

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-535045

(P2009-535045A)

(43) 公表日 平成21年10月1日(2009.10.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	4 C O 8 6
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 52 頁)

(21) 出願番号	特願2009-508205 (P2009-508205)	(71) 出願人	597011463
(86) (22) 出願日	平成19年5月2日 (2007.5.2)		ノバルティス アクチエンゲゼルシャフト
(85) 翻訳文提出日	平成20年12月24日 (2008.12.24)		スイス国、4 0 5 6 バーゼル、リヒトシ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2007/003867		ユトラーセ 3 5
(87) 国際公開番号	W02007/128477	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開日	平成19年11月15日 (2007.11.15)		弁理士 田中 光雄
(31) 優先権主張番号	0608838.9	(74) 代理人	100101454
(32) 優先日	平成18年5月4日 (2006.5.4)		弁理士 山田 卓二
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100067035
			弁理士 岩崎 光隆
		(74) 代理人	100062144
			弁理士 青山 稔
		(74) 代理人	100144923
			弁理士 中川 将之

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 経口投与用の低分子干渉リボ核酸 (s i R N A)

(57) 【要約】

少なくとも15ヌクレオチドにわたって互いに相補的である2本の別個のRNA鎖を含む経口投与用の低分子干渉リボ核酸(s i R N A)であって、ここで各鎖は49ヌクレオチド以下であり、そしてここでその鎖の少なくとも1本は少なくとも一つの化学的修飾を含有する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 15ヌクレオチドにわたって互いに相補的である 2本の別個の RNA鎖を含み、ここで各鎖は 49ヌクレオチド以下であり、そしてここでその鎖の少なくとも 1本は少なくとも一つの化学的修飾を含有する経口投与用の低分子干渉リボ核酸 (s i RNA)。

【請求項 2】

少なくとも 1個の修飾されたヌクレオチドを含む請求項 1に記載の s i RNA。

【請求項 3】

少なくとも 1個の 3'末端キャップを含む請求項 1または 2に記載の s i RNA。

10

【請求項 4】

該修飾されたヌクレオチドが 2'アルコキシリボヌクレオチド、2'アルコキシアルコキシリボヌクレオチド、ロックされた核酸リボヌクレオチド (LNA)、2'-フルオリボヌクレオチド、モルホリノヌクレオチドの中から選択される請求項 2または 3に記載の s i RNA。

【請求項 5】

該修飾されたヌクレオチドがホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロアミダート、ボラノホスホノエートおよびアミド結合の中から選択される修飾されたヌクレオシド内結合を有するヌクレオチドの中から選択される請求項 2から 4のいずれかに記載の s i RNA。

20

【請求項 6】

該 2本の RNA鎖が互いに完全に相補的である請求項 1から 5のいずれかに記載の s i RNA。

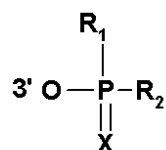
【請求項 7】

5'末端または 3'末端の少なくとも一つに 1から 6ヌクレオチドオーバーハングを含む請求項 1から 6に記載の s i RNA。

【請求項 8】

少なくとも 1個の 3'キャップが存在する場合、それは 3'炭素を介して 3'末端に抱合された化学的部分であり、かつ式 I：

【化 1】



30

[式 I]

(式中、

XはOまたはSであり、

R₁およびR₂は独立してOH、NH₂、SH、アルキル、アリール、アルキル-アリール、アリール-アルキルであり、ここでアルキル、アリール、アルキル-アリール、ア

40

リール-アルキルをさらなるヘテロ原子および官能基、好ましくはN、OもしくはSの群から選択されるヘテロ原子またはOH、NH₂、SH、カルボン酸もしくはエステル

【請求項 9】

少なくとも 1本の鎖が少なくとも 15ヌクレオチドにわたって VEGFR-1、VEG

50

FR-2、VEGFR3、Tie2、bFGFR、IL8RA、IL8RB、FasまたはIGF2RのmRNAまたはプレmRNAに相補的である請求項1から8のいずれかに記載のsiRNA。

