaagcgcuuucug	414
hsa-miR-518e	MIMAT0002861	AAAGCGCUuccuuucagagug	444
hsa-miR-518a-5p	MIMAT0005457	CUGCAAAGggaagcccuuuc	445
hsa-miR-518a-3p	MIMAT0002863	GAAAGCGCuuccuuuugcugga	446
hsa-miR-518d-5p	MIMAT0005456	CUCUAGAGggaagcacuuucug	428
hsa-miR-518d-3p	MIMAT0002864	CAAAGCGCuuccuuuuggagc	447
hsa-miR-517c	MIMAT0002866	AUCGUGCAuccuuuagagugu	448
hsa-miR-520h	MIMAT0002867	ACAAAGUGcuuuccuuuagagu	449
hsa-miR-522*	MIMAT0005451	CUCUAGAGggaagcgcuuucug	414
hsa-miR-522	MIMAT0002868	AAAUGGUuccuuuagagugu	450
hsa-miR-519a*	MIMAT0005452	CUCUAGAGggaagcgcuuucug	414
hsa-miR-519a	MIMAT0002869	AAAGUGCAuccuuuagagugu	451
hsa-miR-527	MIMAT0002862	CUGCAAAGggaagcccuuuc	445
hsa-miR-516a-5p	MIMAT0004770	UUCUCGAAGaaagaagcacuuu	452
hsa-miR-516a-3p	MIMAT0006778	UGCUUCCUuucagagggu	443
hsa-miR-499-5p	MIMAT0002870	UUAAGACUugcagugauguuu	453
hsa-miR-499-3p	MIMAT0004772	AACAUCAAGcaagucugugcu	454
hsa-miR-500	MIMAT0004773	UAAUCCUUGcuaccuggugaga	455
hsa-miR-500*	MIMAT0002871	AUGCACCUUggcaaggauucug	456
hsa-miR-501-5p	MIMAT0002872	AAUCCUUUGucccuggugaga	457
hsa-miR-501-3p	MIMAT0004774	AAUGCACCgggcaaggauucu	458
hsa-miR-502-5p	MIMAT0002873	AUCCUUGCuauccuggugcua	459
hsa-miR-502-3p	MIMAT0004775	AAUGCACCuggcaaggauuca	460
hsa-miR-503	MIMAT0002874	UAGCAGCGggaacaguucugcag	461
hsa-miR-504	MIMAT0002875	AGACCCUGgucugcacucuauc	462
hsa-miR-505*	MIMAT0004776	GGGAGCCAggaaguauugagu	463
hsa-miR-505	MIMAT0002876	CGUCAACAcuugcugguuuuccu	464
hsa-miR-513a-5p	MIMAT0002877	UUCACAGGgaggugucau	465
hsa-miR-513a-3p	MIMAT0004777	UAAAUUUCaccuuucugagaagg	466
hsa-miR-506	MIMAT0002878	UAAGGCACcucuugagugu	467
hsa-miR-507	MIMAT0002879	UUUUGCACuuuuuggagugaa	468
hsa-miR-508-5p	MIMAT0004778	UACUCCAAGggcgcucacucaug	469
hsa-miR-508-3p	MIMAT0002880	UGAUUGUAAGccuuuuggaguaga	470

10

20

30

40

hsa-miR-509-5p	MIMAT0004779	UACUGCAGacaguggcaauca	471
hsa-miR-509-3p	MIMAT0002881	UGAUUGGUacgucuguggguag	472
hsa-miR-510	MIMAT0002882	UACUCAGGagaguggcaucac	473
hsa-miR-514	MIMAT0002883	AUUGACACuucugaggaguaga	474
hsa-miR-532-5p	MIMAT0002888	CAUGCCTUgaguguaggaccgu	475
hsa-miR-532-3p	MIMAT0004780	CCUCCCAcaccaggcuugca	476
hsa-miR-455-5p	MIMAT0003150	UAUGUGCCuuggacuacaucg	477
hsa-miR-455-3p	MIMAT0004784	GCAGUCCAugggc当地auacac	478
hsa-miR-539	MIMAT0003163	GGAGAAAUuaucuuggugugu	479
hsa-miR-544	MIMAT0003164	AUUCUGCAuuuuuagcaaguic	480
hsa-miR-545*	MIMAT0004785	UCAGUAAAguuuauuagauga	481
hsa-miR-545	MIMAT0003165	UCAGCAAAcauuuauugugugc	482
hsa-miR-487b	MIMAT0003180	AAUCGUACagggucauccacuu	483
hsa-miR-551a	MIMAT0003214	GCGACCCAcucuugguuucca	484
hsa-miR-552	MIMAT0003215	AACAGGUAGcugguuagacaa	485
hsa-miR-553	MIMAT0003216	AAAACGGUgaguuuuguuuu	486
hsa-miR-554	MIMAT0003217	GCUAGUCCUgacucagccagu	487
hsa-miR-92b*	MIMAT0004792	AGGGACGGgacgcccggcagug	488
hsa-miR-92b	MIMAT0003218	UAUUGCACucgucggccucc	489
hsa-miR-555	MIMAT0003219	AGGGUAAGcugaaccucugau	490
hsa-miR-556-5p	MIMAT0003220	GAUGAGCUcauuguaauugag	491
hsa-miR-556-3p	MIMAT0004793	AUAUUACCAuuuagcucaucuu	492
hsa-miR-557	MIMAT0003221	GUUUGCACggguggggccuugucu	493
hsa-miR-558	MIMAT0003222	UGAGCUGCuguaccaaaau	494
hsa-miR-559	MIMAT0003223	UAAAGUAauauugccaaaaaa	495
hsa-miR-561	MIMAT0003225	CAAAGUUUaagaaccuugaagu	496
hsa-miR-562	MIMAT0003226	AAAGUAGCuguaccauuugc	497
hsa-miR-563	MIMAT0003227	AGGUUGACauacguuuccc	498
hsa-miR-564	MIMAT0003228	AGGCACGGugucagcaggc	499
hsa-miR-566	MIMAT0003230	GGGCGCCUgugaucccaac	500
hsa-miR-567	MIMAT0003231	AGUAUGUUcuiuccaggacagaac	501
hsa-miR-568	MIMAT0003232	AUGUAUAAauguaucacac	502
hsa-miR-551b*	MIMAT0004794	GAAAUCAAgcguggugagacc	503
hsa-miR-551b	MIMAT0003233	GCGACCCAcuacuugguuucag	504
hsa-miR-569	MIMAT0003234	AGUAAAUGaauccugaaagu	505
hsa-miR-570	MIMAT0003235	CGAAAACAgcaauuaccuuugc	506
hsa-miR-571	MIMAT0003236	UGAGUUGGccaucugagugag	507
hsa-miR-572	MIMAT0003237	GUCCGGCUUggcggugggccca	508
hsa-miR-573	MIMAT0003238	CUGAAGUGaugguuaacugaucag	509
hsa-miR-574-5p	MIMAT0004795	UGAGUGUGugugugugugugu	510
hsa-miR-574-3p	MIMAT0003239	CACGCUCUAugcacacaccaca	511
hsa-miR-575	MIMAT0003240	GAGCCAGUuggacaggagc	512
hsa-miR-576-5p	MIMAT0003241	AUUCUAAUuucuccacgucuu	513
hsa-miR-576-3p	MIMAT0004796	AAGAUGUGaaaaauuggaauc	514
hsa-miR-577	MIMAT0003242	UAGAUAAAauauugguaccug	515
hsa-miR-578	MIMAT0003243	CUUCUUGUGcucuaggauugu	516
hsa-miR-579	MIMAT0003244	UUCAUUUGguauaaaccgcgcauu	517
hsa-miR-580	MIMAT0003245	UUGAGAAUgaugaaucauagg	518
hsa-miR-581	MIMAT0003246	UCUUGUGUucucuagauagu	519
hsa-miR-582-5p	MIMAT0003247	UUACAGUUguucaaccaguuacu	520

hsa-miR-582-3p	MIMAT0004797	UAACUGGUugaacaacugaacc	521
hsa-miR-583	MIMAT0003248	CAAAGAGGAGaagggucccauuac	522
hsa-miR-584	MIMAT0003249	UUAUGGUUugccugggacugag	523
hsa-miR-585	MIMAT0003250	UGGGCGUAucuguaugcua	524
hsa-miR-548a-3p	MIMAT0003251	CAAAACUGGcauuacuuuugc	525
hsa-miR-586	MIMAT0003252	UAUGCAUUguaaaaaaaaaggucc	526
hsa-miR-587	MIMAT0003253	UUUCCAUAggugauagagucac	527
hsa-miR-548b-5p	MIMAT0004798	AAAAGUAAnuggugguuuuggcc	528
hsa-miR-548b-3p	MIMAT0003254	CAAGAACCUcucaguugccuuugu	529
hsa-miR-588	MIMAT0003255	UUGGCCACaauggguuagaac	530
hsa-miR-589	MIMAT0004799	UGAGAACCCacgucugcucugag	531
hsa-miR-589*	MIMAT0003256	UCAGAACAAaaugccgguuucccaga	532
hsa-miR-550	MIMAT0004800	AGUGCCUGGagggaguaagagccc	533
hsa-miR-550*	MIMAT0003257	UGUCUUACucccucaggcacau	534
hsa-miR-590-5p	MIMAT0003258	GAGCUUAUucauaaaagugcag	535
hsa-miR-590-3p	MIMAT0004801	UAUUUUUAuguauaaagcuagu	536
hsa-miR-591	MIMAT0003259	AGACCAUGGguucucauugu	537
hsa-miR-592	MIMAT0003260	UUGUGUCAauaaugcgaugaugu	538
hsa-miR-593*	MIMAT0003261	AGGCACCAggccaggcauugcucagc	539
hsa-miR-593	MIMAT0004802	UGUCUCUGcugggguuucu	540
hsa-miR-595	MIMAT0003263	GAAGUGUGccguggugugucu	541
hsa-miR-596	MIMAT0003264	AAGCCUGCccggcuccucggg	542
hsa-miR-597	MIMAT0003265	UGUGUCAUcugauugaccacugu	543
hsa-miR-598	MIMAT0003266	UACGUCAUcguugucaucguca	544
hsa-miR-599	MIMAT0003267	GUUGUGUCaguuuaucaaac	545
hsa-miR-548a-5p	MIMAT0004803	AAAAGUAAnuggcgaguuuacc	546
hsa-miR-600	MIMAT0003268	ACUUACAGacaaggccuugcuc	547
hsa-miR-601	MIMAT0003269	UGGUCUAGgauuuguggaggag	548
hsa-miR-602	MIMAT0003270	GACACGGGcgcacagcugccccc	549
hsa-miR-603	MIMAT0003271	CACACACUgcauuuacuuuugc	550
hsa-miR-604	MIMAT0003272	AGGCUGCGgaauuucaggac	551
hsa-miR-605	MIMAT0003273	AAAAUCCCauggggccuucuccu	552
hsa-miR-606	MIMAT0003274	AAACUACUgaaaaucaaagau	553
hsa-miR-607	MIMAT0003275	GUUCAAAUccagaucauaac	554
hsa-miR-608	MIMAT0003276	AGGGGUGGGuuuggacagccgu	555
hsa-miR-609	MIMAT0003277	AGGGGUGUUucucucaucucu	556
hsa-miR-610	MIMAT0003278	UGAGCUAAaugugugcuggga	557
hsa-miR-611	MIMAT0003279	GCGAGGACCCCucggggcugac	558
hsa-miR-612	MIMAT0003280	GCUGGGCAgggcuucugagccuu	559
hsa-miR-613	MIMAT0003281	AGGAAUGUuccuuuucuuugcc	560
hsa-miR-614	MIMAT0003282	GAACGCCUguuucuuggccaggugg	561
hsa-miR-615-5p	MIMAT0004804	GGGGGUCCccggugcuggauc	562
hsa-miR-615-3p	MIMAT0003283	UCCGAGCCuggguccuucuu	563
hsa-miR-616*	MIMAT0003284	ACUCAAAAccuuucagugacuu	564
hsa-miR-616	MIMAT0004805	AGUCAUUGgaggguuugagcag	565
hsa-miR-548c-5p	MIMAT0004806	AAAAGUAAnugggguuuuggcc	566
hsa-miR-548c-3p	MIMAT0003285	CAAAAUUcucauuuacuuuugc	567
hsa-miR-617	MIMAT0003286	AGACUUCUCCauuugaagguggc	568
hsa-miR-618	MIMAT0003287	AAACUCUACuuguccuucugagu	569
hsa-miR-619	MIMAT0003288	GACCUGGAcauguuuugugccagu	570

