

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(10) 国際公開番号

WO 2012/063894 A1

(43) 国際公開日

2012年5月18日(18.05.2012)

PCT

(51) 国際特許分類:

A61K 31/7088 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2011/075924

(22) 国際出願日: 2011年11月10日(10.11.2011)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2010-254021 2010年11月12日(12.11.2010) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人愛媛大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION EHIME UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7908577 愛媛県松山市道後樋又10番13号 Ehime (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中城公一(NAKASHIRO Koichi) [JP/JP]; 〒7910295 愛媛県東温市志津川 国立大学法人愛媛大学大学院医学系研究科内 Ehime (JP). 浜川裕之(HAMAKAWA Hiroyuki) [JP/JP]; 〒7910295 愛媛県東温市志津川 国立大学法人愛媛大学大学院

医学系研究科内 Ehime (JP). 田中宏史(TANAKA Hiroshi) [JP/JP]; 〒7910295 愛媛県東温市志津川 国立大学法人愛媛大学医学部附属病院内 Ehime (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ(IKEUCHI SATO & PARTNER PATENT ATTORNEYS); 〒5306026 大阪府大阪市北区天満橋1丁目8番30号OAPタワー26階 Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

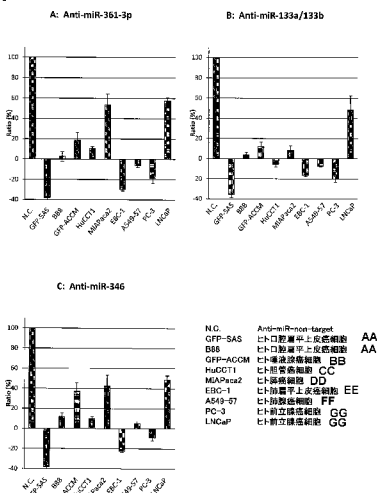
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨー

[続葉有]

(54) Title: COMPOSITIONS CONTAINING ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDE TO MICRO RNA

(54) 発明の名称: マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む組成物

[図2]



AA Human oral squamous cancer cells
BB Human salivary gland cancer cells
CC Human bile duct cancer cells
DD Human pancreatic cancer cells
EE Human lung squamous cancer cells
FF Human lung gland cancer cells
GG Human prostatic cancer cells

(57) Abstract: Provided are compositions which contain an antisense oligonucleotide to a micro RNA and are capable of inhibiting the growth of cancer cells. One embodiment of the present invention relates to a composition for inhibiting the growth of human cancer cells, said composition containing an antisense oligonucleotide to a micro RNA wherein said micro RNA is selected from the group consisting of hsa-miR-133a, hsa-miR-133b, hsa-miR-346 and hsa-miR-361-3p. Another embodiment of the present invention relates to a composition for inhibiting the growth of human head and neck cancer cells, said composition containing an antisense oligonucleotide to a micro RNA wherein said micro RNA is selected from the group consisting of hsa-miR-92a, hsa-miR-133a, hsa-miR-133b, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-197, hsa-miR-328, hsa-miR-346, hsa-miR-361-3p, hsa-miR-605, hsa-miR-766, hsa-miR-1228, hsa-miR-1252, hsa-miR-1260 and hsa-miR-1271.

(57) 要約: がん細胞の生育阻害が可能、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む組成物の提供。一態様として、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含み、前記マイクロRNAが、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-346、及びhsa-miR-361-3pからなる群から選択される、ヒトがん細胞の生育を抑制するための組成物に関する。その他の態様として、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含み、前記マイクロRNAが、hsa-miR-92a、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-139-5p、hsa-miR-197、hsa-miR-328、hsa-miR-346、hsa-miR-361-3p、hsa-miR-605、hsa-miR-766、hsa-miR-1228、hsa-miR-1252、hsa-miR-1260、及びhsa-miR-1271からなる群から選択される、ヒト頭頸部がん細胞の生育を抑制するための組

成物に関する。

WO 2012/063894 A1



ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む組成物

技術分野

[0001] 本発明は、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む組成物に関する。

背景技術

[0002] マイクロRNA (microRNA / miRNA) は、18～25塩基からなる小分子RNAであり、標的mRNAに結合することで、そのタンパク質への翻訳を阻害する。現在までに約1,100種類のヒトmiRNAがデータベース（例えば、miRBase (<http://www.miRbase.org/>)) に登録されており、これらmiRNAの発現或いは機能異常が種々の疾患に関与していることが明らかにされている（非特許文献1参照）。特に、がんに関しては、miRNAマイクロアレイを用いた網羅的発現解析によって、がん組織又はがん細胞で発現亢進又は発現抑制されているmiRNAが多数同定されている（特許文献1）。

[0003] がんで発現亢進するmiRNAとしては、miR-21、miR-155、miR-17-5p、miR-19等が知られており、中でもmiR-19は細胞がん化に必要十分であり、その標的の一つががん抑制遺伝子PTENであることが示された。このようにがん抑制遺伝子を標的としてがん遺伝子的な性質を有するmiRNAは、OncomiRと呼ばれている。

[0004] また、多くのmiRNAはがんで発現低下しており、そのようなmiRNAとしては、let-7、miR-15a、miR-34a、miR-143、miR-145等が報告されている。なかでも、let-7は、肺がんにおいて発現低下と予後とが相関することが明らかにされており、その標的にがん遺伝子Rasが含まれていることが知られている。がん遺伝子を標的としてがん抑制遺伝子様の機能を発揮するmiRNAは、Tumor suppressor miRと呼ばれる。

[0005] 一方、OncomiRなどのような疾病に関与するmiRNAを標的分子として阻害し

ようとする試みも行われている。例えば、標的miRNAと相補的な配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞に導入することにより、細胞内で標的miRNAと二本鎖を形成させて標的miRNAの機能を阻害することが提案されている（特許文献2）。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：特表2008-500837号公表
特許文献2：特表2009-532392号公表

非特許文献

- [0007] 非特許文献1：Schickel R, et al. Oncogene 27: 5959-5974, 2008.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0008] がん治療の可能性をより高めるため、さらなるOncomiRの同定と、該OncomiRを阻害できる分子の開発が期待されている。そこで、本発明は、がん細胞の生育阻害が可能な、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチド含む組成物を提供する。

課題を解決するための手段

- [0009] 本発明は、一態様として、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含み、前記マイクロRNAが、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-346、及びhsa-miR-361-3pからなる群から選択される、ヒトがん細胞の生育を抑制するための組成物に関する。
- [0010] 本発明は、その他の態様として、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含み、前記マイクロRNAが、hsa-miR-92a、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-139-5p、hsa-miR-197、hsa-miR-328、hsa-miR-346、hsa-miR-361-3p、hsa-miR-605、hsa-miR-766、hsa-miR-1228、hsa-miR-1252、hsa-miR-1260、及びhsa-miR-1271からなる群から選択される、ヒト頭頸部がん細胞の生育を抑制するための組成物に関する。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、がん細胞の生育阻害が可能となる。したがって、本発明によれば、がんの治療や予防、再発予防などに寄与できる。

図面の簡単な説明

- [0012] [図1]図1は、ヒト口腔扁平上皮がん細胞GFP-SASの増殖に対するマイクロRNAアンチセンスオリゴヌクレオチドの影響を示す蛍光写真の一例である。
- [図2]図2は、さまざまながん細胞の増殖に対するマイクロRNAアンチセンスオリゴヌクレオチドの影響を示すグラフの一例である。
- [図3]図3は、in vivoにおけるマイクロRNAアンチセンスオリゴヌクレオチドのがん細胞増殖抑制効果の一例を示すグラフである。
- [図4]図4は、in vivoにおけるマイクロRNAアンチセンスオリゴヌクレオチドのがん細胞増殖抑制効果の一例を示す写真である。

発明を実施するための形態

[0013] 本発明は、以下の態様、すなわち、

[1] マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含み、前記マイクロRNAが、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-346、及びhsa-miR-361-3pからなる群から選択される、ヒトがん細胞の生育を抑制するための組成物；

[2] マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物であって、前記マイクロRNAが、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-346、及びhsa-miR-361-3pからなる群から選択される、ヒトのがんの治療又は予防のための医薬組成物；

[3] マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含み、前記マイクロRNAが、miR-133、miR-346、及びmiR-361からなる群から選択される、非ヒトのがん細胞の生育を抑制するための組成物；

[4] 前記がんが、頭頸部がん、肺がん、胆道がん、膵臓がん、及び前立腺がんからなる群から選択される、[1]から[3]のいずれかに記載の組成物；

[5] マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含み、前記マイクロRNAが、hsa-miR-92a、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-139-5p、hsa-miR-197、hsa-miR-328、hsa-miR-346、hsa-miR-361-3p、hsa-miR-605、hsa-miR-766、hsa-miR-1228、hsa-miR-1252、hsa-miR-1260、及びhsa-miR-1271からなる群から選択される、ヒト頭頸部がん細胞の生育を抑制するための組成物；