【請求項10】

少なくとも1本の鎖が配列番号：1-900から選択される配列を含む請求項1から9のいずれかに記載のsiRNA。

【請求項11】

配列番号：901-930からなる群から選ばれるsiRNA。

【請求項12】

標準的な胃酸アッセイにおいて、同一ヌクレオチド配列を有する未修飾siRNAよりも大きな安定性を有する請求項1から11のいずれかに記載のsiRNA。

【請求項13】

標準的な胃酸アッセイにおいて、30分暴露後に50%以上である安定性を有する請求項1から11のいずれかに記載のsiRNA。

【請求項14】

標準的な血清アッセイにおいて未修飾siRNAよりも大きな安定性を有する請求項1から11のいずれかに記載のsiRNA。

【請求項15】

標準的な血清アッセイにおいて30分暴露後に50%以上である安定性を有する請求項1から11のいずれかに記載のsiRNA。

【請求項16】

標準的な腸洗浄液アッセイにおいて未修飾siRNAよりも大きな安定性を有する請求項1から11のいずれかに記載のsiRNA。

【請求項17】

同一ヌクレオチド配列の未修飾siRNAと比較して経口バイオアベイラビリティが強化されている請求項1から11のいずれかに記載のsiRNA。

【請求項18】

請求項1から17のいずれかに記載のsiRNAを含む医薬組成物。

【請求項19】

医薬品として使用するための請求項1から17のいずれかに記載のsiRNA。

【請求項20】

血管形成障害の処置用医薬品の製造における請求項1から17のいずれかに記載のsiRNAの使用。

【請求項21】

siRNAにより標的化される遺伝子が内皮細胞で発現される請求項20に記載の使用。

【請求項22】

siRNAにより標的化される遺伝子が：VEGFR-1（GenBank受入番号AF06365）；VEGFR-2（GenBank受入番号AF063658）；VEGFR-3（GenBank受入番号（NM_002020））；Tie2（TEK）（GenBank受入番号NM_000459）；bFGFR（GenBank受入番号M60485）；IL8RA（GenBank受入番号L19591）；IL8RB（GenBank受入番号L19593）；Fas（GenBank受入番号X89101）；IGF2R（GenBank受入番号NM_000876）からなる群から選ばれる請求項21に記載の使用。

【請求項23】

インビトロで血管形成過程を阻害するための請求項1から22のいずれかに記載のsiRNAの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