10

20

30

40

hsa-miR-620	MIMAT0003289	AUGGAGAUagauauagaaaau	571
hsa-miR-621	MIMAT0003290	GGCUAGCAacagcgcuaccu	572
hsa-miR-622	MIMAT0003291	ACAGUCUGcugaggugggc	573
hsa-miR-623	MIMAT0003292	AUCCCUUGcagggcuguuggu	574
hsa-miR-624*	MIMAT0003293	UAGUACCAguaccuuguguca	575
hsa-miR-624	MIMAT0004807	CACAAGGUauugguaauaccu	576
hsa-miR-625	MIMAT0003294	AGGGGGAAaguucuauagucc	577
hsa-miR-625*	MIMAT0004808	GACUAUAGaacuucccccuca	578
hsa-miR-626	MIMAT0003295	AGCUGUCUgaaaaaugucuu	579
hsa-miR-627	MIMAT0003296	GUGAGUCUcuaagaaaagagga	580
hsa-miR-628-5p	MIMAT0004809	AUGCUGACauauuuacuagagg	581
hsa-miR-628-3p	MIMAT0003297	UCUAGUAAGaguggcagucga	582
hsa-miR-629	MIMAT0004810	UGGGUUUAcguugggagaacu	583
hsa-miR-629*	MIMAT0003298	GUUCUCCCacguaagccgc	584
hsa-miR-630	MIMAT0003299	AGUAUUCUguaccaggaaaggu	585
hsa-miR-631	MIMAT0003300	AGACCUGGCCCCagaccucagc	586
hsa-miR-33b	MIMAT0003301	GUGCAUUGcuguugcauugc	587
hsa-miR-33b*	MIMAT0004811	CAGUGCCUcgccagugcagccc	588
hsa-miR-632	MIMAT0003302	GUGUCUGCuuccuguggga	589
hsa-miR-633	MIMAT0003303	CUAAUAGUaucuaccacaauaaa	590
hsa-miR-634	MIMAT0003304	AACCAGCACcccaacuuuggac	591
hsa-miR-635	MIMAT0003305	ACUUGGGCacugaaacaauugucc	592
hsa-miR-636	MIMAT0003306	UGUGCUUGcucguccgcggcga	593
hsa-miR-637	MIMAT0003307	ACUGGGGGCuuucggcucugcgu	594
hsa-miR-638	MIMAT0003308	AGGGAUCCGcgccggggcggccu	595
hsa-miR-639	MIMAT0003309	AUCGCUGCgguugcggcggcgu	596
hsa-miR-640	MIMAT0003310	AUGAUCCAggaaccugccucu	597
hsa-miR-641	MIMAT0003311	AAAGACAUaggauagagucaccuc	598
hsa-miR-642	MIMAT0003312	GUCCCUCUccaaaugugucuug	599
hsa-miR-643	MIMAT0003313	ACUUGUAUgcuagcucagguaug	600
hsa-miR-644	MIMAT0003314	AGUGUGGCuuucuuagagc	601
hsa-miR-645	MIMAT0003315	UCUAGGCUGguacugcuga	602
hsa-miR-646	MIMAT0003316	AAGCAGCUgcucugaggc	603
hsa-miR-647	MIMAT0003317	GUGGCUGCacucacuuuccuuc	604
hsa-miR-648	MIMAT0003318	AAGUGUGCaggccacuggu	605
hsa-miR-649	MIMAT0003319	AAACCUGUGuuguucaagaguc	606
hsa-miR-650	MIMAT0003320	AGGAGGCAGcgcucucaggac	607
hsa-miR-651	MIMAT0003321	UUUAGGAUagcugacuuuug	608
hsa-miR-652	MIMAT0003322	AAUGGCGCcacuaggguugug	609
hsa-miR-548d-5p	MIMAT0004812	AAAAGUAUuugugguuuuuugcc	610
hsa-miR-548d-3p	MIMAT0003323	CAAAAACCacaguuuuuuugc	611
hsa-miR-661	MIMAT0003324	UGCCUGGGGcucugccugcgcgu	612
hsa-miR-662	MIMAT0003325	UCCCACGUuguggccacgcag	613
hsa-miR-663	MIMAT0003326	AGGCAGGGGcgcggcggacgc	614
hsa-miR-449b	MIMAT0003327	AGGCAGUGuauuguuagcuggc	615
hsa-miR-449b*	MIMAT0009203	CAGCCACAAacuaccugccacu	616
hsa-miR-653	MIMAT0003328	GUGUUGAAacaauucuacug	617
hsa-miR-411	MIMAT0003329	UAGUAGACguauagcguacg	618
hsa-miR-411*	MIMAT0004813	UAUGUAAACacggguccacuaacc	619
hsa-miR-654-5p	MIMAT0003330	UGGUGGGCcgagaacauguc	620

10

20

30

40

hsa-miR-654-3p	MIMAT0004814	UAUGUCUGcugaccacuccuu	621
hsa-miR-655	MIMAT0003331	AUAAUACAugguuaaccucuu	622
hsa-miR-656	MIMAT0003332	AAUAUUAUacagucaaccuu	623
hsa-miR-549	MIMAT0003333	UGACAACUauggaugagcucu	624
hsa-miR-657	MIMAT0003335	GGCAGGUUCucacccuecuagg	625
hsa-miR-658	MIMAT0003336	GGCGGAGGGAaguaggguccguugg	626
hsa-miR-659	MIMAT0003337	CUUGGUUCagggaggguccca	627
hsa-miR-660	MIMAT0003338	UACCCAUUgcuaucggaguuug	628
hsa-miR-421	MIMAT0003339	AUCAACAGacauuaauugggcgc	629
hsa-miR-542-5p	MIMAT0003340	UCGGGGAUcaucaugucacgaga	630
hsa-miR-542-3p	MIMAT0003389	UGUGACAGauugauaacugaaa	631
hsa-miR-758	MIMAT0003879	UUUGUGACcuggguccacuaacc	632
hsa-miR-1264	MIMAT0005791	CAAGUCUUauuugagcaccuguu	633
hsa-miR-671-5p	MIMAT0003880	AGGAAGCCcuggagggcuggag	634
hsa-miR-671-3p	MIMAT0004819	UCCGGUUCucagggcuccacc	635
hsa-miR-668	MIMAT0003881	UGUCACUCggcucggccacuac	636
hsa-miR-767-5p	MIMAT0003882	UGCACCAUggiugucugagcaug	637
hsa-miR-767-3p	MIMAT0003883	UCUGCUCAuaccccauugguuuu	638
hsa-miR-1224-5p	MIMAT0005458	GUGAGGACucggagggugg	639
hsa-miR-1224-3p	MIMAT0005459	CCCCACCUccucucuccucag	640
hsa-miR-320b	MIMAT0005792	AAAAGCUUggwugagaggcua	641
hsa-miR-320c	MIMAT0005793	AAAAGCUUggwugagagggu	642
hsa-miR-1296	MIMAT0005794	UUAGGGCCcuggcuccaucucc	643
hsa-miR-1468	MIMAT0006789	CUCCGUUUgcccuguuuegcug	644
hsa-miR-1323	MIMAT0005795	UCAAAACUgagggcauuuuuu	645
hsa-miR-1271	MIMAT0005796	CUUGGCAUcuaugcaagcacuca	646
hsa-miR-1301	MIMAT0005797	UUGCAGCUgcccugggagugacuuc	647
hsa-miR-454*	MIMAT0003884	ACCCUAUcaauauugucucugc	648
hsa-miR-454	MIMAT0003885	UAGUGCAUaauuugcuuauagggu	649
hsa-miR-1185	MIMAT0005798	AGAGGAUAccuuuugguauuu	650
hsa-miR-449c	MIMAT0010251	UAGGCAGUguauugcuaugccggcugu	651
hsa-miR-449c*	MIMAT0013771	UUGCUAGUugcacuccucucugu	652
hsa-miR-1283	MIMAT0005799	UCUACAAAggaaagcgcuuuuu	653
hsa-miR-769-5p	MIMAT0003886	UGAGACCUCggguuucugagcu	654
hsa-miR-769-3p	MIMAT0003887	CUGGGAUCuccgggcuuugguu	655
hsa-miR-766	MIMAT0003888	ACUCCAGCcccacagccucagc	656
hsa-miR-762	MIMAT0010313	GGGGCUGGggccggggccgagc	657
hsa-miR-802	MIMAT0004185	CAGUAACAAagauucauccuugu	658
hsa-miR-670	MIMAT0010357	GUCCCCUGAGuguauguggug	659
hsa-miR-1298	MIMAT0005800	UUCAUUCGgcuguccagaaugua	660
hsa-miR-2113	MIMAT0009206	AUUUGUGCuuggcucugucac	661
hsa-miR-761	MIMAT0010364	GCAGCAGGgugaaacugacaca	662
hsa-miR-764	MIMAT0010367	GCAGGUGUCucacuuguccuccu	663
hsa-miR-759	MIMAT0010497	GCAGAGUGcaaacaauuuugac	664
hsa-miR-765	MIMAT0003945	UGGAGGAGaaggaaaggugaug	665
hsa-miR-770-5p	MIMAT0003948	UCCAGUACcacgugucaggccca	666
hsa-miR-675	MIMAT0004284	UGGUGCGGagagggcccacagug	667
hsa-miR-675*	MIMAT0006790	CUGUAUGCccucacccgcuca	668
hsa-miR-298	MIMAT0004901	AGCAGAAAGcaggagguucuccca	669
hsa-miR-891a	MIMAT0004902	UGCAACGAaccugagccacuga	670

10

20

30

40

hsa-miR-300	MIMAT0004903	UAUACAAAGggcagacucucuu	671
hsa-miR-886-5p	MIMAT0004905	CGGGUCGGaguuuagcuacaagg	672
hsa-miR-886-3p	MIMAT0004906	CGCGGGUGcuuacugacccuu	673
hsa-miR-892a	MIMAT0004907	CACUGUGUccuuucugcguag	674
hsa-miR-220b	MIMAT0004908	CCACCACCgugucugacacuu	675
hsa-miR-450b-5p	MIMAT0004909	UUUUGCAAuauguuccugaaua	676
hsa-miR-450b-3p	MIMAT0004910	UUGGGAUCAuuuugcauccaua	677
hsa-miR-874	MIMAT0004911	CUGCCCUGgcccggggaccga	678
hsa-miR-890	MIMAT0004912	UACUUGGAaaggcaucaguug	679
hsa-miR-891b	MIMAT0004913	UGCAACUUaccugagucauuga	680
hsa-miR-220c	MIMAT0004915	ACACAGGGcuguugugaagacu	681
hsa-miR-888	MIMAT0004916	UACUAAAaagcugucaguca	682
hsa-miR-888*	MIMAT0004917	GACUGACAccucuuugggugaa	683
hsa-miR-892b	MIMAT0004918	CACUGGCUccuuucugguaga	684
hsa-miR-541*	MIMAT0004919	AAAGGAUUCugcugucggucccacu	685
hsa-miR-541	MIMAT0004920	UGGUGGGCacagaaucuggacu	686
hsa-miR-889	MIMAT0004921	UUAAUAUCggacaaccuuugu	687
hsa-miR-875-5p	MIMAT0004922	UAUACCUUcguuuuauucaggug	688
hsa-miR-875-3p	MIMAT0004923	CCUGGAAAcacugaggugug	689
hsa-miR-876-5p	MIMAT0004924	UGGAUUUCuuugugaaucacca	690
hsa-miR-876-3p	MIMAT0004925	UGGUGGUUuacaaaguuuuca	691
hsa-miR-708	MIMAT0004926	AAGGAGCUuacaaucuagcuggg	692
hsa-miR-708*	MIMAT0004927	CAACUAGAcugugagcuucuag	693
hsa-miR-147b	MIMAT0004928	GUGUGCGGaaaugcuucugcua	694
hsa-miR-190b	MIMAT0004929	UGAUUAUGUuugauauugguu	695
hsa-miR-744	MIMAT0004945	UGCGGGGCUagggcuaacagca	696
hsa-miR-744*	MIMAT0004946	CUGUUGCCacuaaccucaaccu	697
hsa-miR-885-5p	MIMAT0004947	UCCAUUACacuacccugccu	698
hsa-miR-885-3p	MIMAT0004948	AGGCAGCGggguguaguggaua	699
hsa-miR-877	MIMAT0004949	GUAGAGGAgauggcgcagg	700
hsa-miR-877*	MIMAT0004950	UCCUCUUCuccuccucccag	701
hsa-miR-887	MIMAT0004951	GUGAACGGcgcccaucccgagg	702
hsa-miR-665	MIMAT0004952	ACCAGGAUgcugaggcccu	703
hsa-miR-873	MIMAT0004953	GCAGGAAACuugugagucuccu	704
hsa-miR-543	MIMAT0004954	AAACAUUCgggugcacuu	705
hsa-miR-374b	MIMAT0004955	AUAUAAAACaaaccugcuaagug	706
hsa-miR-374b*	MIMAT0004956	CUUAGCAUguuguaauuauuu	707
hsa-miR-760	MIMAT0004957	CGGCUCUGggucuguggga	708
hsa-miR-301b	MIMAT0004958	CAGUGCAAugauuuugucaaagc	709
hsa-miR-216b	MIMAT0004959	AAAUCUCUUgcaggcaaauguga	710
hsa-miR-208b	MIMAT0004960	AUAAGACGaaacaaagguuugu	711
hsa-miR-920	MIMAT0004970	GGGGAGCUguggaagcagua	712
hsa-miR-921	MIMAT0004971	CUAGUGAGggacagaaccaggauu	713
hsa-miR-922	MIMAT0004972	GCAGCAGAgaauaggacuacguc	714
hsa-miR-924	MIMAT0004974	AGAGUCUUgugauugcuu	715
hsa-miR-509-3-5p	MIMAT0004975	UACUGCAUgcggcaaucaug	716
hsa-miR-933	MIMAT0004976	UGUGCGCAgggagaccucucc	717
hsa-miR-934	MIMAT0004977	UGUCUACUacuggagacacugg	718
hsa-miR-935	MIMAT0004978	CCAGUUACgcuuccgcuaccgc	719
hsa-miR-936	MIMAT0004979	ACAGUAGAgggaggaauucgcag	720