[6] マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物であって、前記マイクロRNAが、hsa-miR-92a、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-139-5p、hsa-miR-197、hsa-miR-328、hsa-miR-346、hsa-miR-361-3p、hsa-miR-605、hsa-miR-766、hsa-miR-1228、hsa-miR-1252、hsa-miR-1260、及びhsa-miR-1271からなる群から選択される、ヒトの頭頸部がんの治療又は予防のための医薬組成物；

[7] マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含み、前記マイクロRNAが、miR-92、miR-133、miR-139、miR-197、miR-328、miR-346、miR-361、miR-605、miR-766、miR-1228、miR-1252、miR-1260、及びmiR-1271からなる群から選択される、非ヒトの頭頸部がん細胞の生育を抑制するための組成物；

[8] ヒトがん細胞の生育を抑制する方法であって、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む組成物を前記がん細胞に接触させることを含み、前記マイクロRNAが、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-346、及びhsa-miR-361-3pからなる群から選択される、ヒトがん細胞の生育を抑制する方法；

[9] ヒトのがんの治療又は予防方法であって、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む組成物を対象に投与することを含み、前記マイクロRNAが、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-346、及びhsa-miR-361-3pからなる群から選択される、ヒトのがんの治療又は予防方法；

[10] 非ヒトのがん細胞の生育を抑制する方法であって、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む組成物を前記がん細胞に接触させ

ることを含み、前記マイクロRNAが、miR-133、miR-346、及びmiR-361からなる群から選択される、非ヒトのがん細胞の生育を抑制する方法；

[11] 前記がんが、頭頸部がん、肺がん、胆道がん、膵臓がん、及び前立腺がんからなる群から選択される、[8]から[10]のいずれかに記載の方法；

[12] ヒト頭頸部がん細胞の生育を抑制する方法であって、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む組成物を前記がん細胞に接触させることを含み、前記マイクロRNAが、hsa-miR-92a、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-139-5p、hsa-miR-197、hsa-miR-328、hsa-miR-346、hsa-miR-361-3p、hsa-miR-605、hsa-miR-766、hsa-miR-1228、hsa-miR-1252、hsa-miR-1260、及びhsa-miR-1271からなる群から選択される、ヒト頭頸部がん細胞の生育を抑制する方法；

[13] ヒトの頭頸部がんの治療又は予防方法であって、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む組成物を前記がん細胞に接触させることを含み、前記マイクロRNAが、hsa-miR-92a、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-139-5p、hsa-miR-197、hsa-miR-328、hsa-miR-346、hsa-miR-361-3p、hsa-miR-605、hsa-miR-766、hsa-miR-1228、hsa-miR-1252、hsa-miR-1260、及びhsa-miR-1271からなる群から選択される、ヒトの頭頸部がんの治療又は予防方法；

[14] 非ヒトの頭頸部がん細胞の生育を抑制する方法であって、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む組成物を対象に投与することを含み、前記マイクロRNAが、miR-92、miR-133、miR-139、miR-197、miR-328、miR-346、miR-361、miR-605、miR-766、miR-1228、miR-1252、miR-1260、及びmiR-1271からなる群から選択される、非ヒトの頭頸部がん細胞の生育を抑制する方法；

に関する。

[0014] 本明細書において、「マイクロRNA (microRNA/miRNA)」とは、低分子non-codingRNAの一種をいい、当該技術分野において使用される通常の意味を

示す。本明細書においてIDを用いて言及するマイクロRNAは、データベース（例えば、miRBase (<http://www.miRbase.org/>))を参照できる。本明細書においてマイクロRNAは、特に言及がない場合、成熟型の18~25塩基からなるマイクロRNAをいう。

[0015] 本明細書において「マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチド」とは、標的とするマイクロRNAと相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをいい、好ましい形態は、一本鎖のオリゴヌクレオチドである。本発明の一実施形態として、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的とする成熟型マイクロRNAの塩基配列の全部又は一部と相補的な塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、より好ましくは、標的とする成熟型マイクロRNAの塩基配列の全部又は一部と相補的な塩基配列からなるオリゴヌクレオチドである。

[0016] 本発明における「マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチド」の長さは、一実施形態において、例えば、8~25ヌクレオチド、10~24ヌクレオチド、10~22ヌクレオチド、12~22ヌクレオチド、10~20ヌクレオチド、12~20ヌクレオチド、10~19ヌクレオチド、12~19ヌクレオチド、10~18ヌクレオチド、12~18ヌクレオチド、10~17ヌクレオチド、12~17ヌクレオチド、10~16ヌクレオチド、12~16ヌクレオチドが挙げられる。オリゴヌクレオチドの配列の長さを短くすることで非特異的なマイクロRNA阻害が一層抑制できることが考えられる。

[0017] 本明細書において、「相補的（又は、相補性）」とは、2つのヌクレオチド配列が互いに正しく対合する能力を持つことをいう。例えば、あるオリゴヌクレオチドが、ある位置において、標的とするマイクロRNAにおける対応する位置のヌクレオチドと水素結合することができれば、該オリゴヌクレオチドと該マイクロRNAとはその位置で互いに相補性であると考えられる。該オリゴヌクレオチド中の十分な数のヌクレオチドが標的マイクロRNA中の対応するヌクレオチドと水素結合を形成することができ、安定な複合体

を形成することができるときは、該オリゴヌクレオチドと該マイクロRNAとは互いに相補性であると考えられる。オリゴヌクレオチドの配列がin vitro又はin vivoで安定であるには、その標的マイクロRNAと100%相補性である必要はない。すなわち、用語「相補性」及び「特異的にハイブリダイズすることができる」は、オリゴヌクレオチドが標的分子と十分に強く特異的に結合し、非標的マイクロRNAの機能に影響を与えずに標的の正常機能と望ましい干渉をもたらすことを意味する。本発明のその他の実施形態において、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは、標的とするマイクロRNAと100%相補的な塩基配列を含む、或いは、かなるオリゴヌクレオチドである。

[0018] 本明細書において、ヌクレオチドの対合は、塩基間の水素結合をいい、DNAでいえば、AとTとの結合形態及びGとCとの結合形態をいい、RNAでいえば、AとUとの結合形態及びGとCとの結合形態を含む。マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的とするマイクロRNAのヌクレオチドと対合可能な範囲で上記A、T(U)、G、及びC以外の類似体であってもよい。

[0019] 本明細書において「オリゴヌクレオチド」は、DNA及びRNAに加え、公知の核酸アナログ、並びにこれらが混合されて構成されるオリゴヌクレオチドをいう。前記オリゴヌクレオチドは、公知の修飾が施された修飾オリゴヌクレオチドの形態を含みうる。核酸アナログとしては、LNA (Locked Nucleic Acid)、PNA (Peptide Nucleic Acid) 等の公知の核酸アナログを含む。本明細書におけるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的マイクロRNAへの特異性の向上、及び細胞増殖抑制の向上の点から、核酸アナログを含むことが好ましく、LNAを含むことがより好ましく、核酸アナログの含有率が50%を超えることがより好ましい。LNAを含むマイクロRNAアンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、特表2009-532392 (W02007/000169) を参照できる。

[0020] 本明細書において「マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチド」

における塩基は、標的マイクロRNAの機能を阻害できる範囲であれば、DNA及びRNAの塩基以外の非DNA/RNA塩基であってもよく、DNA及びRNAがフッ素などで置換された形態であってもよい。また、本明細書における「マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチド」において、ヌクレオシド間の結合は、リン酸エステル結合の以外の結合であってもよく、安定性の点からは、硫黄（S）含有結合（すなわち、ホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドであること）が好ましい。なお、本明細書における「マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチド」は、公知のもの、及び、市販のものを利用できる。

[0021] 本明細書において「細胞の生育の抑制」は、細胞の増殖の阻害及び細胞の死滅を含み、*in vivo*、*in vitro*、*ex vivo*における細胞の生育の抑制を含む。本明細書において「細胞」は、ヒト細胞及び非ヒト細胞を含む。非ヒト細胞としては、マイクロRNAの機構を備える生物が挙げられる。また、本明細書において、「非ヒト」は、ヒトを除く霊長類、ヒトを除く哺乳類、ヒトを除く脊椎動物を含む。

[0022] [第1の組成物]

本発明は、一態様として、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含み、前記マイクロRNAが、*hsa-miR-133a*、*hsa-miR-133b*、*hsa-miR-346*、及び*hsa-miR-361-3p*からなる群から選択される、ヒトがん細胞の生育を抑制するための組成物（以下、「本発明の第1の組成物」ともいう。）に関する。前記マイクロRNA（成熟型）の配列は、それぞれ、下記表1の配列番号1～4に記載される。

[0023] [表1]

(表1)