背景

RNA干渉は当初植物において転写後遺伝子サイレンシング(P T G S)として見出された、二本鎖RNA(dsRNA)が引き金となる高度に保存されたメカニズムであり、そしてdsRNAに相同な遺伝子の転写を下方調節できる¹。dsRNAは最初にダイサーにより低分子干渉RNA(siRNA)と称される21-23ヌクレオチドの短い二重鎖にプロセシングされる²。それはRNA誘起サイレンシング複合体(RISC)に組み込まれているので、RISCの構成成分であるアルゴノート2により標的mRNAを相同性の領域の中央で切断することにより遺伝子サイレンシングを媒介することができる³。Elbashir et al(2001)⁴では、合成siRNAの直接導入によりショウジョウバエのみならず哺乳動物細胞においてもRNA干渉遺伝子サイレンシングが媒介されることが実証された。それ以来siRNA媒介遺伝子サイレンシングは標的特定標的バリデーション研究の双方で、強力でそして広く用いられる分子生物学的手段になってきている。動物実験での遺伝子サイレンシングのためのsiRNAの使用は限られた量の動物モデルでしか記載されていない。未修飾siRNAは眼において局所的に⁵、中枢神経系において髄腔内または小脳内に⁶、および呼吸器系ウイルスの阻止のために鼻内に⁷送達された。未修飾siRNAの静脈内水力学の尾静脈注射もまた研究されている。この研究法により、主に肝臓への急速な送達が可能になる⁸。未修飾siRNAの全身投与に関しては非常に限られた数の研究しか報告されていない。Duxbury et al⁹は接着斑キナーゼを標的とする未修飾siRNAを正所性腫瘍異種移植片マウスモデルに静脈内投与し、そして腫瘍成長阻害およびゲムシタピンに対する化学増感を観察した。Soutscheck et alは内在性サイレンシングアポリタンパク質Bの代わりに高度に化学的に修飾されたsiRNAの全身使用を報告した。ほとんどの抗Apob siRNAの高用量の50mg/kgでの腹腔内投与によりApobタンパク質レベルおよびリポタンパク質濃度が低下した¹⁰。これらの事例にもかかわらず、全身送達時のsiRNAのインビボ使用は、このテクノロジーを標的バリデーションまたは治療適用に広く適用できるようにするために、改良を必要とする。実際、未修飾siRNAは、主に血流で豊富なヌクレアーゼによる酵素消化に供される。siRNAの薬理学的特性を改善するために、いくつかのグループはこれらの試薬の化学的修飾を調査した。記載された研究法は中でも非常に様々で、そして系統的な研究は依然実施されていないが、結果の概要により化学的修飾に対するsiRNAの寛容性を決定することが可能になる。ホスホロチオエート¹¹またはボラノホスフェート¹²、2'-O-メチル¹³、2'-O-アリル¹⁴、2'-メトキシエチル(MOE)および2'-デオキシフルオロヌクレオチド¹⁵またはロックされた核酸(Locked Nucleic Acid)(LNA)¹⁶のようないくつかの化学が調査されている。これらの研究により、修飾に関する寛容性は化学依存性のみならず、位置依存性でもあることが強調された。

【発明の開示】

【0002】

本発明は改善された薬理学的特性を有する最小限に修飾されたsiRNAを提供する。最小限に修飾されたsiRNAは、3'エキソヌクレアーゼ消化を防御するために各鎖の3'末端で修飾された19塩基対二本鎖RNAであり：21ヌクレオチドsiRNAの3'-ジデオキシヌクレオチドオーバーハングが一般的な3'-ヒドロキシプロピルホスホジエステル部分により置き換えられており、そして各鎖の3'末端で最初に塩基対形成している2個のヌクレオチドの修飾が血清安定性をさらに強化する。成体マウスに腹腔内または経口適用した場合、修飾されたsiRNAは成長因子誘起の血管形成モデルにおいてより高度な効力を表し、それは血清安定性の増大に相関する。

【0003】

発明の要旨

一つの態様では、本発明は経口投与用の低分子干渉リボ核酸(siRNA)を提供し、該siRNAは少なくとも15ヌクレオチドにわたって互いに相補的である2本の別個のRNA鎖を含み、ここで各鎖は49ヌクレオチド以下であり、そしてここでその鎖の少なくとも1本は少なくとも一つの化学的修飾を含有する。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 4 】

一つの実施態様では、*s i R N A*は少なくとも1個の修飾されたヌクレオチドを含む。

別の実施態様では、*s i R N A*は少なくとも1個の3'末端キャップを含む。

別の実施態様では、該修飾されたヌクレオチドは2'アルコキシリボヌクレオチド、2'アルコシアルコキシリボヌクレオチド、ロックされた核酸リボヌクレオチド(LNA)、2'-フルオロリボヌクレオチド、モルホリノヌクレオチドの中から選択される。

別の実施態様では、該修飾されたヌクレオチドはホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロアミダート、ボラノホスホノエートおよびアミド結合の中から選択される修飾されたヌクレオシド内結合を有するヌクレオチドの中から選択される。

別の実施態様では、該2本のRNA鎖は互いに完全に相補的である。

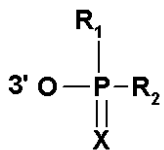
10

別の実施態様では、該*s i R N A*は5'末端または3'末端の少なくとも一つに1から6ヌクレオチドオーバーハングを含む。

【 0 0 0 5 】

別の実施態様では、*s i R N A*は少なくとも1個の3'キャップを含有し、それは3'炭素を介して3'末端に抱合された化学的部分であり、かつ式I：

【 化 1 】



20

[式 I]