10

20

30

40

hsa-miR-937	MIMAT0004980	AUCCGCGCucugacucucugcc	721
hsa-miR-938	MIMAT0004981	UGCCCUAAaggugaacccagu	722
hsa-miR-939	MIMAT0004982	UGGGGAGCugaggcucuggggug	723
hsa-miR-940	MIMAT0004983	AAGGCAGGccccccgcucccc	724
hsa-miR-941	MIMAT0004984	CACCCGGCugugugcacauuguc	725
hsa-miR-942	MIMAT0004985	UCUUCUCUguuuuggccaugug	726
hsa-miR-943	MIMAT0004986	CUGACUGUugccgucuccag	727
hsa-miR-944	MIMAT0004987	AAAUAUUguacaucggaugag	728
hsa-miR-297	MIMAT0004450	AUGUAUGUgugcaugugcaug	729
hsa-miR-1178	MIMAT0005823	UUGCUCACUguucuuuccuag	730
hsa-miR-1179	MIMAT0005824	AAGCAUUCuuucauugguugg	731
hsa-miR-1180	MIMAT0005825	UUUCCGGCucgcgugggugugu	732
hsa-miR-1181	MIMAT0005826	CCGUCGCCgcacccgagccg	733
hsa-miR-1182	MIMAT0005827	GAGGGUCUugggagggaugugac	734
hsa-miR-1183	MIMAT0005828	CACUGUAGgugauggugagaguggca	735
hsa-miR-1184	MIMAT0005829	CCUGCAGCgacuugauggcnuucc	736
hsa-miR-1225-5p	MIMAT0005572	GUGGGUACggcccaggggggg	737
hsa-miR-1225-3p	MIMAT0005573	UGAGCCCCUugugccgcggccag	738
hsa-miR-1226*	MIMAT0005576	GUGAGGGCaugcaggccuggaugggg	739
hsa-miR-1226	MIMAT0005577	UCACCAGCccuguguuccuag	740
hsa-miR-1227	MIMAT0005580	CGUGCCACCCuuuuccccag	741
hsa-miR-1228*	MIMAT0005582	GUGGGCGGgggcaggugugug	742
hsa-miR-1228	MIMAT0005583	UCACACCUGccucgcggccccc	743
hsa-miR-1229	MIMAT0005584	CUCUCACCACuugccucccacag	744
hsa-miR-1231	MIMAT0005586	GUGUCUGGgccccacgcgc	745
hsa-miR-1233	MIMAT0005588	UGAGCCCCUguccucccccgag	746
hsa-miR-1234	MIMAT0005589	UCGGCCUGaccacccacccac	747
hsa-miR-1236	MIMAT0005591	CCUCUUCUCCcuuugcucuccag	748
hsa-miR-1237	MIMAT0005592	UCCUUCUGGucccgccccccag	749
hsa-miR-1238	MIMAT0005593	CUUCCUCGGuccugugcccc	750
hsa-miR-1200	MIMAT0005863	CUCCUGAGccauucugagecuc	751
hsa-miR-1201	MIMAT0005864	AGCCUGAUaaaacacaugcuga	752
hsa-miR-1202	MIMAT0005865	GUGCCAGCugcagugggggag	753
hsa-miR-1203	MIMAT0005866	CCCGGAGCCaggaugcagcuc	754
hsa-miR-663b	MIMAT0005867	GGUGGCCGggccgugccugagg	755
hsa-miR-1204	MIMAT0005868	UCGUGGCCUggucuccauuuau	756
hsa-miR-1205	MIMAT0005869	UCUGCAGGGuuugcuiuugag	757
hsa-miR-1206	MIMAT0005870	UGUUCAUGuagauguuuaagc	758
hsa-miR-1207-5p	MIMAT0005871	UGGCAGGGaggcugggagggg	759
hsa-miR-1207-3p	MIMAT0005872	UCAGCUGGCCCCucauuuc	760
hsa-miR-1208	MIMAT0005873	UCACUGUUcagacaggcga	761
hsa-miR-548e	MIMAT0005874	AAAAACUGagacuacuuuugca	762
hsa-miR-548j	MIMAT0005875	AAAAGUAAnugcggcucuuuggu	763
hsa-miR-1285	MIMAT0005876	UCUGGGCAacaaagugagaccu	764
hsa-miR-1286	MIMAT0005877	UGCAGGAUcaagaaugagccu	765
hsa-miR-1287	MIMAT0005878	UGCUGGAUcagugguucgaguc	766
hsa-miR-1289	MIMAT0005879	UGGAGUCCaggaauucugcauuuu	767
hsa-miR-1290	MIMAT0005880	UGGAUUUUuggaucaggga	768
hsa-miR-1291	MIMAT0005881	UGGCCUUGacugaagaccagcagu	769
hsa-miR-548k	MIMAT0005882	AAAAGUAUuugcggauuuugcu	770

10

20

30

40

hsa-miR-1293	MIMAT0005883	UGGGUGGUcuggagauuugugc	771
hsa-miR-1294	MIMAT0005884	UGUGAGGUuggcauuguuguc	772
hsa-miR-1295	MIMAT0005885	UUAGGCCGcagaucuggguga	773
hsa-miR-1297	MIMAT0005886	UUCAAGUAauucaggug	774
hsa-miR-1299	MIMAT0005887	UUCUGGAAuucugugugaggga	775
hsa-miR-5481	MIMAT0005889	AAAAGUAUuugcggguuuuguc	776
hsa-miR-1302	MIMAT0005890	UUGGGACAAuacuaugcuaaa	777
hsa-miR-1303	MIMAT0005891	UUUAGAGACggggcucuugcucu	778
hsa-miR-1304	MIMAT0005892	UUUGAGGCuacagugagaugug	779
hsa-miR-1305	MIMAT0005893	UUUCAACCucuaaugggagaga	780
hsa-miR-1243	MIMAT0005894	AACUGGAUcaauuaugaggagug	781
hsa-miR-548f	MIMAT0005895	AAAAACUGuaauuacuuuu	782
hsa-miR-1244	MIMAT0005896	AAGUAGUUgguuuguaugagaugguu	783
hsa-miR-1245	MIMAT0005897	AAGUGAUUcaaaggccuacau	784
hsa-miR-1246	MIMAT0005898	AAUGGAUUuuggagcagg	785
hsa-miR-1247	MIMAT0005899	ACCCGUCCcggucccccgg	786
hsa-miR-1248	MIMAT0005900	ACCUUCUUGuuaagcacugugcuaaa	787
hsa-miR-1249	MIMAT0005901	ACGCCUUCccccccuucuca	788
hsa-miR-1250	MIMAT0005902	ACGGUGCUUggugugccuuu	789
hsa-miR-1251	MIMAT0005903	ACUCUAGCugccaaaggcgcu	790
hsa-miR-1253	MIMAT0005904	AGAGAAGAagaucagccugca	791
hsa-miR-1254	MIMAT0005905	AGCCUGGAagcuggagccugcagu	792
hsa-miR-1255a	MIMAT0005906	AGGAUGAGcaaagaaguagauu	793
hsa-miR-1256	MIMAT0005907	AGGCAUUGaciuucucacuagcu	794
hsa-miR-1257	MIMAT0005908	AGUGAAUUGauggguucugacc	795
hsa-miR-1258	MIMAT0005909	AGUUAGGAuuaggugcuggaa	796
hsa-miR-1259	MIMAT0005910	AUAUAUGAugacuuagcuuuu	797
hsa-miR-1260	MIMAT0005911	AUCCCACCUcugccacca	798
hsa-miR-548g	MIMAT0005912	AAAACUGUaauuacuuuuguac	799
hsa-miR-1261	MIMAT0005913	AUGGAUAAggcuuuggcuu	800
hsa-miR-1262	MIMAT0005914	AUGGGUGAauuuguagaaggau	801
hsa-miR-1263	MIMAT0005915	AUGGUACCCuggcauacugagu	802
hsa-miR-548n	MIMAT0005916	CAAAAGUAauuguggauuuugu	803
hsa-miR-548m	MIMAT0005917	CAAAGGUauuugugguuuuug	804
hsa-miR-1265	MIMAT0005918	CAGGAUGUGgucaaguguu	805
hsa-miR-548o	MIMAT0005919	CCAAAACUGcaguacuuuuugc	806
hsa-miR-1266	MIMAT0005920	CCUCAGGGcuguagaacaggcu	807
hsa-miR-1267	MIMAT0005921	CCUGUUGAaguguauccccca	808
hsa-miR-1268	MIMAT0005922	CGGGCGUGgugguggggg	809
hsa-miR-1269	MIMAT0005923	CUGGACUGagccgugcuacugg	810
hsa-miR-1270	MIMAT0005924	CUGGAGAUauggaagagcugugu	811
hsa-miR-1272	MIMAT0005925	GAUGAUGAuggcagcaauucugaaaa	812
hsa-miR-1273	MIMAT0005926	GGGCGACAAagcaagacuucuuu	813
hsa-miR-1274a	MIMAT0005927	GUCCCUGUUcaggcgcca	814
hsa-miR-548h	MIMAT0005928	AAAAGUAUcgccguuuuuguc	815
hsa-miR-1275	MIMAT0005929	GUGGGGGAgaggcuguc	816
hsa-miR-1276	MIMAT0005930	AAAAGAGCccuguggagaca	817
hsa-miR-302e	MIMAT0005931	UAAGUGCUuccaugcuu	818
hsa-miR-302f	MIMAT0005932	UAUUUGCUuccauguuu	819
hsa-miR-1277	MIMAT0005933	UACGUAGAuauuauguauuuu	820

10

20

30

40

hsa-miR-548p	MIMAT0005934	UAGCAAAAcugcaguuacuuu	821
hsa-miR-548i	MIMAT0005935	AAAAGUAuugcggaauuugcc	822
hsa-miR-1278	MIMAT0005936	UAGUACUGugcaauaaucauuu	823
hsa-miR-1279	MIMAT0005937	UCAUAUUGGcuucuuuu	824
hsa-miR-1274b	MIMAT0005938	UCCCUGUUUcgggcgcca	825
hsa-miR-1281	MIMAT0005939	UCGCCUCCUccucuccc	826
hsa-miR-1282	MIMAT0005940	UCGUUUGCcuuuuucugcuu	827
hsa-miR-1284	MIMAT0005941	UCUAUACAgaccuggchuuuc	828
hsa-miR-1288	MIMAT0005942	UGGACUGCccugaucuggaga	829
hsa-miR-1292	MIMAT0005943	UGGGAACGgguuccggcagacgcug	830
hsa-miR-1252	MIMAT0005944	AGAAGGAaauugaaauucauuua	831
hsa-miR-1255b	MIMAT0005945	CGGAUGAGcaaagaaagugguu	832
hsa-miR-1280	MIMAT0005946	UCCCACCGCugecaccce	833
hsa-miR-1308	MIMAT0005947	GCAUGGGUgguucagugg	834
hsa-miR-664*	MIMAT0005948	ACUGGCUAgggaaaauugauuggau	835
hsa-miR-664	MIMAT0005949	UAUUCAUuauccccagccuaca	836
hsa-miR-1306	MIMAT0005950	ACGUUGGCucuggugug	837
hsa-miR-1307	MIMAT0005951	ACUCGGCGuggcgugccgug	838
hsa-miR-513b	MIMAT0005788	UUCACAAAGgaggugucuuuuau	839
hsa-miR-513c	MIMAT0005789	UUCUCAAAGgaggugucguuuau	840
hsa-miR-1321	MIMAT0005952	CAGGGAGGugaauugugau	841
hsa-miR-1322	MIMAT0005953	GAUGAUGCugcugauugcug	842
hsa-miR-720	MIMAT0005954	UCUCGCUUgggcccucca	843
hsa-miR-1197	MIMAT0005955	UAGGACACauggucuacuuu	844
hsa-miR-1324	MIMAT0005956	CCAGACAGaauucuaugcacuuuuc	845
hsa-miR-1469	MIMAT0007347	CUCGGCGCggggcgccggcucc	846
hsa-miR-1470	MIMAT0007348	GCCCUCCGcccugcaccgg	847
hsa-miR-1471	MIMAT0007349	GCCCGCGUguggagccaggugu	848
hsa-miR-1537	MIMAT0007399	AAAACCGUcuaguuaacaguugu	849
hsa-miR-1538	MIMAT0007400	CGGCCCGGgcugcugcugiuucc	850
hsa-miR-1539	MIMAT0007401	UCCUGCGCgucccagauugcc	851
hsa-miR-103-as	MIMAT0007402	UCAUAGCCuguacaauugcugcu	852
hsa-miR-320d	MIMAT0006764	AAAAGCUGgguugagagga	853
hsa-miR-1825	MIMAT0006765	UCCAGUGCccuccucucc	854
hsa-miR-1826	MIMAT0006766	AUUGAUCAucgacacuucgaacgcaau	855
hsa-miR-1827	MIMAT0006767	UGAGGCAGuagauugaau	856
hsa-miR-1908	MIMAT0007881	CGGCGGGGAcggcgauugguc	857
hsa-miR-1909*	MIMAT0007882	UGAGUGCCggugccugccug	858
hsa-miR-1909	MIMAT0007883	CGCAGGGGccgggugcucacgg	859
hsa-miR-1910	MIMAT0007884	CCAGUCCUgugccugccgccc	860
hsa-miR-1911	MIMAT0007885	UGAGUACCgcuaugucuguuggg	861
hsa-miR-1911*	MIMAT0007886	CACCAAGGCaauuguggucucc	862
hsa-miR-1912	MIMAT0007887	UACCCAGAGcaugcagugugaa	863
hsa-miR-1913	MIMAT0007888	UCUGCCCCCucgcugcugccca	864
hsa-miR-1914	MIMAT0007889	CCCUGUGCccggccacuucug	865
hsa-miR-1914*	MIMAT0007890	GGAGGGGUcccgacacuggagg	866
hsa-miR-1915*	MIMAT0007891	ACCUUGCCuugcugccggggcc	867
hsa-miR-1915	MIMAT0007892	CCCCAGGGcgcacgcggcggg	868
hsa-miR-1972	MIMAT0009447	UCAGGCCAggcacaguggcuca	869
hsa-miR-1973	MIMAT0009448	ACCGUGCAaagguaugcaua	870