DataBase ID	Accession No.	配列(5'→3')	Seq ID	相補配列(5'→3')	Seq ID
<i>hsa-miR-133a/b</i>	MIMAT0000427	UUUGGUCCCUUCAACCAGCUG	1	CAGCTGGTTGAAGGGACCAAA	5
	MIMAT0000770	UUUGGUCCCUUCAACCAGCUA	2	TAGCTGGTTGAAGGGACCAAA	6
<i>hsa-miR-346</i>	MIMAT0000773	UGUCUGCCCGCAUGCCUGCCUCU	3	AGAGGCAGGCATGCGGGCAGACA	7
<i>hsa-miR-361-3p</i>	MIMAT0004682	UCCCCAGGUGUGAUUCUGAUUU	4	AAATCAGAATCACACCTGGGGGA	8

[0024] 本発明の第1の組成物に含まれるマイクロRNAのアンチセンスオリゴ

ヌクレオチドの一例として、上記表 1 の配列番号 5 ~ 8 のいずれかの塩基配列又はその部分配列からなるオリゴヌクレオチドが挙げられる。オリゴヌクレオチドの長さ及び核酸アナログについては、上述のとおりである。なお、本発明の第 1 の組成物は、1 種類又は複数種類のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含みうる。

[0025] なお、本明細書において、hsa-miR-133a又はhsa-miR-133bのマイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドの一実施形態としては、hsa-miR-133a及びhsa-miR-133bの双方を阻害できるアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。

[0026] 本発明の第 1 の組成物が生育を抑制する対象のヒトがん細胞のがんは、特に制限されず、例えば、頭頸部がん、悪性黒色腫、基底細胞がん、卵巣がん、乳がん、非小細胞肺がん、腎細胞がん、膀胱がん、再発性表在性膀胱がん、胃がん、前立腺がん、胆道がん、膵臓がん、肺がん、子宮頸がん、子宮頸部形成異常、喉頭乳頭腫症、結腸がん、結腸直腸がん、及びカルチノイド腫瘍を含む。本態様の組成物が生育を抑制する対象のヒトがん細胞のがんは、好ましくは、頭頸部がん、肺がん、胆道がん、膵臓がん、及び前立腺がんを含む。

[0027] 本明細書において、「頭頸部がん」とは、脳と眼を除いた首から上にできるがんをいい、一般的に、口腔がん、鼻副鼻腔がん、口唇がん、咽頭がん、喉頭がん、頸部腫瘍、耳のがんを含む。また、本明細書において、口腔がんとは、一般に、歯肉、舌、頬部、口蓋、口底、唾液腺等の口腔を構成する部位の粘膜により発生するがんをいう。

[0028] 本発明の第 1 の組成物は、対象のヒトがん細胞と接触させて当該細胞の生育を抑制するために適した試薬、薬剤、媒体を含んでもよい。或いは、本発明の第 1 の組成物は、凍結乾燥された形態であってもよい。

[0029] [第 1 の医薬組成物]

上述した本発明の第 1 の組成物は、上述したがんの治療又は予防のための医薬組成物として使用できる。したがって、本発明は、その他の態様として

、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物であって、前記マイクロRNAが、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-346、及びhsa-miR-361-3pからなる群から選択される、ヒトのがんの治療又は予防のための医薬組成物（以下、「本発明の第1の医薬組成物」ともいう。）に関する。本明細書において、がんの予防は、がんの再発の予防を含む。

[0030] 本発明の第1の医薬組成物に含まれるマイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドの一例として、上記表1の配列番号5～8のいずれかの塩基配列又はその部分配列からなるオリゴヌクレオチドが挙げられる。オリゴヌクレオチドの長さ及び核酸アナログについては、上述のとおりである。なお、本発明の第1の医薬組成物は、1種類又は複数種類のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含みうる。

[0031] 本発明の第1の医薬組成物には、さらに、薬学的に許容されるキャリアを含んでもよい。前記薬学的キャリアとしては、特に制限されないが、例えば、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドが、標的の部位、組織、細胞等に侵入する効率を高めることができるキャリア、例えば、アテロコラーゲン、リポソーム、カチオンリポソーム等が挙げられる。本態様の医薬組成物の剤形は、特に制限されず、例えば、注射剤、クリーム剤、軟膏、錠剤、懸濁剤等が挙げられる。また、投与方法も特に制限されず、例えば、注射、経口、局所、鼻内、直腸、静脈内、動脈内投与等が挙げられる。

[0032] [第2の組成物]

本発明は、さらなる態様として、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含み、前記マイクロRNAが、miR-133、miR-346、及びmiR-361からなる群から選択される非ヒトのがん細胞の生育を抑制するための組成物（以下、「本発明の第2の組成物」ともいう。）に関する。例えば、イヌのがん細胞の生育を抑制する場合には、cfa-miR-133a/b/c(MIMIAT0009834, 0009835, 0009833)、cfa-miR-346(MIMIAT0004949)、及びcfa-miR-361(MIMIAT0006751)からなる群から選択されるマイクロRNAのアンチセンスヌクレオチドを使用することができ、他の生物についても同様に対応するマイクロRNA

配列についてのアンチセンスヌクレオチドを使用できる。なお、本発明の第2の組成物は、1種類又は複数種類のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含みうる。

[0033] 本発明の第2の組成物が生育を抑制する対象の非ヒトがん細胞のがんは、特に制限されず、例えば、頭頸部がん、悪性黒色腫、基底細胞がん、卵巣がん、乳がん、非小細胞肺がん、腎細胞がん、膀胱がん、再発性表在性膀胱がん、胃がん、前立腺がん、胆道がん、膵臓がん、肺がん、子宮頸がん、子宮頸部形成異常、喉頭乳頭腫症、結腸がん、結腸直腸がん、及びカルチノイド腫瘍を含む。本態様の組成物が生育を抑制する対象の非ヒトがん細胞のがんは、好ましくは、頭頸部がん、肺がん、胆道がん、膵臓がん、及び前立腺がんを含む。本発明の第2の組成物は、対象の非ヒトがん細胞と接触させて当該細胞の生育を抑制するために適した試薬、薬剤、媒体を含んでもよい。或いは、本発明の第2の組成物は、凍結乾燥された形態であってもよい。

[0034] [第2の医薬組成物]

上述した本発明の第2の組成物は、上述したがんの治療又は予防のための医薬組成物として使用できる。したがって、本発明は、その他の態様として、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む非ヒトの医薬組成物であって、前記マイクロRNAが、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-346、及びhsa-miR-361-3pからなる群から選択される、非ヒトのがんの治療又は予防のための医薬組成物（以下、「本発明の第2の医薬組成物」ともいう。）に関する。本発明の第2の医薬組成物に含まれるマイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドの長さ及び核酸アナログについては、上述のとおりである。なお、本発明の第2の医薬組成物は、1種類又は複数種類のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含みうる。

[0035] 本発明の第2の医薬組成物には、さらに、薬学的に許容されるキャリアを含んでもよい。前記薬学的キャリアとしては、特に制限されないが、例えば、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドが、標的の部位、組織、細胞等に侵入する効率を高めることができるキャリア、例えば、アテロコ

ラーゲン、リポソーム、カチオンリポソーム等が挙げられる。本態様の医薬組成物の剤形は、特に制限されず、例えば、注射剤、クリーム剤、軟膏、錠剤、懸濁剤等が挙げられる。また、投与方法も特に制限されず、例えば、注射、経口、局所、鼻内、直腸、静脈内、動脈内投与等が挙げられる。

[0036] [第3の組成物]

本発明は、その他の態様として、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含み、前記マイクロRNAが、hsa-miR-92a、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-139-5p、hsa-miR-197、hsa-miR-328、hsa-miR-346、hsa-miR-361-3p、hsa-miR-605、hsa-miR-766、hsa-miR-1228、hsa-miR-1252、hsa-miR-1260、及びhsa-miR-1271からなる群から選択される、ヒト頭頸部がん細胞の生育を抑制するための組成物（以下、「本発明の第3の組成物」ともいう。）に関する。なお、本発明の第3の組成物は、1種類又は複数種類のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含みうる。

[0037] 本発明の第3の組成物は、一実施形態において、生育を抑制する対象のがんがヒト口腔扁平上皮がんであり、hsa-miR-92a、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-139-5p、hsa-miR-197、hsa-miR-328、hsa-miR-346、hsa-miR-361-3p、hsa-miR-605、hsa-miR-766、hsa-miR-1228、hsa-miR-1252、hsa-miR-1260、及びhsa-miR-1271からなる群から選択されるマイクロRNAを標的とするアンチセンスヌクレオチドを含む。標的とするマイクロRNA（成熟型）の配列は、下記表2の配列番号1～4及び9～18であることが好ましい。また、本実施形態の第3の組成物に含まれるマイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドの一例として、下記表2の配列番号5～8及び19～28のいずれかの塩基配列又はその部分配列からなるオリゴヌクレオチドが挙げられる。オリゴヌクレオチドの長さ及び核酸アナログについては、上述のとおりである。

[0038]

[表2]