(式中、

XはOまたはSであり、

R_1 および R_2 は独立してOH、 NH_2 、SH、アルキル、アリール、アルキル-アリール、アリール-アルキルであり、ここでアルキル、アリール、アルキル-アリール、アリール-アルキルをさらなるヘテロ原子および官能基、好ましくはN、OもしくはSの群から選択されるヘテロ原子またはOH、 NH_2 、SH、カルボン酸もしくはエステル群から選択される官能基により置換することができる；

または R_1 および R_2 は式Y-Zのものでよく、ここでYはO、N、Sであり、そしてZはH、アルキル、アリール、アルキル-アリール、アリール-アルキルであり、ここでアルキル、アリール、アルキル-アリール、アリール-アルキルをさらなるヘテロ原子、好ましくはN、OもしくはSの群から選択されるヘテロ原子により置換することができる)の化合物の中から選択される。

30

【 0 0 0 6 】

別の実施態様では、*s i R N A*は少なくとも15ヌクレオチドにわたってVEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR3、Tie2、bFGFR、IL8RA、IL8RB、FasまたはIGF2RのmRNAまたはプレmRNAに相補的である少なくとも1本の鎖を含有する。

別の実施態様では、*s i R N A*は配列番号：1-900から選択される配列を含む少なくとも1本の鎖を含有する。

40

別の実施態様では、*s i R N A*は配列番号：901-930からなる群から選ばれる。

別の実施態様では、*s i R N A*は標準的な胃酸アッセイにおいて、同一ヌクレオチド配列を有する未修飾*s i R N A*よりも大きな安定性を有する。

別の実施態様では、*s i R N A*は標準的な胃酸アッセイにおいて、30分暴露後に50%以上である安定性を有する。

【 0 0 0 7 】

別の実施態様では、*s i R N A*は標準的な血清アッセイにおいて未修飾*s i R N A*よりも大きな安定性を有する。

別の実施態様では、*s i R N A*は標準的な血清アッセイにおいて30分暴露後に50%

50

以上である安定性を有する。

別の実施態様では、*siRNA* は標準的な腸洗浄液アッセイにおいて未修飾 *siRNA* よりも大きな安定性を有する。

別の実施態様では、*siRNA* は同一ヌクレオチド配列の未修飾 *siRNA* と比較して経口バイオアベイラビリティが強化されている。

【0008】

一つの態様では、本発明は一つまたはそれより多い前記の特性を有する *siRNA* を含む医薬組成物を提供する。

別の態様では、本発明は医薬品として使用するための任意の一つまたはそれより多い前記の特性を有する *siRNA* を提供する。

別の態様では、本発明は血管形成障害の処置用医薬品の製造における任意の一つまたはそれより多い前記の特性を有する *siRNA* の使用を提供する。

別の態様では、本発明はインビトロで血管形成過程を阻害するための任意の一つまたはそれより多い前記の特性を有する *siRNA* の使用を提供する。

【0009】

図面の簡単な説明

図1a、1b、1c、1dおよび1e：未修飾 *siRNA* pG13-*siRNA* (マウス血清中の野生型 *siRNA*) の代謝分解；a-c) マウス血清中0分、30分および180分インキュベートした後の未修飾 *siRNA* のイオン交換-HPLC分析；37で30分インキュベートした後のイオン交換HPLCにおける主要なピークを単離し、そしてLC-MSに再注入した、d) 検出された分子量およびその割り当ての表；e) ESI-MSスペクトル。

図2：四つの二本鎖二本鎖RNA型式の説明：野生型(または未修飾) *siRNA*、MOE o/h *siRNA*、C3-*siRNA* およびC3-MOE *siRNA*。

【0010】

図3：マウス胃酸中三つの異なる型式での *siRNA* の安定性。試料をマウス胃酸中37で2 μMの濃度でインキュベートした。親化合物のバンドを定量することにより親化合物の消失を2-6時間にわたって追跡した。