10

20

30

40

hsa-miR-1975	MIMAT0009450	CCCCCACAAccgcgcuugacuagcu	871
hsa-miR-1976	MIMAT0009451	CCUCCUGCccucuuugcugu	872
hsa-miR-1979	MIMAT0009454	CUCCCACUGcucacuugacua	873
hsa-miR-2052	MIMAT0009977	UGUUUUGAuaacaguaangu	874
hsa-miR-2053	MIMAT0009978	GUGUUAAUuaaaaccucuauuac	875
hsa-miR-2054	MIMAT0009979	CUGUAUUUaaaauuuauuuauu	876
hsa-miR-2110	MIMAT0010133	UUGGGGAAacggccgcugagug	877
hsa-miR-2114	MIMAT0011156	UAGUCCCUnccuugagaaggcuc	878
hsa-miR-2114*	MIMAT0011157	CGAGCCUCaagcaaggacuu	879
hsa-miR-2115	MIMAT0011158	AGCUUCCAAugacuccugaugga	880
hsa-miR-2115*	MIMAT0011159	CAUCAGAAuicauggaggcuag	881
hsa-miR-2116	MIMAT0011160	GGUUCUUAgcauaggaggcuc	882
hsa-miR-2116*	MIMAT0011161	CCUCCCAUgccaagaacuccc	883
hsa-miR-2117	MIMAT0011162	UGUUCUCUuugccaaggacag	884
hsa-miR-548q	MIMAT0011163	GCUGGUGCaaaaguaauggcgg	885
hsa-miR-2276	MIMAT0011775	UCUGCAAGugucagaggcgagg	886
hsa-miR-2277	MIMAT0011777	UGACAGCGGccugccuggcuc	887
hsa-miR-2278	MIMAT0011778	GAGAGCAGuguguguugccugg	888
hsa-miR-711	MIMAT0012734	GGGACCCAgggagagacguaag	889
hsa-miR-718	MIMAT0012735	CUUCCGCCcgcggcgucg	890
hsa-miR-2861	MIMAT0013802	GGGGCCUGGcguggggcgg	891
hsa-miR-2909	MIMAT0013863	GUUAGGGCaaacaucuugg	892
hsa-miR-3115	MIMAT0014977	AUAUGGGUuuacuaguuggu	893
hsa-miR-3116	MIMAT0014978	UGCCUGGAacauaguagggacu	894
hsa-miR-3117	MIMAT0014979	AUAGGACUcaauauagugccag	895
hsa-miR-3118	MIMAT0014980	UGUGACUGcaauuaugaaaaauucu	896
hsa-miR-3119	MIMAT0014981	UGGCUUUUaacuuugauggc	897
hsa-miR-3120	MIMAT0014982	CACAGCAAguuguagacaggca	898
hsa-miR-3121	MIMAT0014983	AAAAUAGAguaggcaaaggaca	899
hsa-miR-3122	MIMAT0014984	GUUGGGACaaaggacggcucuu	900
hsa-miR-3123	MIMAT0014985	CAGAGAAUuguuuaauac	901
hsa-miR-3124	MIMAT0014986	UUCGCGGGGcgaaggcaaaguc	902
hsa-miR-548s	MIMAT0014987	AUGGCCAAaacugcaguuaauuu	903
hsa-miR-3125	MIMAT0014988	UAGAGGAAGcuguggagaga	904
hsa-miR-3126-5p	MIMAT0014989	UGAGGGACagaugccagaagca	905
hsa-miR-3126-3p	MIMAT0015377	CAUCUGGCaucgcucacacaga	906
hsa-miR-3127	MIMAT0014990	AUCAGGGCuuguggaaugggaag	907
hsa-miR-3128	MIMAT0014991	UCUGGCAAguaaaaaacucucau	908
hsa-miR-3129	MIMAT0014992	GCAGUAGUguagagauugguuu	909
hsa-miR-3130-5p	MIMAT0014995	UACCCAGUcuccggugcagcc	910
hsa-miR-3130-3p	MIMAT0014994	GCUGCACCGggagacuggguaa	911
hsa-miR-3131	MIMAT0014996	UCGAGGAUgguggaaggccuu	912
hsa-miR-3132	MIMAT0014997	UGGGUAGAgaaggacucagagga	913
hsa-miR-3133	MIMAT0014998	UAAAGAACucuuaaaacccaaau	914
hsa-miR-378b	MIMAT0014999	ACUGGACUuggaggcagaa	915
hsa-miR-3134	MIMAT0015000	UGAUGGAUaaaagacuacauuu	916
hsa-miR-3135	MIMAT0015001	UGCCUAGGcugagacugcagug	917
hsa-miR-466	MIMAT0015002	AUACACAUacacgcaacacau	918
hsa-miR-3136	MIMAT0015003	CUGACUGAauagguagggcucuu	919
hsa-miR-544b	MIMAT0015004	ACCUGAGGuugugcauuucuaa	920

10

20

30

40

hsa-miR-3137	MIMAT0015005	UCUGUAGCugggagcaugggg	921
hsa-miR-3138	MIMAT0015006	UGUGGACAgugagguaaggag	922
hsa-miR-3139	MIMAT0015007	UAGGAGCUaacagaugccuu	923
hsa-miR-3140	MIMAT0015008	AGCUUUUGggauucaggagu	924
hsa-miR-548t	MIMAT0015009	CAAAAGUaucgugguuuwug	925
hsa-miR-3141	MIMAT0015010	GAGGGCGGguggaggagga	926
hsa-miR-3142	MIMAT0015011	AAGGCCUUucugaaccuucaga	927
hsa-miR-3143	MIMAT0015012	AUAACAUUguaaagcgcuucuu	928
hsa-miR-548u	MIMAT0015013	CAAAGACUgcaauuacuuuugcg	929
hsa-miR-3144-5p	MIMAT0015014	AGGGGACAAaagagauauauag	930
hsa-miR-3144-3p	MIMAT0015015	AUAUACCUUgucggucucuuua	931
hsa-miR-3145	MIMAT0015016	AGAUAUUugaguguuuggaaauug	932
hsa-miR-1273c	MIMAT0015017	GGCGACAAaacgagacccuguc	933
hsa-miR-3146	MIMAT0015018	CAUGCUALgauagaaagaugg	934
hsa-miR-3147	MIMAT0015019	GGUUGGGCagugaggagguguga	935
hsa-miR-548v	MIMAT0015020	AGCUACAGuacuuuugccacca	936
hsa-miR-3148	MIMAT0015021	UGGAAAAAacuggugugugcuu	937
hsa-miR-3149	MIMAT0015022	UUUGUAUgauaugguguguguau	938
hsa-miR-3150	MIMAT0015023	CUGGGGAuaccucgaggugg	939
hsa-miR-3151	MIMAT0015024	GGUGGGGCaugggaucagg	940
hsa-miR-3152	MIMAT0015025	UGUGUUAGaauagggcaauaa	941
hsa-miR-3153	MIMAT0015026	GGGGAAA Gcgaguagggacauuu	942
hsa-miR-3074	MIMAT0015027	GAUAUCAGcucaguaggcaccg	943
hsa-miR-3154	MIMAT0015028	CAGAAGGGgaguugggagcaga	944
hsa-miR-3155	MIMAT0015029	CCAGGCUCugcaguggaaacu	945
hsa-miR-3156	MIMAT0015030	AAAGAUCUggaagugggagaca	946
hsa-miR-3157	MIMAT0015031	UUCAGCCAgcuaugugcagucu	947
hsa-miR-3158	MIMAT0015032	AAGGGCUUccucucugcaggac	948
hsa-miR-3159	MIMAT0015033	UAGGAUUAcagugugccac	949
hsa-miR-3160	MIMAT0015034	AGAGCUGAgacuagaaagccca	950
hsa-miR-3161	MIMAT0015035	CUGAUAA Gaacagaggcccagau	951
hsa-miR-3162	MIMAT0015036	UUAGGGAGuagaagguggggag	952
hsa-miR-3163	MIMAT0015037	UAUAAAAGagggcaguaagac	953
hsa-miR-3164	MIMAT0015038	UGUGACUUaaaggaaauuggcg	954
hsa-miR-3165	MIMAT0015039	AGGUGGAUgcaaugugaccuca	955
hsa-miR-3166	MIMAT0015040	CGCAGACAauggccuacuggccua	956
hsa-miR-1260b	MIMAT0015041	AUCCCCACCAcugccaccau	957
hsa-miR-3167	MIMAT0015042	AGGAUUUUCagaaaauacuggugu	958
hsa-miR-3168	MIMAT0015043	GAGUUCUAcagucagac	959
hsa-miR-3169	MIMAT0015044	UAGGACUGgcuuggcacauag	960
hsa-miR-3170	MIMAT0015045	CUGGGGUUucugagacagacagu	961
hsa-miR-3171	MIMAT0015046	AGAUGUAUggaauucuguauauac	962
hsa-miR-3172	MIMAT0015047	UGGGGUUUugcaguccuu	963
hsa-miR-3173	MIMAT0015048	AAAGGAGGaaauaggcaggcca	964
hsa-miR-1193	MIMAT0015049	GGGAUGGAgacggugacgugc	965
hsa-miR-323b-5p	MIMAT0001630	AGGUUGUCcguggugaguucgca	966
hsa-miR-323b-3p	MIMAT0015050	CCCAAUACacggucgaccucuu	967
hsa-miR-3174	MIMAT0015051	UAGUGAGUuagagaugcagagcc	968
hsa-miR-3175	MIMAT0015052	CGGGGAGAgaacgcagugacgu	969
hsa-miR-3176	MIMAT0015053	ACUGGCCUggacuaccgg	970

10

20

30

40

hsa-miR-3177	MIMAT0015054	UGCACGGCacuggggacacgu	971
hsa-miR-3178	MIMAT0015055	GGGGCGCGccggaucg	972
hsa-miR-3179	MIMAT0015056	AGAAGGGGugaaaaaaaacgu	973
hsa-miR-3180-5p	MIMAT0015057	CUUCCAGAcgcuccccccacgu	974
hsa-miR-3180-3p	MIMAT0015058	UGGGGCGGAGcucuccggaggcc	975
hsa-miR-548w	MIMAT0015060	AAAAGUAAcugcgguuuuugccu	976
hsa-miR-3181	MIMAT0015061	AUCGGGCCucgcgcgg	977
hsa-miR-3182	MIMAT0015062	GCUUCUGUaguguagc	978
hsa-miR-3183	MIMAT0015063	GCCUCUCUcgaggucgcucgga	979
hsa-miR-3184	MIMAT0015064	UGAGGGGCcucagaccgacuuuu	980
hsa-miR-3185	MIMAT0015065	AGAAGAAAGcggucgucugcgg	981
hsa-miR-3065-5p	MIMAT0015066	UCAACAAAaucacugaugcugga	982
hsa-miR-3065-3p	MIMAT0015378	UCAGCACCaggauawuguuggag	983
hsa-miR-3186-5p	MIMAT0015067	CAGGCGUCugucuacgugguu	984
hsa-miR-3186-3p	MIMAT0015068	UCACGGGAGagagauggcuiuug	985
hsa-miR-3187	MIMAT0015069	UUGGCCAUggggcugcgg	986
hsa-miR-3188	MIMAT0015070	AGAGGCULugugcgauacgggg	987
hsa-miR-3189	MIMAT0015071	CCCUUGGGGucugaugggguag	988
hsa-miR-320e	MIMAT0015072	AAAGCUGGGuugagaagg	989
hsa-miR-3190-5p	MIMAT0015073	UGUGGAAAGguagacggccagaga	990
hsa-miR-3190-3p	MIMAT0015074	UGGAAGGUagacggccagagag	991
hsa-miR-3191	MIMAT0015075	UGGGGACGuagcuggccagacag	992
hsa-miR-3192	MIMAT0015076	UCUGGGAGguuguagcaguggaa	993
hsa-miR-3193	MIMAT0015077	UCCUGCGUaggauugaggagu	994
hsa-miR-3194	MIMAT0015078	GGCCAGGCCaccaggaggcug	995
hsa-miR-3195	MIMAT0015079	CGCGCCGGGccccggguu	996
hsa-miR-3196	MIMAT0015080	CGGGGCGGcaggggccuc	997
hsa-miR-548x	MIMAT0015081	AAAAAAUCUgcuaauuacuuuca	998
hsa-miR-3197	MIMAT0015082	GGAGGCGCaggcucggaaaggcg	999
hsa-miR-3198	MIMAT0015083	GUGGAGUCcuggggaauggaga	1000
hsa-miR-3199	MIMAT0015084	AGGGACUCCuuuaggagaaaguu	1001
hsa-miR-3200	MIMAT0015085	CACCUUGCgcuacucaggcug	1002
hsa-miR-3201	MIMAT0015086	GGGAUAUGaagaaaaau	1003
hsa-miR-514b-5p	MIMAT0015087	UUCUCAAAGgggaggcaaucau	1004
hsa-miR-514b-3p	MIMAT0015088	AUUGACACcucugugagugga	1005
hsa-miR-3202	MIMAT0015089	UGGAAGGAGaaaggccuuuuau	1006
hsa-miR-1273d	MIMAT0015090	GAACCCAUGagguugaggcugcagu	1007
hsa-miR-4295	MIMAT0016844	CAGUGCAAuguuuuuccuu	1008
hsa-miR-4296	MIMAT0016845	AUGUGGGCucaggcuca	1009
hsa-miR-4297	MIMAT0016846	UGCCUUCCUGucugug	1010
hsa-miR-378c	MIMAT0016847	ACUGGACUuggagucagaagagugg	1011
hsa-miR-4293	MIMAT0016848	CAGCCUGAcaggaacag	1012
hsa-miR-4294	MIMAT0016849	GGGAGUCUacagcagg	1013
hsa-miR-4301	MIMAT0016850	UCCCACUAcuucacuuguga	1014
hsa-miR-4299	MIMAT0016851	GCUGGUGAcaugagaggc	1015
hsa-miR-4298	MIMAT0016852	CUGGGACAGggaggaggcag	1016
hsa-miR-4300	MIMAT0016853	UGGGAGCUggacuacuuc	1017
hsa-miR-4304	MIMAT0016854	CCGGCAUGuccaggcga	1018
hsa-miR-4302	MIMAT0016855	CCAGUGUGgcucagcgag	1019
hsa-miR-4303	MIMAT0016856	UUCUGAGCugaggacag	1020