(表2)

DataBase ID	Accession No.	配列(5'→3')	Seq ID	相補配列(5'→3')	Seq ID
hsa-miR-92a	MIMAT0000092	UAUUGCACUUGUCCCGCCUGU	9	ACAGGCCGGGACAAGTGCAATA	19
hsa-miR-133a/b	MIMAT0000427	UUUGGUCCCUUCAACCAGCUG	1	CAGCTGGTTGAAGGGGACCAAA	5
	MIMAT0000770	UUUGGUCCCUUCAACCAGCUA	2	TAGCTGGTTGAAGGGGACCAAA	6
hsa-miR-139-5p	MIMAT0000250	UCUACAGUGCAGUGUCUCCAG	10	CTGGAGACACGTGCCTGTAGA	20
hsa-miR-197	MIMAT0000227	UUCACCACCUUCUCCACCAGC	11	GCTGGGTGGAGAAGTGGTGAA	21
hsa-miR-328	MIMAT0000752	CUGGCCUCUCUGCCCUUCUGU	12	ACGGAAGGGCAGAGAGGGCCAG	22
hsa-miR-346	MIMAT0000773	UGUCUGCCCGCAUGCCUGCCUCU	3	AGAGGCAGGCAATGCCGGCAGACA	7
hsa-miR-361-3p	MIMAT0004682	UCCCCCAGGUGUGAUUCUGAUUU	4	AAATCAGAATCACACCTGGGGGA	8
hsa-miR-605	MIMAT0003273	UAAAUCCCAUGGUGCCUUCUCCU	13	UAAAUCCCAUGGUGCCUUCUCCU	23
hsa-miR-766	MIMAT0003888	ACUCCAGCCACAGCCUCAGC	14	GCTGAGGCTGTGGGCTGGAGT	24
hsa-miR-1228	MIMAT0005583	UCACACCGCCUCGCCCCU	15	GGGGGGCAGGCGAGGTGTGA	25
hsa-miR-1252	MIMAT0005944	AGAAGGAAAUUGAAUUCUUA	16	TAAATGAATTCATTTCTTCT	26
hsa-miR-1260	MIMAT0005911	AUCCACCUUCGCCACCA	17	TGGTGGCAGAGGTGGGAT	27
hsa-miR-1271	MIMAT0005796	CUUGGCACCUAGCAAGCACUCA	18	TGAGTGCTGCTAGGTGCCAAG	28

[0039] 本発明の第3の組成物は、その他の実施形態において、生育を抑制する対象のがんがヒト唾液腺がんであり、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、及びhsa-miR-361-3pからなる群から選択されるマイクロRNAを標的とするアンチセンスヌクレオチドを含む。標的とするマイクロRNA（成熟型）の配列は、下記表3の配列番号1、2及び4であることが好ましい。また、本実施形態の第3の組成物に含まれるマイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドの一例として、下記表3の配列番号5、6及び8のいずれかの塩基配列又はその部分配列からなるオリゴヌクレオチドが挙げられる。オリゴヌクレオチドの長さ及び核酸アナログについては、上述のとおりである。

[0040] [表3]

(表3)

DataBase ID	Accession No.	配列(5'→3')	Seq ID	相補配列(5'→3')	Seq ID
hsa-miR-133a/b	MIMAT0000427	UUUGGUCCCUUCAACCAGCUG	1	CAGCTGGTTGAAGGGGACCAAA	5
	MIMAT0000770	UUUGGUCCCUUCAACCAGCUA	2	TAGCTGGTTGAAGGGGACCAAA	6
hsa-miR-361-3p	MIMAT0004682	UCCCCCAGGUGUGAUUCUGAUUU	4	AAATCAGAATCACACCTGGGGGA	8

[0041] 本発明の第3の組成物は、対象のヒトがん細胞と接触させて当該細胞の生育を抑制するために適した試薬、薬剤、媒体を含んでもよい。或いは、本発明の第1の組成物は、凍結乾燥された形態であってもよい。

[0042] [第3の医薬組成物]

上述した本発明の第3の組成物は、ヒトの頭頸部がんの治療又は予防のための医薬組成物として使用できる。したがって、本発明は、その他の態様として、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物

であって、前記マイクロRNAが、hsa-miR-92a、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-139-5p、hsa-miR-197、hsa-miR-328、hsa-miR-346、hsa-miR-361-3p、hsa-miR-605、hsa-miR-766、hsa-miR-1228、hsa-miR-1252、hsa-miR-1260、及びhsa-miR-1271からなる群から選択される、ヒトの頭頸部がんの治療又は予防のための医薬組成物（以下、「本発明の第3の医薬組成物」ともいう。）に関する。なお、本発明の第3の医薬組成物は、1種類又は複数種類のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含みうる。

[0043] 本発明の第3の医薬組成物は、一実施形態において、治療又は予防対象のがんがヒト口腔扁平上皮がんであり、hsa-miR-92a、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-139-5p、hsa-miR-197、hsa-miR-328、hsa-miR-346、hsa-miR-361-3p、hsa-miR-605、hsa-miR-766、hsa-miR-1228、hsa-miR-1252、hsa-miR-1260、及びhsa-miR-1271からなる群から選択されるマイクロRNAを標的とするアンチセンスヌクレオチドを含む。標的とするマイクロRNA（成熟型）の配列は、上記表2の配列番号1～4及び9～18であることが好ましい。また、本発明の第3の組成物に含まれるマイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドの一例として、上記表2の配列番号5～8及び19～28のいずれかの塩基配列又はその部分配列からなるオリゴヌクレオチドが挙げられる。オリゴヌクレオチドの長さ及び核酸アナログについては、上述のとおりである。

[0044] 本発明の第3の医薬組成物は、その他の実施形態において、治療又は予防対象のがんがヒト唾液腺がんであり、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、及びhsa-miR-361-3pからなる群から選択されるマイクロRNAを標的とするアンチセンスヌクレオチドを含む。標的とするマイクロRNA（成熟型）の配列は、上記表3の配列番号1、2及び4であることが好ましい。また、本実施形態の第3の組成物に含まれるマイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドの一例として、上記表3の配列番号5、6及び8のいずれかの塩基配列又はその部分配列からなるオリゴヌクレオチドが挙げられる。オリゴヌクレオチドの長さ及び核酸アナログについては、上述のとおりである。

[0045] 本発明の第3の医薬組成物には、さらに、薬学的に許容されるキャリアを含んでもよい。前記薬学的キャリアとしては、特に制限されないが、例えば、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドが、標的の部位、組織、細胞等に侵入する効率を高めることができるキャリア、例えば、アテロコラーゲン、リポソーム、カチオンリポソーム等が挙げられる。本態様の医薬組成物の剤形は、特に制限されず、例えば、注射剤、クリーム剤、軟膏、錠剤、懸濁剤等が挙げられる。また、投与方法も特に制限されず、例えば、注射、経口、局所、鼻内、直腸、静脈内、動脈内投与等が挙げられる。

[0046] [第4の組成物]

本発明は、さらなる態様として、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含み、前記マイクロRNAが、miR-92、miR-133、miR-139、miR-197、miR-328、miR-346、miR-361、miR-605、miR-766、miR-1228、miR-1252、miR-1260、及びmiR-1271からなる群から選択される非ヒトのがん細胞の生育を抑制するための組成物（以下、「本発明の第4の組成物」ともいう。）に関する。なお、本発明の第4の組成物は、1種類又は複数種類のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含みうる。含まれるオリゴヌクレオチドの長さ及び核酸アナログについては、上述のとおりである。なお、本発明の第4の組成物は、凍結乾燥された形態であってもよい。

[0047] 本発明の第4の組成物は、一実施形態において、生育を抑制する対象のがんが非ヒト口腔扁平上皮がんであり、miR-92、miR-133、miR-139、miR-197、miR-328、miR-346、miR-361、miR-605、miR-766、miR-1228、miR-1252、miR-1260、及びmiR-1271からなる群から選択されるマイクロRNAを標的とするアンチセンスヌクレオチドを含む。標的とするマイクロRNA（成熟型）の配列は、対象となる非ヒト生物における対応するマイクロRNA配列についてのアンチセンスヌクレオチドを使用できる。

[0048] 本発明の第4の組成物は、その他の実施形態において、生育を抑制する対象のがんが非ヒト唾液腺がんであり、miR-133a、miR-133b、及びmiR-361-3pからなる群から選択されるマイクロRNAを標的とするアンチセンスヌクレ

オチドを含む。標的とするマイクロRNA（成熟型）の配列は、対象となる非ヒト生物における対応するマイクロRNA配列についてのアンチセンスヌクレオチドを使用できる。

[0049] [第4の医薬組成物]