レーン1-7：胃酸中t = 0、5、10、15、30、60および120分の野生型 *siRNA*

レーン8：dsRNAラダー(30、21、19、16、13、10塩基対)

レーン9-15：胃酸中t = 0、5、10、15、30、60および120分のC3 *siRNA*

レーン16：dsRNAラダー(30、21、19、16、13、10塩基対)

レーン17-24：胃酸中t = 0、5、10、15、30、60および120分のC3-MOE *siRNA*

【0011】

図4：腸洗浄液中四つの異なる型式での *siRNA* の安定性。試料を肝ミクロソーム中37で5 μMの濃度でインキュベートした。

(左から右に)

レーン1：dsRNAラダー(30、21、19、16、13、10塩基対)

レーン2-7：腸洗浄液中t = 0、15、30、60、180および360分の野生型 *siRNA*

レーン8-13：腸洗浄液中t = 0、15、30、60、180および360分のmo e o/h *siRNA*

レーン14-19：腸洗浄液中t = 0、15、30、60、180および360分のC3 *siRNA*

レーン20-25：腸洗浄液中t = 0、15、30、60、180および360分のC3-MOE *siRNA*

【0012】

図 5 : 肝ミクロソーム中四つの異なる型式での *s i R N A* の安定性。試料をラット腸洗浄液からの腸液中 37 で 2 μ M の濃度でインキュベートした。

(左から右に)

レーン 1 : d s

図 6 : マウス血清中四つの異なる型式での *s i R N A* の安定性。試料をマウス血清中 37 で 2 μ M の濃度でインキュベートした。親化合物のバンドを定量することにより親化合物の消失を 6 時間にわたって追跡した。

(左から右に)

レーン 1 : d s R N A ラダー (3 0 、 2 1 、 1 9 、 1 6 、 1 3 、 1 0 塩基対) R N A ラダー (3 0 、 2 1 、 1 9 、 1 6 、 1 3 、 1 0 塩基対)

レーン 2 : 野生型 *s i R N A* 未処理

レーン 3 : m o e o / h *s i R N A* 未処理

レーン 4 : C 3 *s i R N A* 未処理

レーン 5 : C 3 - M O E *s i R N A* 未処理

レーン 6 - 9 : 肝ミクロソーム中 2 - 5 と同一、 $t = 0$

レーン 1 0 - 1 3 : 肝ミクロソーム中 2 - 5 と同一、 $t = 6 0$ 分

レーン 1 4 - 1 7 : 上澄 S 1 2 中 2 - 5 と同一、 $t = 0$

レーン 1 8 - 2 1 : 上澄 S 1 2 中 2 - 5 と同一、 $t = 6 0$ 分

レーン 2 - 7 : マウス血清中 $t = 0$ 、1 5、3 0、6 0、1 8 0 および 3 6 0 分の野生型 *s i R N A*

レーン 8 - 1 3 : マウス血清中 $t = 0$ 、1 5、3 0、6 0、1 8 0 および 3 6 0 分の m o e o / h *s i R N A*

レーン 1 4 - 1 9 : マウス血清中 $t = 0$ 、1 5、3 0、6 0、1 8 0 および 3 6 0 分の C 3 *s i R N A*

レーン 2 0 - 2 5 : マウス血清中 $t = 0$ 、1 5、3 0、6 0、1 8 0 および 3 6 0 分の C 3 - M O E *s i R N A*

【 0 0 1 3 】

図 7 : 抗 V E G F R 2 *s i R N A* (2 個の独立した配列) の三つの型式の細胞内 (i n c e l l u l o) での特徴付け。野生型 *s i R N A*、C 3 - *s i R N A* および C 3 - M O E *s i R N A* を 3 濃度 (1、5、1 0 n M) で M S 1 細胞にトランスフェクトした。F A C S により V E G F R 2 細胞表面レベルを測定することによりサイレンシング効力を評価した。