10

20

30

40

hsa-miR-4305	MIMAT0016857	CCUAGACAccuccaguuc	1021
hsa-miR-4306	MIMAT0016858	UGGAGAGAaaggcagua	1022
hsa-miR-4309	MIMAT0016859	CUGGAGUCuaggauucca	1023
hsa-miR-4307	MIMAT0016860	AAUGUUUuuccuguuucc	1024
hsa-miR-4308	MIMAT0016861	UCCCUGGAguuuucuuuu	1025
hsa-miR-4310	MIMAT0016862	GCAGCAUUCaugucccc	1026
hsa-miR-4311	MIMAT0016863	GAAAGAGAgcugagugug	1027
hsa-miR-4312	MIMAT0016864	GGCCUUGUuccugucccc	1028
hsa-miR-4313	MIMAT0016865	AGCCCCUggcccaaacc	1029
hsa-miR-4315	MIMAT0016866	CCGCUUUUCugagcuggac	1030
hsa-miR-4316	MIMAT0016867	GGUGAGGCuagcuggug	1031
hsa-miR-4314	MIMAT0016868	CUCUGGGAaaugggacag	1032
hsa-miR-4318	MIMAT0016869	CACUGUGGguacaugcu	1033
hsa-miR-4319	MIMAT0016870	UCCCUGAGcaaagccac	1034
hsa-miR-4320	MIMAT0016871	GGGAUUCUguagcuiuccu	1035
hsa-miR-4317	MIMAT0016872	ACAUUGCCagggaguuu	1036
hsa-miR-4322	MIMAT0016873	CUGUGGGCucagcgcugggg	1037
hsa-miR-4321	MIMAT0016874	UUAGCGGUggaccgcuccug	1038
hsa-miR-4323	MIMAT0016875	CAGCCCCAcagccucaga	1039
hsa-miR-4324	MIMAT0016876	CCCUGAGAccuaaccuuua	1040
hsa-miR-4256	MIMAT0016877	AUCUGACCugaugaaggu	1041
hsa-miR-4257	MIMAT0016878	CCAGAGGUggggacugag	1042
hsa-miR-4258	MIMAT0016879	CCCCGCCAccgcciugg	1043
hsa-miR-4259	MIMAT0016880	CAGUUGGGuuaggggucagga	1044
hsa-miR-4260	MIMAT0016881	CUUGGGGCauggagucca	1045
hsa-miR-4253	MIMAT0016882	AGGGCAUGGuccaggggu	1046
hsa-miR-4251	MIMAT0016883	CCUGAGAAaggggccaa	1047
hsa-miR-4254	MIMAT0016884	GCCUGGGGuacuccaccauc	1048
hsa-miR-4255	MIMAT0016885	CAGUGUUUagagaugga	1049
hsa-miR-4252	MIMAT0016886	GGCCACUGagucagcacca	1050
hsa-miR-4325	MIMAT0016887	UUGCACUUgucucaguga	1051
hsa-miR-4326	MIMAT0016888	UGUUCCUCugucuccagac	1052
hsa-miR-4327	MIMAT0016889	GGCUUGCAuggggacugg	1053
hsa-miR-4261	MIMAT0016890	AGGAAACAgggaccca	1054
hsa-miR-4265	MIMAT0016891	CUGUGGGCucagcucuggg	1055
hsa-miR-4266	MIMAT0016892	CUAGGAGGccuuggcc	1056
hsa-miR-4267	MIMAT0016893	UCCAGCUCgguggcac	1057
hsa-miR-4262	MIMAT0016894	GACAUUCAgacuaccug	1058
hsa-miR-2355	MIMAT0016895	AUCCCCAGauacaauggacaa	1059
hsa-miR-4268	MIMAT0016896	GGCUCCUCcucucaggauug	1060
hsa-miR-4269	MIMAT0016897	GCAGGCCACagacagcccuggc	1061
hsa-miR-4263	MIMAT0016898	AUUCUAAUggccuuggcc	1062
hsa-miR-4264	MIMAT0016899	ACUCAGUCaugguauu	1063
hsa-miR-4270	MIMAT0016900	UCAGGGAGucagggagggc	1064
hsa-miR-4271	MIMAT0016901	GGGGGAAAGaaaaggugggg	1065
hsa-miR-4272	MIMAT0016902	CAUUCAACuagugauugu	1066
hsa-miR-4273	MIMAT0016903	GUGUUCUCugauggacag	1067
hsa-miR-4276	MIMAT0016904	CUCAGUGAcucaugugc	1068
hsa-miR-4275	MIMAT0016905	CCAAUUACcacuucuuu	1069
hsa-miR-4274	MIMAT0016906	CAGCAGUCccuccccug	1070

10

20

30

40

hsa-miR-4281	MIMAT0016907	GGGUCCCGgggaggggg	1071
hsa-miR-4277	MIMAT0016908	GCAGUUCUgagcacaguacac	1072
hsa-miR-4279	MIMAT0016909	CUCUCCUCccggcuuc	1073
hsa-miR-4278	MIMAT0016910	CUAGGGGGGuuugccuug	1074
hsa-miR-4280	MIMAT0016911	GAGUGUAGuucugagcagage	1075
hsa-miR-4282	MIMAT0016912	AAAAAUUUgcauccagga	1076
hsa-miR-4285	MIMAT0016913	GCGGCGAGuccgacuau	1077
hsa-miR-4283	MIMAT0016914	UGGGGCUCagegaguuu	1078
hsa-miR-4284	MIMAT0016915	GGGCUCACaucacccau	1079
hsa-miR-4286	MIMAT0016916	ACCCCACUccugguacc	1080
hsa-miR-4287	MIMAT0016917	UCUCCCUUgagggcacuuu	1081
hsa-miR-4288	MIMAT0016918	UUGUCUGCugaguuucc	1082
hsa-miR-4292	MIMAT0016919	CCCCUGGGGccggccuugg	1083
hsa-miR-4289	MIMAT0016920	GCAUUGUGcagggcuaauca	1084
hsa-miR-4290	MIMAT0016921	UGCCCUCCuuuucuuuccuc	1085
hsa-miR-4291	MIMAT0016922	UUCAGCAGgaacagcu	1086
hsa-miR-4329	MIMAT0016923	CCUGAGACccuaguuccac	1087
hsa-miR-4330	MIMAT0016924	CCUCAGAUcagagccuugc	1088
hsa-miR-500b	MIMAT0016925	AAUCCUUGGcuaccugggu	1089
hsa-miR-4328	MIMAT0016926	CCAGUUUUcccaggauu	1090

【実施例 1】

10

【0192】

一本鎖m i R - 1 2 4 類似体によるV A M P 3 発現の阻害

R T - q P C R アッセイ - H C T - 1 1 6 細胞を、 1 0 % ウシ胎仔血清と 1 % ペニシリ
ン - ストレプトマイシンを補給したM c C o y ' s 5 A M e d i u m (M e d i a t
e c h I n c .) 中で培養した。この細胞を 9 6 ウエル培養プレート内で、 6 0 0 0 細
胞 / ウエルの密度で 2 4 時間平板培養した後、トランスフェクションした。

【0193】

トランスフェクションはO p t i - M E M I R e d u c e d S e r u m M e
d i a (G i b c o) とL i p o f e c t a m i n e R N A i M a x (I n v i t r o g
e n) を用いて行ない、図1と2のデータでの最終m i R N A 濃度は 1 0 n M であり、図
3のデータの 1 2 点滴定曲線では 3 0 n M から 0 . 0 1 n M までの範囲とした。

30

【0194】

トランスフェクションの 2 4 時間後、細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、 T a q M
a n (登録商標) G e n e E x p r e s s i o n C e l l s - t o - C T (商標) K
i t (A p p l i e d B i o s y s t e m s / A m b i o n) を用いて処理して R N A
を抽出し、 c D N A を合成し、 V A M P 3 特異的プローブ (A p p l i e d B i o s y
s t e m s) を用いて A B I P r i s m 7 9 0 0 H T S e q u e n c e D e t e
c t o r で R T - q P C R を行った。

【0195】

逆転写条件は以下のとおり： 3 7 で 6 0 分間、 続いて 9 5 で 5 分間とした。 R T -
q P C R 条件は以下のとおり： 5 0 で 2 分間、 9 5 で 1 0 分間、 続いて、 9 5 で 1
5 秒間および 6 0 で 1 分間を 4 0 サイクルとした。 G U S B m R N A レベルをデータ
の標準化に使用した。 V A M P 3 のノックダウンは、 非標的化対照処理細胞で測定された
V A M P 3 c D N A と比べ、 実験処理した細胞で測定された V A M P 3 c D N A の 2
倍変化として計算した。

40

【0196】

レポーターアッセイ - H C T - 1 1 6 細胞を、 1 0 % ウシ胎仔血清と 1 % ペニシリ
ン - ストレプトマイシンを補給したM c C o y ' s 5 A M e d i u m (M e d i a t
e c h I n c .) 中で培養した。この細胞を 9 6 ウエル培養プレート内で、 2 5 , 0 0 0 細
胞 / ウエルの密度で 2 4 時間平板培養した後、トランスフェクションした。

50

【0197】

トランスフェクションはOpti-MEM I Reduced Serum Media (Gibco) と Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて行い、図4と5のデータでの最終miRNA濃度は10nMであり、図6のデータの6点滴定曲線では30nMから0.01nMまでの範囲とした。miRNAを、miR-124に対するシードマッチ(2x; 図6A)またはmiR-124に対する完全長マッチ(2xFL; 図6B)のタンデムリピートからなるクローニングした標的挿入物を含むsiCHECK2ベクター(Genscript)とコトransフェクトした。

【0198】

トランスフェクションの24時間後、トランスフェクション培地を新鮮増殖培地と交換した。トランスフェクションの48時間後、細胞を溶解させ、ホタルルシフェラーゼ活性とウミシイタケルシフェラーゼ活性の両方を、Dual-GloTM Luciferase Assay System (Promega) を用いてWallac EnVision 2103 Multilabel Reader (PerkinElmer) で測定した。ホタルルシフェラーゼ活性を用いてウミシイタケ-ルシフェラーゼ活性を標準化し、最終データを、非標的化対照処理細胞と比べて、実験処理した細胞でのウミシイタケ-ルシフェラーゼシグナルの2倍変化として計算した。

10

【0199】

オリゴヌクレオチドの合成-オリゴヌクレオチドを、当該技術分野でよく知られたプロトコル(固相合成)を用いて市販のホスホルアミダイトを使用して合成し、次いで、逆相固相抽出(SPE)によって精製した。C3(C₃H₄N₂O₅P)およびC6(C₃H₄N₂O₅P)ホスホルアミダイトをChemGenesから購入した。

20

【0200】

簡単には、1種類のオリゴヌクレオチド鎖を、ホスホルアミダイト化学反応を用いて自動固相合成装置で、当該技術分野で一般的に知られた手順を用いて合成した(例えば、米国特許出願第12/064,014号(US20090176725として公開)を参照のこと)。合成カラムには、第1ヌクレオシド残基(天然または化学修飾体)で誘導体化した固相支持体を充填した。合成は、酸不安定性5'-O-ジメトキシトリチル基を脱トリチル化して5'-ヒドロキシルを放出させることによって開始した。適切に保護されたホスホルアミダイトと適当な活性化剤(アセトニトリル中)を合成カラムに同時に送達すると、5'-ヒドロキシルに対するアミダイトのカップリングがもたらされた。次いで、カラムを溶媒(アセトニトリルなど)で洗浄した。酸化性溶液(ヨウ素溶液など)をカラム中にポンプ輸送して亜リン酸トリエステル結合P(III)を酸化させて、ホスホトリエステルP(V)類似体にした。未反応の5'-ヒドロキシル基を、2',6'-ルチジンとN-メチルイミダゾールの存在下で無水酢酸などの試薬を用いてキャッピングした。伸長サイクルは、次のホスホルアミダイトが組み込まれる脱トリチル化工程により再開された。このプロセスを、所望の配列が合成されるまで繰り返した。合成は、最後の5'末端保護基(トリチルまたは5'-O-ジメトキシトリチル)により終結させた。

30

【0201】

合成が完了したら、固相支持体と結合オリゴヌクレオチドをアルゴン圧下または真空中で乾燥させた。水性塩基を添加し、混合物を加熱してスクシニル結合の切断、シアノエチルホスフェート保護基の除去、および環外アミン保護の脱保護をもたらした。