上述した本発明の第4の組成物は、非ヒトの頭頸部がんの治療又は予防のための医薬組成物として使用できる。したがって、本発明は、その他の態様として、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む非ヒトの医薬組成物であって、前記マイクロRNAが、miR-92、miR-133、miR-139、miR-197、miR-328、miR-346、miR-361、miR-605、miR-766、miR-1228、miR-1252、miR-1260、及びmiR-1271からなる群から選択されるヒトの頭頸部がんの治療又は予防のための医薬組成物（以下、「本発明の第4の医薬組成物」ともいう。）に関する。本発明の第4の医薬組成物に含まれるマイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドの長さ及び核酸アナログについては、上述のとおりである。なお、本発明の第4の医薬組成物は、1種類又は複数種類のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含みうる。

[0050] 本発明の第4の医薬組成物は、一実施形態において、治療又は予防の対象のがんが非ヒト口腔扁平上皮がんであり、miR-92、miR-133、miR-139、miR-197、miR-328、miR-346、miR-361、miR-605、miR-766、miR-1228、miR-1252、miR-1260、及びmiR-1271からなる群から選択されるマイクロRNAを標的とするアンチセンスヌクレオチドを含む。標的とするマイクロRNA（成熟型）の配列は、対象となる非ヒト生物における対応するマイクロRNA配列についてのアンチセンスヌクレオチドを使用できる。

[0051] 本発明の第4の医薬組成物は、その他の実施形態において、治療又は予防の対象のがんが非ヒト唾液腺がんであり、miR-133a、miR-133b、及びmiR-361-3pからなる群から選択されるマイクロRNAを標的とするアンチセンスヌクレオチドを含む。標的とするマイクロRNA（成熟型）の配列は、対象となる非ヒト生物における対応するマイクロRNA配列についてのアンチセンスヌクレオチドを使用できる。

[0052] 本発明の第4の医薬組成物には、さらに、薬学的に許容されるキャリアを含んでもよい。前記薬学的キャリアとしては、特に制限されないが、例えば、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドが、標的の部位、組織、細胞等に侵入する効率を高めることができるキャリア、例えば、アテロコラーゲン、リポソーム、カチオンリポソーム等が挙げられる。本態様の医薬組成物の剤形は、特に制限されず、例えば、注射剤、クリーム剤、軟膏、錠剤、懸濁剤等が挙げられる。また、投与方法も特に制限されず、例えば、注射、経口、局所、鼻内、直腸、静脈内、動脈内投与等が挙げられる。

[0053] [ヒトがん細胞の増殖抑制方法]

本発明における第1及び第3の組成物によれば、対象とするヒトのがん細胞の生育を抑制できる。したがって、本発明は、その他の態様として、これらの組成物を対象のヒトがん細胞と接触させることを含むがん細胞の生育を抑制する方法に関する。接触方法は特に制限されず、前記組成物中のマイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを対象とするがん細胞に導入できる方法が採用できる。マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドをがん細胞に導入する実施形態の一つとしてリポフェクション法が挙げられる。また、リポフェクション法及びその他の導入方法時における前記アンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞への投与量としては、例えば、10～25 nMが挙げられる。

[0054] [ヒトのがんの治療及び又は予防方法]

本発明における第1及び第3の医薬組成物によれば、対象とするヒトのがんの治療や予防が可能となる。したがって、本発明は、その他の態様として、これらの医薬組成物を対象に投与することを含むがん細胞の生育を抑制する方法に関する投与する組成物の剤形は、特に制限されず、例えば、注射剤、クリーム剤、軟膏、錠剤、懸濁剤等が挙げられる。また、投与方法も特に制限されず、例えば、注射、経口、局所、鼻内、直腸、静脈内、動脈内投与等が挙げられる。投与は、治療する病状の重症度と反応性、及び治療経過に依存する。最適な投薬スケジュールは、対象の体内への薬剤の蓄積量の測定

値から計算することができる。最適用量は、個々のオリゴヌクレオチドの相対的有効性によって異なりうる。一般的には、*in vitro*及び*in vivo*動物モデルで有効であることが分かったEC50に基づいて推定することができる。一般的には、用量は0.01 μ g \sim 1g/kg体重、好ましくは0.01 \sim 100mg/kg体重であり、より好ましくは1 \sim 10mg/kg体重である。投与回数としては、1日、1週間、1月間又は1年間に1回又はそれ以上、又は2 \sim 10年間に1回投与するか、あるいは数時間 \sim 数カ月間連続注入により投与することができる。投与の反復回数は、測定した体液又は組織中の薬剤濃度と滞留時間に基づいて推定することができる。治療の成功後、病状の再発を防ぐために対象は維持療法を受けることが望ましい場合もある。

[0055] [非ヒトがん細胞の増殖抑制方法]

本発明における第2及び第4の組成物によれば、対象とする非ヒトのがん細胞の生育を抑制できる。したがって、本発明は、その他の態様として、これらの組成物を対象の非ヒトがん細胞と接触させることを含むがん細胞の生育を抑制する方法に関する。接触方法は特に制限されず、前記組成物中のマイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを対象とするがん細胞に導入できる方法が採用できる。

[0056] [非ヒトのがんの治療及び又は予防方法]

本発明における第2及び第4の医薬組成物によれば、対象とする非ヒトのがんの治療や予防が可能となる。したがって、本発明は、その他の態様として、これらの医薬組成物を非ヒト対象に投与することを含むがん細胞の生育を抑制する方法に関する投与する組成物の剤形は、特に制限されず、例えば、注射剤、クリーム剤、軟膏、錠剤、懸濁剤等が挙げられる。また、投与方法も特に制限されず、例えば、注射、経口、局所、鼻内、直腸、静脈内、動脈内投与等が挙げられる。投与は、治療する病状の重症度と反応性、及び治療経過に依存する。最適な投薬スケジュールは、対象の体内への薬剤の蓄積量の測定値から計算することができる。最適用量は、個々のオリゴヌクレオ

チドの相対的有効性によって異なりうる。一般的には、in vitro及びin vivo動物モデルで有効であることが分かったEC50に基づいて推定することができる。一般的には、用量は0.01 μ g \sim 1g/kg体重、好ましくは0.01 \sim 100mg/kg体重であり、より好ましくは1 \sim 10mg/kg体重である。投与回数としては、1日、1週間、1月間又は1年間に1回又はそれ以上、又は2 \sim 10年間に1回投与するか、あるいは数時間 \sim 数カ月間連続注入により投与することができる。投与の反復回数は、測定した体液又は組織中の薬剤濃度と滞留時間に基づいて推定することができる。治療の成功後、病状の再発を防ぐために対象は維持療法を受けることが望ましい場合もある。

実施例

[0057] 1. ヒト頭頸部がん細胞にけるOncomiRの同定

miRNA knockdown libraryを用い、下記2種類のヒト頭頸部がん細胞株におけるマイクロRNAを阻害した場合の生育に対する影響を網羅的に解析した。具体的には下記の条件で行った。

[使用した細胞株]

ヒト口腔扁平上皮がん細胞株SAS及びヒト唾液腺がん細胞株ACCMにgreen fluorescent protein (GFP) 遺伝子を導入して分離樹立したGFP安定発現株GFP-SAS及びGFP-ACCMを使用した。

[miRNA knockdown library を用いた網羅的機能解析]

96ウェルプラスチックプレート(商品名:BD Falcon、BD社製)の各ウェルに、ヒト口腔がん細胞株GFP-SASあるいはGFP-ACCMを 2×10^3 個含む10%FBS含有DMEM培地160 μ lと918種類のヒトマイクロRNAに対するLNA(Locked Nucleic Acid)/DNA knockdown probe(商品名:miRCURY LNATM microRNA Knockdown Library-Human v12.0、EXIQON社製)各5pmol、RNAiMAX(Invitrogen社製)0.4 μ lを含むOpti-MEM(Invitrogen社製)40 μ lを混合し、加えた。80時間培養した後、各ウェルのGFP蛍光強度をWallac ARVO MX 1420 Multilabel Counter(PerkinElmer社製)にて測定

し、つづいてCell Counting Kit-8 (Dojindo社製) を用いて細胞数を定量した。

[0058] 上記のknockdown libraryを用いた網羅的機能解析により、ヒト口腔扁平上皮がん細胞GFP-SASにおいて14種類(下記表4)、ヒト唾液腺がん細胞GFP-ACCMにおいて2種類(下記表5)のOncomiRを同定した。なお、ヒト唾液腺がん細胞における2種類のOncomiRは、いずれもヒト口腔扁平上皮がん細胞におけるOncomiRであった。なお、下記表4及び5において、同定されたOncomiRのmiRBase(データベース)におけるID、アクセション番号、及び、成熟マイクロRNAの配列を示す。

[0059] [表4]

(表4)