【 0 0 1 4 】

図 8 a および 8 b : 成長因子誘起血管形成「寒天チャンバー (Agar Chamber)」マウスモデルにおける野生型 *s i R N A*、C 3 - *s i R N A* および C 3 - M o e *s i R N A* のインビボ試験。図 8 a は 1、5 および 2 5 μ g / マウス / 日の対照、未修飾 V E G F R 2 *s i R N A* および C 3 修飾 V E G F R 2 *s i R N A* の結果を示す。図 8 b は 0.2、1 および 5 μ g / マウス / 日での対照、C 3 修飾 V E G F R 2 *s i R N A* および C 3 - M O E V E G F R 2 *s i R N A* を示す。各例で 2 つの抗 V E G F R 2 *s i R N A* のプールを毎日 3 日間腹腔内に与えた。

【 0 0 1 5 】

図 9 : B 1 6 同種移植片メラノーマ腫瘍マウスモデルに 5 および 2 0 μ g / マウス / 日で腹腔内 (i . p .) に与えられた抗 V E G F R 2 C 3 - M O E *s i R N A* のインビボ試験。図 9 a は、修飾された V E G F R 2 *s i R N A* での i . p . 処置が腫瘍発達を有意に低下させることを示す。図 9 b もまた V E G F R 2 *s i R N A* の 2 0 μ g / マウスの i . p . 注射が有意な腫瘍成長の阻害を招くことを示す。

【 0 0 1 6 】

図 1 0 : 成長因子誘起血管形成マウスモデルにおける C 3 - M O E *s i R N A* のインビボ試験。抗 V E G F R 2 *s i R N A* を 2 0 μ g / マウス / 日を毎日 3 日間経口的に与えた。

10

20

30

40

50

図 1 1 : 成長因子誘起血管形成マウスモデルにおける C 3 - M O E s i R N A のインビボ試験。抗 T i e 2 s i R N A を毎日腹腔内 (1 および 0 . 2 μ g / マウス / 日) または経口的に (2 0 および 5 μ g / マウス / 日) 3 日間経口与えた。図 1 1 a : 切除組織の重量 ; 図 1 1 b : T i e 2 タンパク質ノックダウン。

【 0 0 1 7 】

発明の詳細な説明

本発明は哺乳動物における血管形成障害を処置するための組成物および方法に関する。特に本発明は哺乳動物への経口投与時に血管形成障害を処置するために使用することができる低分子干渉 R N A (「 s i R N A 」) に関する。

血管形成は以下の標的 / 遺伝子を含む血管内皮細胞を標的とする : V E G F R - 1 (GenBank 受入番号 A F 0 6 3 6 5) ; V E G F R - 2 (GenBank 受入番号 A F 0 6 3 6 5 8) ; V E G F R - 3 (GenBank 受入番号 (N M _ 0 0 2 0 2 0)) ; T i e 2 (T E K) (GenBank 受入番号 N M _ 0 0 0 4 5 9) ; b F G F R (GenBank 受入番号 M 6 0 4 8 5) ; I L 8 R A (GenBank 受入番号 L 1 9 5 9 1) ; I L 8 R B (GenBank 受入番号 L 1 9 5 9 3) ; F a s (GenBank 受入番号 X 8 9 1 0 1) ; I G F 2 R (GenBank 受入番号 N M _ 0 0 0 8 7 6) 。

【 0 0 1 8 】

本発明による s i R N A 分子は R N A 干渉 (「 R N A i 」) を媒介する。 「 R N A i 」 なる用語は当分野において周知であり、そして一般的に標的遺伝子に相補的である領域を有する s i R N A による、細胞における一つまたはそれより多い標的遺伝子の阻害を意味すると理解される。 R N A i を媒介するその能力に関して s i R N A を試験するための種々のアッセイが当分野において公知である (例えば Elbashir et al., Methods 2 6 : 1 9 9 - 2 1 3 (2 0 0 2) 参照) 。本発明による s i R N A の遺伝子発現に及ぼす影響は、本発明による R N A 分子で処理されていない細胞と比較した場合、典型的には少なくとも 1 0 % 、 3 3 % 、 5 0 % 、 9 0 % 、 9 5 % または 9 9 % まで阻害される標的遺伝子の発現に至る。