40

【0202】

以下のプロセスを、リボヌクレオチドを含まない一本鎖に対して行った。固相支持体を水性塩基で処理した後、混合物を濾過し、固相支持体を粗製の脱保護合成物質から分離した。次いで、固相支持体をDMSOですすぎ洗浄した(これを濾液と合わせる)。得られた塩基性溶液により、5'-O-ジメトキシトリチル基が5'末端位置に残存した状態(トリチル-オン)を保持することが可能である。

【0203】

リボヌクレオチドを含む一本鎖には、以下のプロセスを行った。固相支持体を水性塩基

50

で処理した後、混合物を濾過し、固相支持体を粗製の脱保護合成物質から分離した。次いで、固相支持体をジメチルスルホキシド (DMSO) ですすぎ洗浄し、これを濾液と合わせた。フッ化物試薬 (トリエチルアミントリヒドロフルオリドなど) を混合物に添加し、この溶液を加熱した。反応液を適当なバッファーでクエンチし、最後の 5' 末端位置に 5'-O-ジメトキシトリチル基を有する粗製の一本鎖の溶液を得た。

【0204】

各粗製の一本鎖のトリチル-オン溶液を、クロマトグラフィー精製 (SPE RPC 精製など) を用いて精製した。トリチル基の疎水性の性質により、所望の完全長オリゴ体が非トリチル化切断型の不合格配列よりも強く保持されることが可能である。不合格配列は、低率アセトニトリルなどの適当な溶媒で、樹脂から選択的に洗い流した。次いで、保持されたオリゴヌクレオチドを、カラム上でトリフルオロ酢酸を用いて脱トリチルし、酸不安定性のトリチル基を除去した。残留した酸をカラムから洗い流し、塩交換を行い、該物質の最終脱塩を開始した。水性有機溶媒を用いて、完全長オリゴ体を精製形態で回収した。次いで、最終生成物を、純度 (HPLC)、実体 (Maldi-TOF MS) および收率 (UV A₂₆₀) について解析した。オリゴ体を凍結乾燥または真空濃縮によって乾燥させた。

10

【0205】

結果 - 一本鎖 m i R - 124 類似体が既知の標的 VAMP3 の発現を阻害する能力を試験した。ここで、m i R - 124 類似体は、1 個のヌクレオチドの代わりに置き換えられた C3 スペーサー、または 2 つのヌクレオチドの代わりに置き換えられた C6 スペーサーのいずれかを、鎖に沿った種々の位置に含むものである。

20

【0206】

この試験で使用した m i R - 124 のパッセンジャー鎖配列は 5' - G C A U U C A C C G C G U G C C U U A A U - 3' (配列番号: 1091) であり、ガイド鎖配列は 5' - U U A A G G C A C G C G G U G A A U G C C A - 3' (配列番号: 1092) である。試験した m i R - 124 類似体ならびに対照分子を表 2 において以下に示す。

【0207】

【表2】

名	配列 (5' → 3') *
G/P	(ガイド) UUAAGGCACGCCGUGAAUGCCA (配列番号: 1092) (パッセンサー) GCAUUCACCGCGUGCCUAAAU (配列番号: 1091)
21-8p-c3spacer-20	(ガイド) UAAGGCACGCCGUGAAUGC(C3-スペーサー)A (配列番号: 1093)
21-8p-c3スペーサー-19 (図1,3)	(ガイド) UAAGGCACGCCGUGAAUG(C3-スペーサー)CA (配列番号: 1094)
c3pos19スペーサー(図2)	
c3pos19(図4)	
21-8p-c3スペーサー-18	(ガイド) UAAGGCACGCCGUGAAU(C3-スペーサー)CCA (配列番号: 1095)
21-8p-c3スペーサー-17	(ガイド) UAAGGCACGCCGUGAA(C3-スペーサー)GCCA (配列番号: 1096)
21-8p-c3スペーサー-16	(ガイド) UAAGGCACGCCGUGA(C3-スペーサー)UGCCA (配列番号: 1097)
21-8p-c3スペーサー-15 (図1,3)	(ガイド) UAAGGCACGCCGUG(C3-スペーサー)AUGCCA (配列番号: 1098)
c3pos15スペーサー(図2)	
21-8p-c3スペーサー-14 (図1,3)	(ガイド) UAAGGCACGCCGU(C3-スペーサー)AAUGCCA (配列番号: 1099)
c3pos14(図4)	
21-8p-c3スペーサー-13	(ガイド) UAAGGCACGCCG(C3-スペーサー)GAAUGCCA (配列番号: 1100)
21-8p-c3スペーサー-12	(ガイド) UAAGGCACGCCG(C3-スペーサー)UGAAUGCCA (配列番号: 1101)
21-8p-c3スペーサー-11	(ガイド) UAAGGCACGC(C3-スペーサー)GUGAAUGCCA (配列番号: 1102)
21-8p-c3スペーサー-10	(ガイド) UAAGGCACG(C3-スペーサー)GGUGAAUGCCA (配列番号: 1103)
21-8p-c3スペーサー-9	(ガイド) UAAGGCAC(C3-スペーサー)CGGUGAAUGCCA (配列番号: 1104)
21-8p-c3スペーサー-8	(ガイド) UAAGGCAC(C3-スペーサー)GCGGUGAAUGCCA (配列番号: 1105)
21-8p-c3スペーサー-7	(ガイド) UAAGGCAC(C3-スペーサー)CGCGGUGAAUGCCA (配列番号: 1106)
21-8p-c3スペーサー-6	(ガイド) UAAGGCAC(C3-スペーサー)ACGCGGUGAAUGCCA (配列番号: 1107)
21-8p-c3スペーサー-5	(ガイド) UAAGGCAC(C3-スペーサー)CACGCGGUGAAUGCCA (配列番号: 1108)
21-8p-c3スペーサー-4	(ガイド) UAA(C3-スペーサー)GCACGCGGUGAAUGCCA (配列番号: 1109)
21-8p-c3スペーサー-3	(ガイド) UA(C3-スペーサー)GGCACGCCGUGAAUGCCA (配列番号: 1110)
21-8p-c3スペーサー-2	(ガイド) U(C3-スペーサー)AGGCACGCCGUGAAUGCCA (配列番号: 1111)
21-8p-c6スペーサー-del2-19	(ガイド) UAAGGCACGCCGUGAAU(C6-スペーサー)A (配列番号: 1112)
21-8p-c6スペーサー-del2-18	(ガイド) UAAGGCACGCCGUGAAU(C6-スペーサー)CA (配列番号: 1113)
21-8p-c6スペーサー-del2-17	(ガイド) UAAGGCACGCCGUGAA(C6-スペーサー)CCA (配列番号: 1114)
21-8p-c6スペーサー-del2-16	(ガイド) UAAGGCACGCCGUGA(C6-スペーサー)GCCA (配列番号: 1115)
21-8p-c6スペーサー-del2-15	(ガイド) UAAGGCACGCCGUG(C6-スペーサー)UGCCA (配列番号: 1116)

10

20

30

(図1,3)	
c6del2pos15スペーサー(図2)	
21-8p-c6スペーサー-del2-14	(ガイド) <i>UAAGGCACGCCGU(C6-スペーサー)AUGCCA</i> (配列番号: 1117)
21-8p-c6スペーサー-del2-13	(ガイド) <i>UAAGGCACGCCG(C6-スペーサー)AAUGCCA</i> (配列番号: 1118)
21-8p-c6スペーサー-del2-12	(ガイド) <i>UAAGGCACGCC(C6-スペーサー)GAAUGCCA</i> (配列番号: 1119)
21-8p-c6スペーサー-del2-11	(ガイド) <i>UAAGGCACGC(C6-スペーサー)UGAAUGCCA</i> (配列番号: 1120)
21-8p-c6スペーサー-del2-10	(ガイド) <i>UAAGGCACG(C6-スペーサー)GUGAAUGCCA</i> (配列番号: 1121)
21-8p-c6スペーサー-del2-9	(ガイド) <i>UAAGGCAC(C6-スペーサー)GGUGAAUGCCA</i> (配列番号: 1122)
21-8p-c6スペーサー-del2-8	(ガイド) <i>UAAGGCAC(C6-スペーサー)CGGUGAAUGCCA</i> (配列番号: 1123)
21-8p-c6スペーサー-del2-7	(ガイド) <i>UAAGGCAC(C6-スペーサー)CGGGUGAAUGCCA</i> (配列番号: 1124)
UC3	(^{ハッセンジ} B g Ua Uga CCGa CUa Cg Cg Uatt B (配列番号: 1125) (ガイド) <i>UACCGGUAGUCGGUCAUACUU</i> (配列番号: 1126)
miR-124 (図1)	(ガイド) <i>UUAAGGCACGCCGUGAAUGCCA</i> (配列番号: 1127)
pG (図2)	
124(21)-8p-16rrr	(ガイド) <i>UAAGGCACGCCGUGAAUGCCA</i> (配列番号: 1128)
124(21)-8p (図1)	
G-全-フルオロ (図2)	(ガイド) <i>UAAGGCACGCCGUGAAUGCCA</i> (配列番号: 1129)
pG-フルオロ (図4)	
GAPDH	(ガイド) <i>AAGUUGUCAUGGAUGACCUUU</i> (配列番号: 1131) (^{ハッセンジ} B agg UCa UCCa Uga Caa CUUtt B (配列番号: 1130)
ウミシイタケ	(ガイド) <i>UAGUUGC GGACAAUCUGGAtt</i> (配列番号: 1133) (^{ハッセンジ} UCCAGAUUUGUCCGCAACUAtt (配列番号: 1132)
C6delpos15スペーサー/P	(ガイド) <i>UAAGGCACGCCGUG(C6-spacer)UGCCA</i> (配列番号: 1116) (^{ハッセンジ} GCAUUCACCGCGUGCCUUAUU (配列番号: 1091)
pG-フルオロ /Pshort	(ガイド) <i>UAAGGCACGCCGUGAAUGCCA</i> (配列番号: 1129) (^{ハッセンジ} GCAUUCACCGCGUGCCUUAUU (配列番号: 1134)

* A、U、CおよびG=2' -デオキシ-2' -フルオロA、U、CおよびG

A、U、CおよびG=2' -0-メチル(2' -OMe)A、U、CおよびG

a、g、cおよびu=デオキシA、U、CおよびG

t=チミジン

A、C、GおよびU=リボースA、C、GまたはU

B=逆位無塩基

表2の一本鎖分子はすべて、5' リン酸基キャップを含む。

【0208】

「G / P」は二本鎖m i R - 1 2 4を表し、ここで、該二本鎖は、2つのヌクレオチド突出端をパッセンジャー鎖とガイド鎖の3'末端に有する。G / P二本鎖のガイド鎖は22ヌクレオチド長である。

【0209】

配列番号: 1093 ~ 1124は、一本鎖m i R - 1 2 4のガイド鎖の類似体を表す。これらの分子は各々、G / P二本鎖に存在しているm i R - 1 2 4のガイド鎖の21ヌクレオチド型であり、22ヌクレオチドG / P m i R - 1 2 4のガイド鎖には存在している5' -ウラシルヌクレオチドがない。これらの21量体類似体のヌクレオチドは、3'アデノシンと隣接シトシン(存在する場合)以外はすべて、リボース部分が2' -フルオロで化学修飾されている(表2にイタリック体のヌクレオチドで示す)。3'アデノシンと隣接シトシン(存在する場合)は、リボース部分が2' -O -メチルで化学修飾されている(表2に下線付ヌクレオチドで示す)。最後に、m i R - 1 2 4のガイド鎖の21量体類似体は、1個のヌクレオチドの代わりに置き換えられたC 3スペーサー(「c 3スペーサー」類似体)または2個のヌクレオチドの代わりに置き換えられたC 6スペーサー(「c 6スペーサー d e 1 2」類似体)をいずれかを鎖に沿った種々の表示位置に含む。例えば、「21 - 8 p - c 3スペーサー - 2 0」は、21ヌクレオチドm i R - 1 2 4のガイド鎖の20位のヌクレオチドの代わりに、19位と21位のヌクレオチドを連結してい

10

20

30

40

50

るエチレングリコールスペーサーを含む21量体m i R - 124のガイド鎖類似体を表す。別の例として、「21 - 8 p - c 6 スペーサー d e 12 - 19」と表示された類似体は、21ヌクレオチドm i R - 124のガイド鎖の19位と20位のヌクレオチドの代わりに、18位と21位のヌクレオチドを連結しているヘキサンスペーサーを含む21量体m i R - 124のガイド鎖類似体を表す。一部の21ヌクレオチドm i R - 124のガイド鎖類似体は、表2に示されたように、添付の図面と異なる名称を有する。例えば、配列番号：1116で表される21量体m i R - 124のガイド鎖類似体は、図1と3では「21 - 8 p - c 6 スペーサー d e 12 - 15」と呼称し、図2では「c 6 d e 12 p o s 15スペーサー」と呼称している。

【0210】

10

「U C 3」は、非標的化化学修飾二本鎖を表す。

【0211】

「124(21) - 8 p - 16 r r r」は、m i R - 124のガイド鎖の21ヌクレオチド型の類似体を表す。この分子には内部スペーサーが含まれていない。ヌクレオチドは、ヌクレオチド16～18（これらはRNAである）およびヌクレオチド21と22（これらは2' - O - メチルで修飾されている）以外はすべて、2' - フルオロで修飾されている。