ヒト口腔扁平上皮癌細胞の悪性形質を支持する OncomiR

ID	Accession No.	配列(5'→3')	Seq ID
hsa-miR-92a	MIMAT0000092	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU	9
hsa-miR-133a/b	MIMAT0000427	UUUGGUCCCUUCAACCAGCUG	1
	MIMAT0000770	UUUGGUCCCUUCAACCAGCUA	2
hsa-miR-133b	MIMAT0000770	UUUGGUCCCUUCAACCAGCUA	2
hsa-miR-139-5p	MIMAT0000250	UCUACAGUGCACGUGUCUCCAG	10
hsa-miR-197	MIMAT0000227	UUCACCACCUUCUCCACCCAGC	11
hsa-miR-328	MIMAT0000752	CUGGCCUCUCUGCCCUUCCGU	12
hsa-miR-346	MIMAT0000773	UGUCUGCCCGCAUGCCUGCCUCU	3
hsa-miR-361-3p	MIMAT0004682	UCCCCAGGUGUGAUUCUGAUUU	4
hsa-miR-605	MIMAT0003273	UAAAUCCCAUGGUGCCUUCUCCU	13
hsa-miR-766	MIMAT0003888	ACUCCAGCCCCACAGCCUCAGC	14
hsa-miR-1228	MIMAT0005583	UCACACCUGCCUCGCCCCCC	15
hsa-miR-1252	MIMAT0005944	AGAAGGAAAUUGAAUUAUUUA	16
hsa-miR-1260	MIMAT0005911	AUCCCACCUUGCCACCA	17
hsa-miR-1271	MIMAT0005796	CUUGGCACCUAGCAAGCACUCA	18

[0060] [表5]

(表5)

ヒト唾液腺癌細胞の悪性形質を支持する OncomiR

ID	Accession No.	配列(5'→3')	Seq ID
hsa-miR-133a/b	MIMAT0000427	UUUGGUCCCUUCAACCAGCUG	1
	MIMAT0000770	UUUGGUCCCUUCAACCAGCUA	2
hsa-miR-361-3p	MIMAT0004682	UCCCCAGGUGUGAUUCUGAUUU	4

[0061] 2. アンチセンスオリゴヌクレオチド導入による増殖抑制の確認

下記のhsa-miR-133a/b、hsa-miR-346、及びhsa-miR-361-3pに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを下記条件でヒト口腔扁平上皮がん細胞GFP-SASに

導入し、細胞増殖に与える影響を評価した。

〔使用したアンチセンスオリゴヌクレオチド〕

hsa-miR-133a/b、hsa-miR-346、及びhsa-miR-361-3pに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、下記表6の配列のknockdown probe（商品名：miRCURY LNA microRNA Inhibitor、EXIQON社製）を用いた。なお、ネガティブコントロールとしては、商品名：miRCURY Knockdown control probe（配列番号32、EXIQON社製）を使用した。これらのオリゴヌクレオチドは、LNA（商品名；Locked Nucleic Acid）を含む（約20塩基のDNAに対して約8塩基程度のLNAを含む）。

〔miRNA knockdown probeの導入と細胞増殖評価法〕

96ウェルプラスチックプレートの各ウェルに、種々のヒトがん細胞を 2×10^3 個含むcomplete medium $80 \mu\text{l}$ とmiRNAに対する下記表3の配列のknockdown probe 2.5 pmol 、RNAiMAX（Invitrogen社製） $0.2 \mu\text{l}$ を含むOpti-MEM（Invitrogen社製） $20 \mu\text{l}$ を混合し、加えた。80時間培養した後、各ウェルの生存細胞が発するGFPの蛍光を蛍光顕微鏡観察した。その結果を図1に示す。

[0062] 図1に示すとおり、下記表6のhsa-miR-133a/b、hsa-miR-346、及びhsa-miR-361-3pに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒト口腔扁平上皮がん細胞GFP-SASの増殖を完全に抑制した。

[0063] [表6]

(表6)
OncomiR に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド

miRNA ID	配列(5'→3')	Seq ID
hsa-miR-133a/b	AGCTGGTTGAAGGGGACCAA	29
hsa-miR-346	GAGGCAGGCATGCGGCAGAC	30
hsa-miR-361-3p	AATCAGAATCACACCTGGGG	31
コントロール	GTGTAACACGTCTATACGCCA	32

[0064] 3. アンチセンスオリゴヌクレオチド導入による種々のがん細胞に対する増殖抑制の確認

上記表6のhsa-miR-133a/b、hsa-miR-346、及びhsa-miR-361-3pに対するア

ンチセンスオリゴヌクレオチドを、下記のさまざまながん細胞に導入して細胞増殖に与える影響を下記条件で評価した。

〔使用した細胞株〕

ヒト口腔扁平上皮がん細胞株SAS及びヒト唾液腺がん細胞株ACCMにgreen fluorescent protein (GFP) 遺伝子を導入して分離樹立したGFP安定発現株GFP-SAS及びGFP-ACCMに加え、ヒト口腔扁平上皮がん細胞株B88、ヒト膵臓がん細胞株MIAPaCa-2、ヒト胆道がん細胞株HuCCT1、ヒト肺扁平上皮がん細胞株EBC-1、ヒト肺腺がん細胞株A549、ヒト前立腺がん細胞株LNCaP（アンドロゲン依存性）、PC-3（アンドロゲン非依存性）を用いた。これら細胞株の培養には、10%牛胎児血清（FBS；Biosource International社製）、100 μ g/mlストレプトマイシン、100 U/mlペニシリン、0.25 mg/mlアンホテリシンB（Invitrogen社製）を含むダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）あるいはRPMI1640培地（Sigma-Aldrich社製）を増殖培養液として用い、空気中に5%の割合で炭酸ガスを含む培養器内で、37℃にて行った。

〔miRNA knockdown probe の導入と細胞増殖評価法〕

96ウェルプラスチックプレートの各ウェルに、種々のヒトがん細胞を 2×10^3 個含むcomplete medium 80 μ lとmiRNAに対する上記表3の配列のknockdown probe 2.5 pmol、RNAiMAX（Invitrogen社製）0.2 μ lを含むOpti-MEM（Invitrogen社製）20 μ lを混合し、加えた。80時間培養した後、各ウェルの細胞数をCell Counting Kit-8（Dojindo社製）を用いて細胞数を定量した。なお、ネガティブコントロールとしては、商品名：miRCURY Knockdown control probe（配列番号32、EXIQON社製）を使用した。その結果を図2に示す。

[0065] 図2に示すとおり、上記表6のhsa-miR-133a/b、hsa-miR-346、及びhsa-miR-361-3pに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、頭頸部がん以外のがん細胞に対しても増殖抑制効果を示した。

[0066] 4. hsa-miR-361-3pに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドのin vivoに

おけるがん細胞に対する増殖抑制の確認

hsa-miR-361-3pに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド及びネガティブコントロールをそれぞれ、下記条件で腫瘍モデルマウスに投与して腫瘍の増殖（大きさ）の経時変化を観察した。その結果を図3及び図4に示す。図3は、アンチセンスオリゴヌクレオチド及びコントロールを投与して3、6、9、及び12日後の腫瘍の大きさを下記条件で算出したグラフであり、図4は、12日後における腫瘍の写真である。

〔腫瘍モデルマウス、アンチセンスオリゴヌクレオチドの投与方法及び観察方法〕

腫瘍モデルマウスは、GFP-SAS細胞 1×10^6 個を6週齢雄のBalb/Cヌードマウス背部皮下に移植して作製した。移植後12日目に腫瘍形成を確認し、hsa-miR-361-3p に対するLNA/DNAアンチセンスオリゴヌクレオチド及びコントロールLNA/DNAオリゴヌクレオチド（いずれも上記表6に記載の塩基配列のホスホロチオエート型オリゴヌクレオチド；約20塩基のDNAに対して約8塩基程度のLNAを含む）を尾静脈から8nmol全身投与し、さらに7日後にも同様に全身投与した。初回投与から3、6、9、及び12日後に腫瘍体積を〔腫瘍体積＝長径×短径×高さ×0.5236〕の計算式を用いて算出し、抗hsa-miR-361-3pアンチセンスオリゴヌクレオチドの抗腫瘍活性を評価した。

[0067] 図3及び図4に示す通り、hsa-miR-361-3pに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドはin vivoにおいてもがん細胞の増殖抑制効果を示した。

産業上の利用可能性

[0068] 本発明は、がんに関する医薬開発、がんの医療分野、がんの研究分野等において有用である。

配列表フリーテキスト

[0069] 配列番号1～4：miRBaseに登録されているマイクロRNAの配列（hsa-miR-133a/b MIMAT0000427/ MIMAT0000770、hsa-miR-346 MIMAT0000773、hsa-miR-361-3p MIMAT0004682）

配列番号5～8：配列番号1～4の相補配列

配列番号9～18 : miRBaseに登録されているマイクロRNAの配列 (hsa-miR-9 2a MIMAT0000092、 hsa-miR-139-5p MIMAT0000250、 hsa-miR-197 MIMAT0000227、 hsa-miR-328 MIMAT0000752、 hsa-miR-605 MIMAT0003273、 hsa-miR-766 MIMAT0003888、 hsa-miR-1228 MIMAT0005583、 hsa-miR-1252 MIMAT0005944、 hsa-miR-1260 MIMAT0005911、 hsa-miR-1271 MIMAT0005796)