【 0 0 1 9 】

本発明による 「 s i R N A 」 または 「 低分子干渉リボ核酸 」 は以下の態様を含む当分野において公知の意味を有する。 s i R N A は生理学的条件下で相補的領域に沿ってハイブリダイズする 2 本の鎖のリボヌクレオチドからなる。鎖は別個であるが、特定の実施態様では、分子リンカーにより結合し得る。個々のリボヌクレオチドは未修飾天然発生リボヌクレオチド、未修飾天然発生デオキシリボヌクレオチドでよいが、またはそれらは本明細書の他の部分で記載されるような化学的に修飾された、もしくは合成性でよい。

【 0 0 2 0 】

本発明による s i R N A 分子は標的遺伝子の m R N A の領域と実質的に同一である二本鎖領域を含む。標的遺伝子の対応する配列に対して 1 0 0 % 同一性を有する領域が適当である。この状態は 「 完全に相補的 」 と称される。しかしながらその領域はまた、標的化される m R N A の領域の長さ依存して、標的遺伝子の対応する領域と比較して 1 、 2 または 3 個の誤対合を含有してもよく、そしてそのようなものは完全に相補的ではないかもしれない。一つの実施態様では、本発明の R N A 分子は 1 個の所定の遺伝子の特異的に標的化する。望ましい m R N A のみを標的化するために、 s i R N A 試薬は標的 m R N A に対して 1 0 0 % 相同性、および細胞または生物に存在する全てのその他の遺伝子に対して少なくとも 2 個の誤対合したヌクレオチドを有し得る。具体的な標的配列の発現を有効に阻害するために、十分な配列同一性を有する s i R N A を分析および同定するための方法が当分野において公知である。当分野において公知の配列比較およびアラインメントアルゴリズムにより配列同一性を最適化し (Gribskov and Devereux, Sequence Analysis Primer, Stockton Press, (1 9 9 1) およびそこに引用された参考文献を参照のこと) 、そして例えば BESTFIT ソフトウェアプログラムでデフォルトパラメーターを用いて実行されるような Smith - Waterman アルゴリズム (例えば University of Wisconsin Genetic Computing Group) によりヌクレオチド配列間の差異パーセントを計算することができる。

【0021】

RNAi試薬の有効性に影響を及ぼす別の因子は標的遺伝子の標的領域である。RNAi試薬による阻害に有効な標的遺伝子の領域を実験方法により決定することができる。適当なmRNA標的領域はコード化領域であろう。5'-UTR、3'-UTRおよびスプライスジャンクションのような未翻訳領域もまた適当である。例えばElbashir S.M. et al, EMBO J., 20: 6877-6888 (2001)に記載されるようなトランスフェクションアッセイをこの目的のために実施することができる。当分野では当業者に周知である多くのその他の適当なアッセイおよび方法が存在する。

【0022】

本発明にしたがって、標的に相補的なsiRNAの領域の長さは10から100ヌクレオチド、12から25ヌクレオチド、14から22ヌクレオチドまたは15、16、17もしくは18ヌクレオチドでよい。対応する標的領域に対する誤対合が存在する場合、相補的領域の長さは一般的に幾分長くなることが要求される。

siRNAはオーバーハングした末端（標的に対して相補的であってもなくてもよい）、または標的配列にではなくそれ自体に相補的なさらなるヌクレオチドを担持し得るので、siRNAの各別個の鎖の全体の長さは10から100ヌクレオチド、15から49ヌクレオチド、17から30ヌクレオチドまたは19から25ヌクレオチドでよい。