【0212】

20

「124(21) - 8 p」は、ヌクレオチド1～20が2' - フルオロで修飾されており、ヌクレオチド20と21が2' - O - メチルで修飾されているm i R - 124ガイドの21ヌクレオチド型を表す。「124(21) - 8 p」は図1のこの類似体の名称であり；「G - 全フルオロ」は図2のこの類似体の名称であり；「p G - フルオロ」は図4のこの類似体の名称である。

【0213】

「m i R - 124」は、G / P二本鎖の一本鎖ガイド鎖である。これは、22ヌクレオチド長であり、非修飾型である。

【0214】

30

「C 6 d e 1 p o s 15スペーサー / P」は、ガイド鎖が「21 - 8 p - c 6 スペーサー d e 12 - 15」（配列番号：1116）の構造を有し、パッセンジャー鎖が22ヌクレオチドm i R - 124パッセンジャー鎖（配列番号：1091）である二本鎖m i R - 124の二本鎖を表す。

【0215】

図1と2は、上記のRT - qPCRアッセイを使用し、表2に示した一本鎖m i R - 124類似体によるVAMP3標的の発現の阻害度合いを示す。図1は、C3スペーサーを含む一本鎖m i R - 124類似体による阻害度合いを示す。図2は、C6スペーサーを含む一本鎖m i R - 124類似体による阻害度合いを示す。各図においてバーが長いほどVAMP3のノックダウンが大きいことを示す。二連のバーは生物学的同型体を示し、各々は、表示した核酸分子でトランスフェクトした別々のウェルの細胞（2つの別々のプレートのもの）のデータを示す。スペーサーは、m i R - 124類似体の19位、および15位の近傍で最も耐容性が良好なようである。

40

【0216】

図3のグラフは、図1と2の試験類似体のサブセットでのVAMP3発現の用量依存性応答を示す（配列については表2参照）。VAMP3発現をy軸上に示しており、したがって、この軸上で低い値のデータ点の方がVAMP3発現のノックダウンが大きいことを示す。試験したm i R - 124類似体の用量をx軸上に、左側に最小用量から右側に最大に用量までの範囲で示す。二本鎖型（G / Pおよびc 6 d e 12 p o s 15スペーサー / P）は、一本鎖類似体よりも強力であるが、一本鎖「G - 全フルオロ」類似体（内部スペーサーなしで、ヌクレオチド1～20は2' - フルオロであり、ヌクレオチド20と21は2' - O - メチルである）が、15位（c 3 p o s 15スペーサー）または19位（c 3 p o s 19スペーサー）と交換されたC3スペーサーを有する同等の一本鎖類似体とほ

50

ぼ同一の挙動を示していることは注目に値する。

【0217】

図4と5は、m i R - 1 2 4のシード領域とマッチしている2つの標的部位を有するコトランスクレオチド修飾したルシフェラーゼレポーターのノックダウンを測定した、図1と2の同じ試験一本鎖m i R - 1 2 4類似体のスクリーニングのデータを示す。したがって、このアッセイのデータは、試験類似体のm i R N A活性を表す。図4は、C 3スペーサーを含む一本鎖m i R - 1 2 4類似体による阻害度合いを示す。図5は、C 6スペーサーを含む一本鎖m i R - 1 2 4類似体による阻害度合いを示す。二連のバーは生物学的同型体を示し、各々は、表示した核酸分子でトランスクレオチド修飾した別々のウェルの細胞（2つの別々のプレートのもの）のデータを示す。この場合も、長いバーの方であるほど阻害が大きいことを示し、19位または15位の近傍にスペーサーを含む類似体は最も大きなノックダウン活性を有することを示す。

【0218】

図6のグラフは、図3の試験類似体のサブセットでの2種類の異なるルシフェラーゼレポーターの標的発現阻害の用量依存性応答を示す。図6 Aにおいて、表示した阻害活性は、m i R - 1 2 4シード領域に対して2つのマッチを有するルシフェラーゼレポーターに対するものである。したがって、これは、試験類似体のm i R N A活性を表す。図6 Bにおいて、表示した阻害活性は、m i R - 1 2 4に対して2つの完全長マッチを有するルシフェラーゼレポーターに対するものであり、したがって試験類似体のs i R N A活性を表す。AおよびBの両方において、G / P曲線は、完全にR N Aで構成されたm i R - 1 2 4二本鎖による活性を表す。p G - フルオロ / P s h o r t曲線は、大部分が2' - フルオロヌクレオチドで修飾されており、全 - R N Aパッセンジャー鎖と二本鎖を形成するガイド鎖による活性を表す。p G - フルオロ曲線は、大部分が2' - フルオロヌクレオチドで修飾されている一本鎖m i R - 1 2 4のガイド鎖類似体の活性を表す。c 3 p o s 1 4曲線およびc 3 p o s 1 9曲線は、14位（「c 3 p o s 1 4」）または19位（「c 3 p o s 1 9」）の代わりに置き換えられた3 - 炭素スペーサー（C 3スペーサー）を含むことだけがp G - フルオロと異なるp G - フルオロ類似体の活性を表す。すべての一本鎖類似体は、シードマッチのみを有するレポーターに対するいずれかの二本鎖よりも低い効力を示すが、これらは、全濃度範囲において互いに有効に同等であり、最大濃度では該二本鎖と同様の活性を示す（図6 A）。完全長マッチを有するレポーターに対しては、やはり全 - R N A二本鎖（「G / P」）が最強の奏功体であったが、スペーサー含有一本鎖類似体は、2' - フルオロガイド鎖を有する二本鎖（「p G - フルオロ / P s h o r t」）および一本鎖（「p G - フルオロ」）と同程度に強いか、またはこれらより強い活性を有していた。

【実施例2】

【0219】

A p o B m R N Aの一本鎖R N A iノックダウン

R T - q P C Rアッセイ（一次スクリーニングおよび用量応答曲線）- H e p a l - 6細胞を、10%ウシ胎仔血清、1%ペニシリン - ストレプトマイシンおよび1%重炭酸ナトリウムを補給したダルベッコ変形イーグル培地で培養した。この細胞を96ウェル培養プレート内で、3000細胞 / ウェルの密度で24時間平板培養した後、トランスクレクションした。

【0220】

トランスクレクションは、Opti - M E M I R e d u c e d S e r u m M e d i aおよびL i p o f e c t a m i n e R N A i M A Xを製造業者の指示どおりに用いて行った。一本鎖s i R N A終濃度は100nMおよび10nMとした。

【0221】

トランスクレクションの24時間後、細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、T a q M a n G e n e E x p r e s s i o n C e l l s - t o - C T（商標）K i tを製造業者の使用説明書どおりに用いて処理してR N Aを抽出し、c D N Aを合成し、A B I

10

20

30

40

50

Prism 7900HT Sequence Detector にセットされた ApoB 特異的 Taqman プライマー / プローブを用いて RT - qPCR を行った。

【 0222 】

逆転写条件は以下のとおり： 37 で 60 分間、 続いて 95 5 分間とした。 RT - qPCR 条件は以下のとおり： 50 で 2 分間、 95 で 10 分間： 続いて、 95 で 15 秒間および 60 で 1 分間を 40 サイクルとした。 GAPDH mRNA レベルをデータの標準化に使用した。

【 0223 】

Apob mRNA のノックダウンは、 非標的化対照処理細胞で測定された Apob cDNA と比べ、 実験処理した細胞で測定された Apob cDNA の 2 倍変化として計算した。

10

【 0224 】

結果 - Apob mRNA のノックダウンは、 C3 スペーサーが 15, 16, 17, 18 または 19 位（該オリゴ体の 5' を基準）のいずれかに組み込まれた一本鎖（ガイド鎖）オリゴヌクレオチドを、 2 つの異なる濃度（100 nM および 10 nM）を用いて測定した。結果を図 7 に示す。試験した一本鎖分子はすべて、 ピリミジンヌクレオチドとプリンヌクレオチドの両方が 2' - デオキシ - 2' - フルオロヌクレオチドおよび 5' リン酸基で構成されたものである。各分子の 2 つの 3' 末端ヌクレオチドは 2' - O - メチルヌクレオチドである。一本鎖分子「 485 」（図 7 参照； 5' - UUAAGAGAACCCUUACUGGUU - 3' （配列番号： 1135 ））は、 C3 スペーサーを含んでおらず、 Apob mRNA をヌクレオチド 485 位において標的化する 21 ヌクレオチド分子である。C3 スペーサーは、 分子 485 内の 15 位（「 485 c3@pos15 」； 配列番号： 1136 ）、 16 位（「 485 c3@pos16 」； 配列番号： 1137 ）、 17 位（「 485 c3@pos17 」； 配列番号： 1138 ）、 18 位（「 485 c3@pos18 」； 配列番号： 1139 ）または 19 位（「 485 c3@pos19 」； 配列番号： 1140 ）に組み込まれている（すなわち、 485 分子の表示したヌクレオチドが、 該スペーサーに置き換えられている）。例えば、 シグナル鎖分子「 485 c3@pos15 」は、 5' - UUAAGAGAACCCUU (C3 スペーサー) CUGGUU - 3' ； 配列番号： 1136 ）で表される。図 7 に示されるように、 C3 スペーサーを 18 位または 19 位に含めると、 2 つの異なる濃度（100 nM および 10 nM）において、 耐容性が両方とも良好であるとともに mRNA ノックダウンも改善される。このデータは、 非ヌクレオチド C3 炭素スペーサーを一本鎖 RNA 干渉オリゴヌクレオチドの 3' 末端に組み込むと、 mRNA ノックダウンの効力が改善されることを示す（図 7 ）。

20

【 0225 】

一本鎖への C3 スペーサーの組込みがより広範に適用可能であるかどうかを評価するため、 各々、 18 位（図 8 ）または 19 位（図 9 ）のいずれかに C3 スペーサーを有する 30 種類の異なる Apob 標的化一本鎖配列を、 2 つの濃度（100 nM および 10 nM）で評価した。図 8 と 9 において、 一本鎖分子を、 標的化対象の Apob mRNA 内の位置によって表記している。試験した一本鎖分子はすべて、 ピリミジンヌクレオチドとプリンヌクレオチドの両方が 2' - デオキシ - 2' - フルオロヌクレオチドおよび 5' リン酸基で構成されたものである。各分子の 2 つの 3' 末端ヌクレオチドは 2' - O - メチルヌクレオチドである。評価した図 8 と 9 の一本鎖 RNAi 分子の配列識別名（配列番号： ）を表 3 に示す。

30

【 0226 】

40

【表3】

標的領域	18位のC3 (図8と10)	19位のC3 (図9と10)	スペーサーなし (図10)
19	配列番号:1141	配列番号:1170	配列番号:1199
248	配列番号:1142	配列番号:1171	配列番号:1200
397	配列番号:1143	配列番号:1172	配列番号:1201

485	配列番号:1139	配列番号:1140	配列番号:1135
601	配列番号:1144	配列番号:1173	配列番号:1202
719	配列番号:1145	配列番号:1174	配列番号:1203
780	配列番号:1146	配列番号:1175	配列番号:1204
1124	配列番号:1147	配列番号:1176	配列番号:1205
1445	配列番号:1148	配列番号:1177	配列番号:1206
1446	配列番号:1149	配列番号:1178	配列番号:1207
1611	配列番号:1150	配列番号:1179	配列番号:1208
1983	配列番号:1151	配列番号:1180	配列番号:1209
3214	配列番号:1152	配列番号:1181	配列番号:1210
3614	配列番号:1153	配列番号:1182	配列番号:1211
4542	配列番号:1154	配列番号:1183	配列番号:1212
6548	配列番号:1155	配列番号:1184	配列番号:1213
6930	配列番号:1156	配列番号:1185	配列番号:1214
6981	配列番号:1157	配列番号:1186	配列番号:1215
7044	配列番号:1158	配列番号:1187	配列番号:1216
9414	配列番号:1159	配列番号:1188	配列番号:1217
9514	配列番号:1160	配列番号:1189	配列番号:1218
9621	配列番号:1161	配列番号:1190	配列番号:1219
10162	配列番号:1162	配列番号:1191	配列番号:1220
10167	配列番号:1163	配列番号:1192	配列番号:1221
10168	配列番号:1164	配列番号:1193	配列番号:1222
10219	配列番号:1165	配列番号:1194	配列番号:1223
10455	配列番号:1166	配列番号:1195	配列番号:1224
10517	配列番号:1167	配列番号:1196	配列番号:1225
12673	配列番号:1168	配列番号:1197	配列番号:1226
13666	配列番号:1169	配列番号:1198	配列番号:1227

図8と9において、データを、C3スペーサーなしの対応一本鎖分子に対して標準化した。一本鎖対照(C3スペーサーなし)と同等であるノックダウン量が中心0とすると、正の値は、C3スペーサーの組込みによりmRNAノックダウンの改善が付与されることを示す。負の値は、C3スペーサーを含めることは有害な効果であることを示す。インビ