配列番号19～28 : 配列番号9～18の相補配列

配列番号29 : 抗hsa-miR-133a/bアンチセンスオリゴヌクレオチド

配列番号30 : 抗hsa-miR-346アンチセンスオリゴヌクレオチド

配列番号31 : 抗hsa-miR-361-3pアンチセンスオリゴヌクレオチド

配列番号32 : ネガティブコントロール

請求の範囲

- [請求項1] マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含み、前記マイクロRNAが、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-346、及びhsa-miR-361-3pからなる群から選択される、ヒトがん細胞の生育を抑制するための組成物。
- [請求項2] マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物であって、前記マイクロRNAが、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-346、及びhsa-miR-361-3pからなる群から選択される、ヒトのがんの治療又は予防のための医薬組成物。
- [請求項3] マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含み、前記マイクロRNAが、miR-133、miR-346、及びmiR-361からなる群から選択される、非ヒトのがん細胞の生育を抑制するための組成物。
- [請求項4] 前記がんが、頭頸部がん、肺がん、胆道がん、膵臓がん、及び前立腺がんからなる群から選択される、請求項1から3のいずれかに記載の組成物。
- [請求項5] マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含み、前記マイクロRNAが、hsa-miR-92a、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-139-5p、hsa-miR-197、hsa-miR-328、hsa-miR-346、hsa-miR-361-3p、hsa-miR-605、hsa-miR-766、hsa-miR-1228、hsa-miR-1252、hsa-miR-1260、及びhsa-miR-1271からなる群から選択される、ヒト頭頸部がん細胞の生育を抑制するための組成物。
- [請求項6] マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物であって、前記マイクロRNAが、hsa-miR-92a、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-139-5p、hsa-miR-197、hsa-miR-328、hsa-miR-346、hsa-miR-361-3p、hsa-miR-605、hsa-miR-766、hsa-miR-1228、hsa-miR-1252、hsa-miR-1260、及びhsa-miR-1271からなる群から選択される、ヒトの頭頸部がんの治療又は予防のための医薬組成物。
- [請求項7] マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含み、前記マイ

クロRNAが、miR-92、miR-133、miR-139、miR-197、miR-328、miR-346、miR-361、miR-605、miR-766、miR-1228、miR-1252、miR-1260、及びmiR-1271からなる群から選択される、非ヒトの頭頸部がん細胞の生育を抑制するための組成物。

[請求項8] ヒトがん細胞の生育を抑制する方法であって、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む組成物を前記がん細胞に接触させることを含み、前記マイクロRNAが、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-346、及びhsa-miR-361-3pからなる群から選択される、ヒトがん細胞の生育を抑制する方法。

[請求項9] ヒトのがんの治療又は予防方法であって、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む組成物を対象に投与することを含み、前記マイクロRNAが、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-346、及びhsa-miR-361-3pからなる群から選択される、ヒトのがんの治療又は予防方法。

[請求項10] 非ヒトのがん細胞の生育を抑制する方法であって、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む組成物を前記がん細胞に接触させることを含み、前記マイクロRNAが、miR-133、miR-346、及びmiR-361からなる群から選択される、非ヒトのがん細胞の生育を抑制する方法。

[請求項11] 前記がんが、頭頸部がん、肺がん、胆道がん、膵臓がん、及び前立腺がんからなる群から選択される、請求項8から10のいずれかに記載の方法。

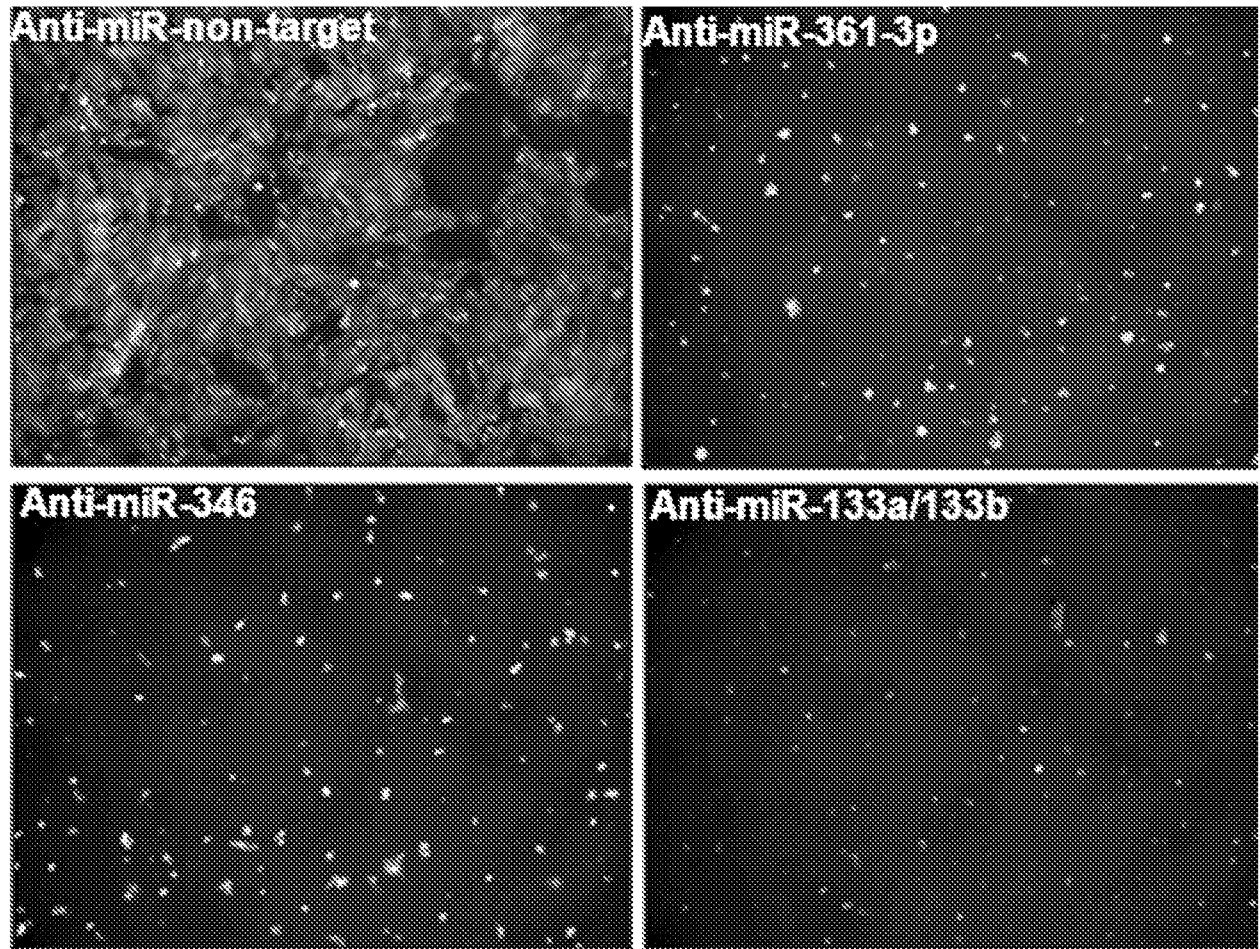
[請求項12] ヒト頭頸部がん細胞の生育を抑制する方法であって、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む組成物を前記がん細胞に接触させることを含み、前記マイクロRNAが、hsa-miR-92a、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-139-5p、hsa-miR-197、hsa-miR-328、hsa-miR-346、hsa-miR-361-3p、hsa-miR-605、hsa-miR-766、hsa-miR-1228、hsa-miR-1252、hsa-miR-1260、及びhsa-miR-1271からなる

群から選択される、ヒト頭頸部がん細胞の生育を抑制する方法。

[請求項13] ヒトの頭頸部がんの治療又は予防方法であって、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む組成物を対象に投与することを含み、前記マイクロRNAが、hsa-miR-92a、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-139-5p、hsa-miR-197、hsa-miR-328、hsa-miR-346、hsa-miR-361-3p、hsa-miR-605、hsa-miR-766、hsa-miR-1228、hsa-miR-1252、hsa-miR-1260、及びhsa-miR-1271からなる群から選択される、ヒトの頭頸部がんの治療又は予防方法。