10

20

30

40

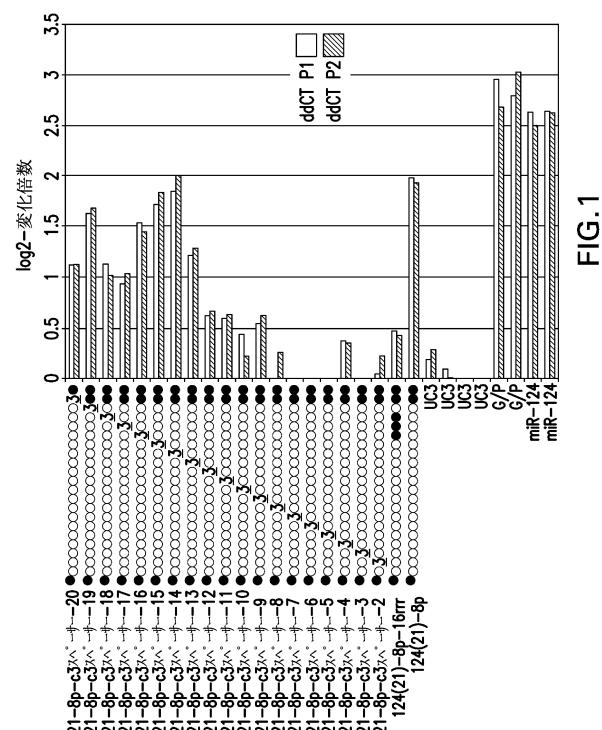
50

トロアッセイに伴う実験のばらつきにより、+0.5より大きい値または-0.5未満の値のみを有意とみなしていることに注意のこと。例えば、C3スペーサーをApoB分子485の18位に含めることは、図8に示されたノックダウンの差が0.5未満であるため、一本鎖対照と比べて有意な改善は得られない。しかしながら、C3スペーサーを同じ一本鎖ガイド分子の19位に含めると、ノックダウンの有意な改善が得られる（図9参照）。総合的に、C3スペーサーを19位に含めることは、この位置への組込みにより、試験した30種類の異なる配列の大部分（73%）でmRNAノックダウンの効力が改善されるようあるため好ましい。

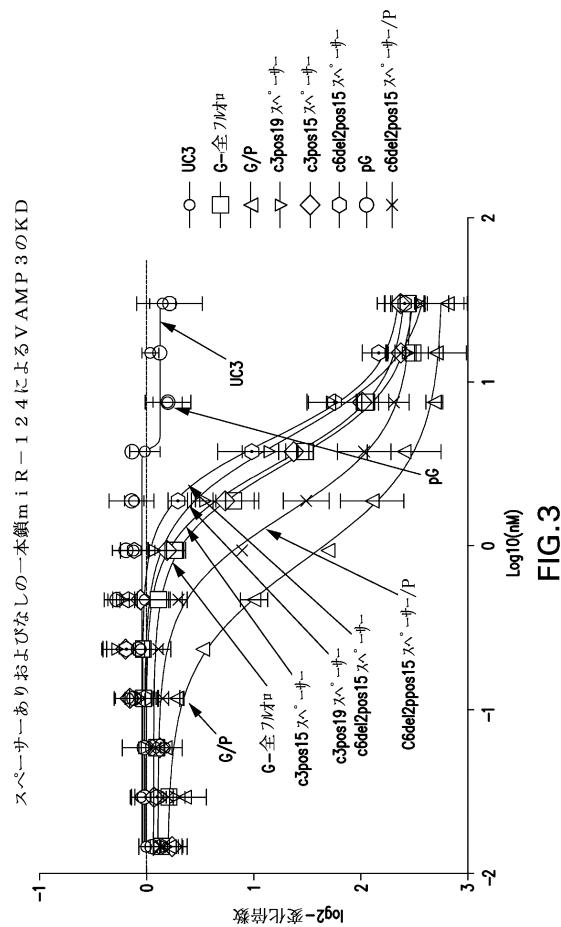
【0227】

図10において、図8と9で試験した30種類の異なる各ApoB標的部位を標的化する一本鎖分子を用いた100nM濃度でのApoB mRNAノックダウンを、C3スペーサーなしの一本鎖（「全-f1u-p」）、18位にC3スペーサーを有する一本鎖（「全-f1u-c3-18-p」）、および19位にC3スペーサーを有する一本鎖（「全-f1u-c3-19-p」）を用いて比較した。試験した一本鎖分子はすべて、ビリミジンヌクレオチドとプリンヌクレオチドの両方が2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドおよび5'リン酸基で構成されたものである。各分子の2つの3'末端ヌクレオチドは2'-O-メチルヌクレオチドである。評価した図10の一本鎖RNAi分子の配列識別名（配列番号：）を表3に示す。図10は、異なる一本鎖配列のmRNAノックダウンの全体的な有効性の範囲を示す。例えば、ApoB標的部位485を標的化する一本鎖分子は最大に有効であるが、他のもの（ApoB標的部位780または10219を標的化するものなど）のmRNAノックダウンは限定的である。30種類の異なる各配列について、図10に示したmRNAノックダウンを、C3スペーサーを含んでいない対応鎖（「全-f1u-p」）に対して標準化した。

【図1】



【図3】



【図4】

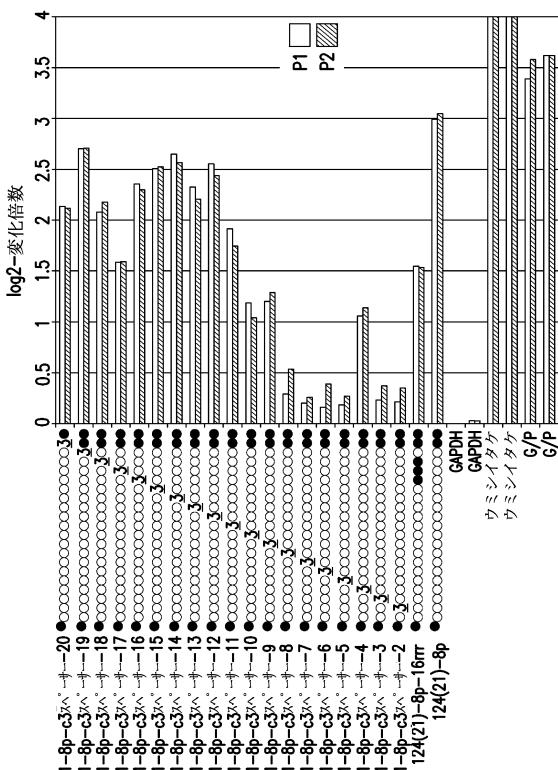


FIG.4

【図5】

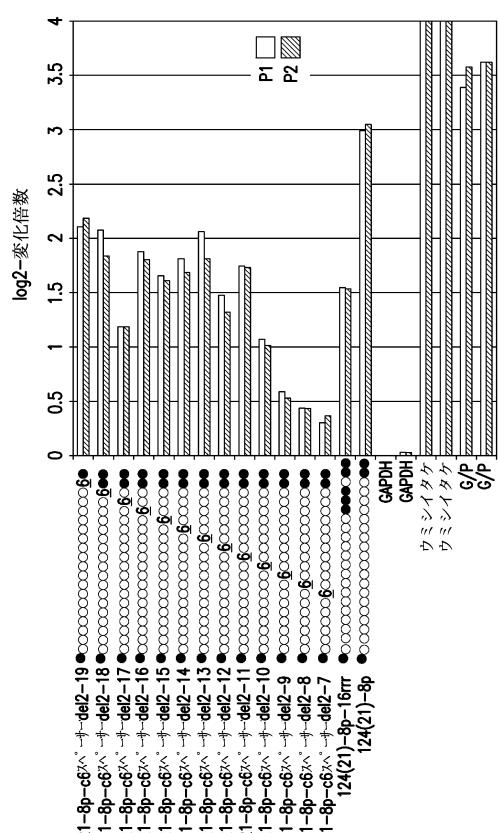
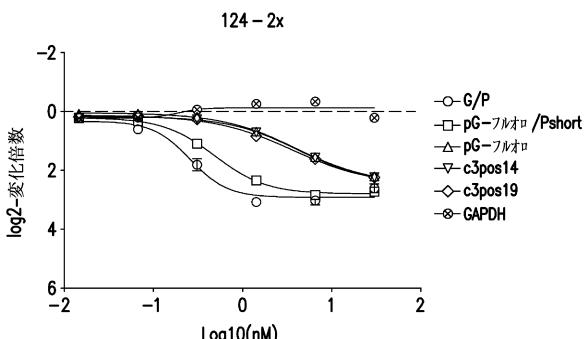


FIG.3

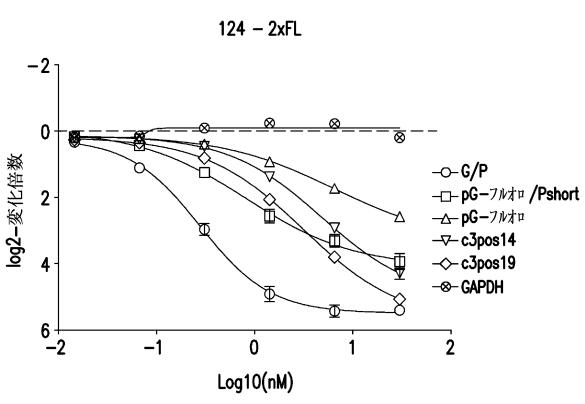
【図6 A】



124-2x

FIG.6A

【図6 B】



124-2xFL

FIG.6B

【図7】

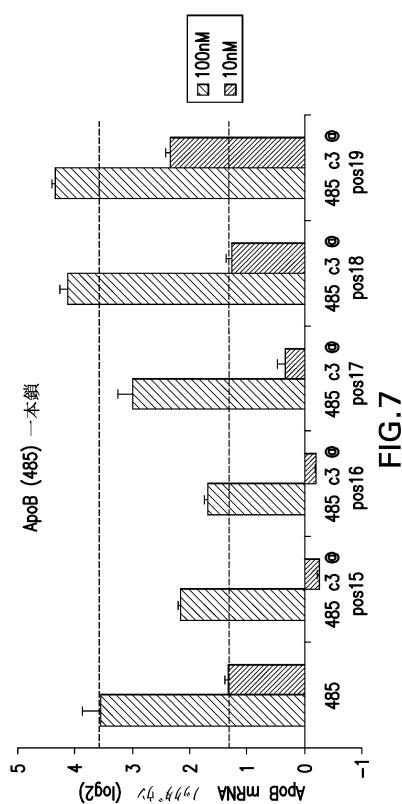
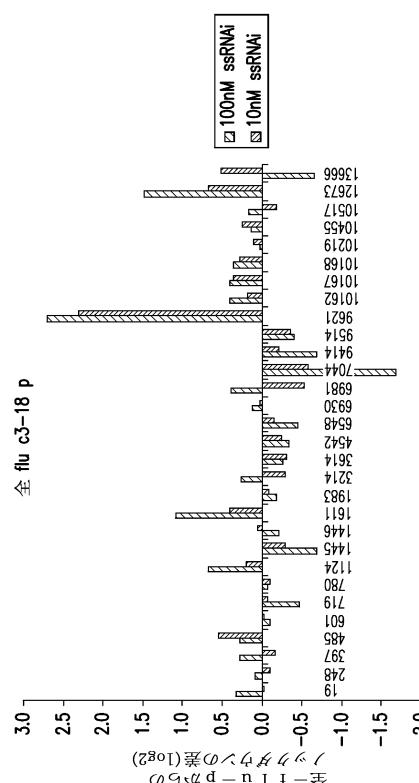


FIG.7

【図8】

FIG.8
ApoB 標的部位

【図9】

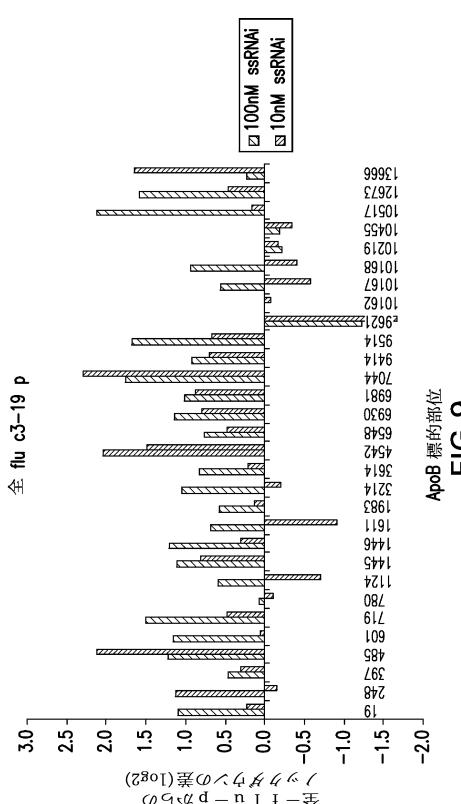


FIG.9

【図10】

FIG.10
ApoB 標的部位

【配列表】

0006106085000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100129713
弁理士 重森 一輝
(74)代理人 100137213
弁理士 安藤 健司
(74)代理人 100146318
弁理士 岩瀬 吉和
(74)代理人 100127812
弁理士 城山 康文
(72)発明者 コーン, ギヨーム
中華人民共和国、香港、シェウン・ワン、ナンバー・1・ウー・ファン・ストリート、ワン・パシ
フイツク・ハイツ、6・エフ、フラット・シー
(72)発明者 リム, リー
アメリカ合衆国、カリフォルニア・94158、サン・フランシスコ、オーウエンズ・ストリート
・1700、スイート・400
(72)発明者 ウイリングガム, アーロン
アメリカ合衆国、カリフォルニア・94158、サン・フランシスコ、オーウエンズ・ストリート
・1700、スイート・400
(72)発明者 チヨー, リーホン
アメリカ合衆国、カリフォルニア・94158、サン・フランシスコ、オーウエンズ・ストリート
・1700、スイート・400

審査官 厚田 一拓

(56)参考文献 国際公開第2006/102970 (WO, A1)
国際公開第2004/014933 (WO, A1)
米国特許出願公開第2008/0311040 (US, A1)
Bioorg. Med. Chem. Lett., 2009年, Vol.19, No.3, pp.875-877
Nucleic Acids Symp. Ser., 2009年, No.53, pp.119-120
Nucleic Acids Research, 2006年, Vol.34, No.9, pp.2773-2781

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90
Caplus / MEDLINE / BIOSIS (STN)