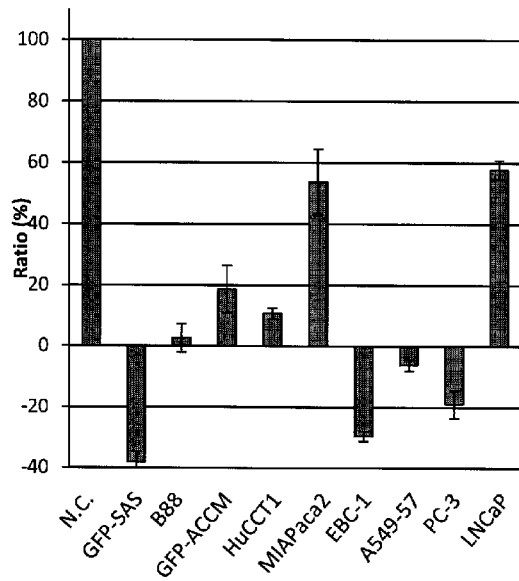
[請求項14] 非ヒトの頭頸部がん細胞の生育を抑制する方法であって、マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む組成物を前記がん細胞に接触させることを含み、前記マイクロRNAが、miR-92、miR-133、miR-139、miR-197、miR-328、miR-346、miR-361、miR-605、miR-766、miR-1228、miR-1252、miR-1260、及びmiR-1271からなる群から選択される、非ヒトの頭頸部がん細胞の生育を抑制する方法。

[図1]

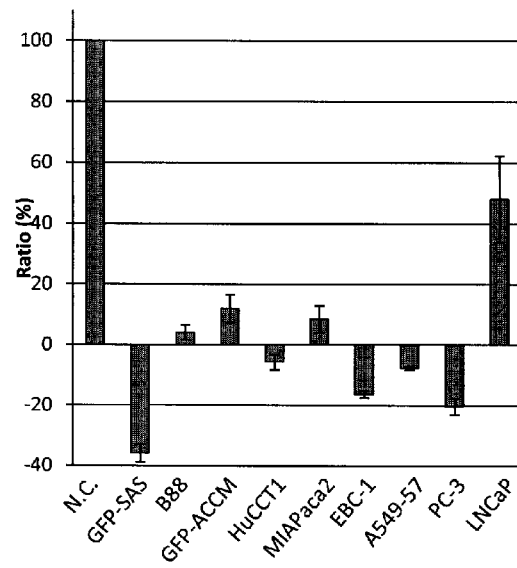


[図2]

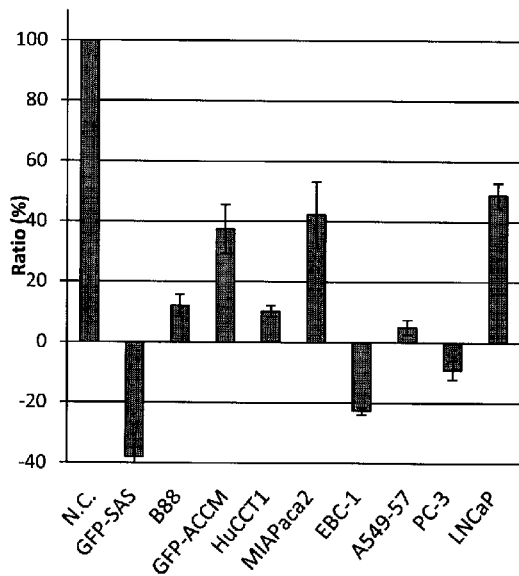
A: Anti-miR-361-3p



B: Anti-miR-133a/133b

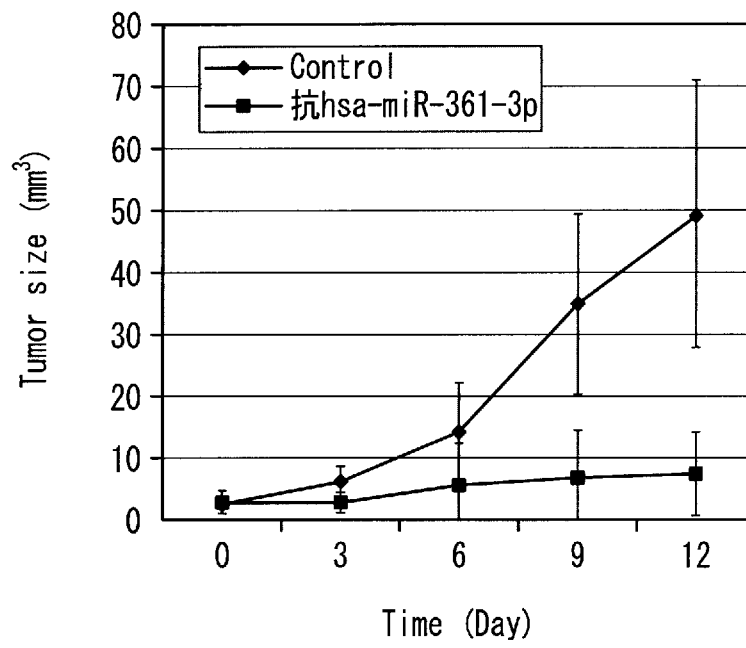


C: Anti-miR-346

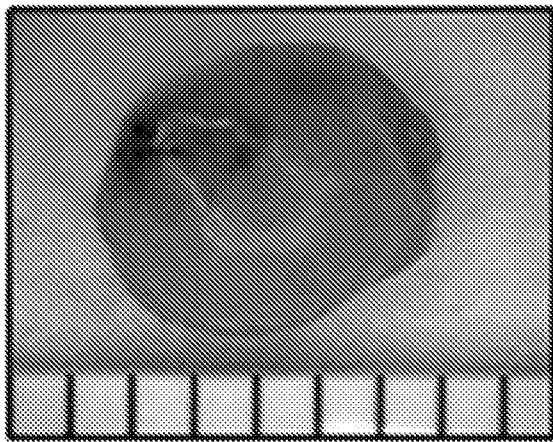


N.C.	Anti-miR-non-target
GFP-SAS	ヒト口腔扁平上皮癌細胞
B88	ヒト口腔扁平上皮癌細胞
GFP-ACCM	ヒト唾液腺癌細胞
HuCCT1	ヒト胆管癌細胞
MIAPaca2	ヒト膵癌細胞
EBC-1	ヒト肺扁平上皮癌細胞
A549-57	ヒト肺腺癌細胞
PC-3	ヒト前立腺癌細胞
LNCaP	ヒト前立腺癌細胞

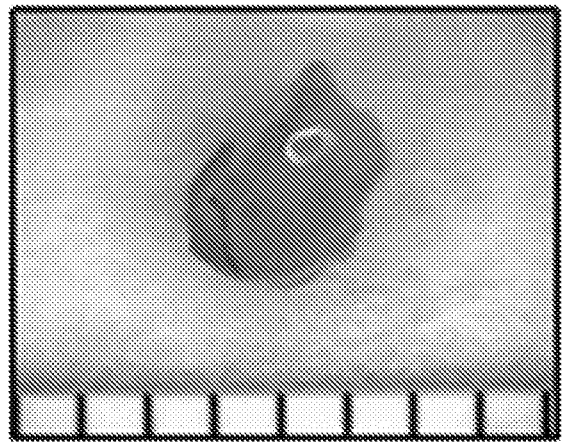
[圖3]



[圖4]



Control



抗hsa-miR-361-3p

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/075924

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K31/7088(2006.01) i, A61K48/00(2006.01) i, A61P35/00(2006.01) i, C12N15/09(2006.01) i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K31/7088, A61K48/00, A61P35/00, C12N15/09 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2011 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2008-519606 A (Ambion, Inc.), 12 June 2008 (12.06.2008), claims; examples 16, 21 & US 2008/0050744 A1 & EP 1838852 A & WO 2006/137941 A2 & CA 2587189 A & AU 2005333165 A	1-7,10,14
X	J.CLIN.ENDOCRINOL.METAB., 2006, VOL.91, P.3584-3591	1-7,10,14
X	WO 2010/056737 A2 (MIRNA THERAPEUTICS, INC.), 20 May 2010 (20.05.2010), claims; examples 1 to 3 & US 2010/0179213 A1	1-7,10,14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 05 December, 2011 (05.12.11)		Date of mailing of the international search report 13 December, 2011 (13.12.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/075924

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 8, 9, 11-13
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions set forth in claims 8, 9, and 11 to 13 pertain to methods for treatment of human being by therapy.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K31/7088(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K31/7088, A61K48/00, A61P35/00, C12N15/09		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2011年 日本国実用新案登録公報 1996-2011年 日本国登録実用新案公報 1994-2011年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2008-519606 A (アンビオン インコーポレーティッド) 2008.06.12, 特許請求の範囲、実施例16及び21 & US 2008/0050744 A1 & EP 1838852 A & WO 2006/137941 A2 & CA 2587189 A & AU 2005333165 A	1-7, 10, 14
X	J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 2006, VOL. 91, P. 3584-3591	1-7, 10, 14
X	WO 2010/056737 A2 (MIRNA THERAPEUTICS, INC.) 2010.05.20, 特許 請求の範囲、実施例1-3 & US 2010/0179213 A1	1-7, 10, 14
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 05.12.2011	国際調査報告の発送日 13.12.2011	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 吉田 佳代子 電話番号 03-3581-1101 内線 3452	4C 9516

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 8、9、11-13 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項8、9、11-13に係る発明は、ヒトの治療方法である。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。