【0023】

「各鎖が49ヌクレオチド以下である」なる語句は、全ての修飾または未修飾ヌクレオチドを含むが、鎖の3'または5'末端に付加され得る任意の化学的部分を含まない、鎖の連続したヌクレオチドの全数を意味する。鎖に挿入された短い化学的部分は計数されないが、2本の別個の鎖を結合するために設計された化学的リンカーは連続したヌクレオチドを創成するとは考えられない。

「5'末端または3'末端の少なくとも一つにおける1から6ヌクレオチドオーバーハング」なる語句は生理学的条件下で2本の別個の鎖から形成される相補的siRNAの構造を指す。末端ヌクレオチドがsiRNAの二本鎖領域の一部である場合、siRNAはブラント末端と考えられる。一つまたはそれより多いヌクレオチドが末端で対形成されない場合、オーバーハングが創成される。オーバーハングの長さはオーバーハングするヌクレオチドの数により測定される。オーバーハングするヌクレオチドはいずれかの鎖の5'末端または3'末端のいずれかでよい。

【0024】

本発明によるsiRNAは少なくとも1本の鎖に少なくとも1個の修飾されたヌクレオチドを含むことにより、インピボで経口送達に適当な高い安定性を付与する。故に本発明によるsiRNAは少なくとも1個の修飾されたまたは非天然リボヌクレオチドを含有する。多くの公知の化学的修飾についての冗長な記載は公開PCT特許出願第WO2003/0918号に示され、そして本明細書で繰り返さない。経口送達のための適当な修飾をさらに具体的に本明細書の実施例および記載にて示す。適当な修飾には、限定するものではないが糖部分に対する修飾（すなわち例えば2'-O-（2-メトキシエチル）または2'-MOEのような糖部分の2'位置（Martin et al., Helv. Chim. Acta, 78: 486-504 (1995)）すなわちアルコキシアルコキシ基）または塩基部分（すなわち代替ヌクレオチド鎖の別の具体的な塩基と対形成する能力を維持する非天然または修飾された塩基）が含まれる。その他の修飾には、限定するものではないがリン酸エステル基の置換（隣接するリボヌクレオチドを例えばホスホロチオエート、キラルホスホロチオエートまたはホスホロジチオエートと連結させる）を含むいわゆる「バックボーン」修飾が含まれる。最後に、時に本明細書では3'キャップまたは5'キャップと称される末端修飾が重要である。表1にて説明されるようにキャップは、siRNAに安定性を付与することが見出されている「T-T」のようなさらなるヌクレオチドの単純な付加からなるとよい。キャップは当業者に公知である錯体化学からなるとよい。

【0025】

以下の実施例で用いられる一つの実施態様では、3'キャップは3'炭素を介して3'

10

20

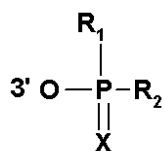
30

40

50

末端に抱合された化学的部分であり、かつ式 I :

【化 2】



[式 I]

(式中、

X は O または S であり、

R₁ および R₂ は独立して OH、NH₂、SH、アルキル、アリール、アルキル - アリール、アリール - アルキルであり、ここでアルキル、アリール、アルキル - アリール、アリール - アルキルをさらなるヘテロ原子および官能基、好ましくは N、O もしくは S の群から選択されるヘテロ原子または OH、NH₂、SH、カルボン酸もしくはエステルの群から選択される官能基により置換することができる；

または R₁ および R₂ は式 Y - Z のものでよく、ここで Y は O、N、S であり、そして Z は H、アルキル、アリール、アルキル - アリール、アリール - アルキルであり、ここでアルキル、アリール、アルキル - アリール、アリール - アルキルをさらなるヘテロ原子、好ましくは N、O もしくは S の群から選択されるヘテロ原子により置換することができる) の化合物の中から選択される。

【 0 0 2 6 】

糖部分での修飾の実例には 2' アルコキシリボヌクレオチド、2' アルコシアルコキシリボヌクレオチド、ロックされた核酸リボヌクレオチド (LNA)、2' - フルオロリボヌクレオチド、モルホリノヌクレオチドが挙げられる。

ヌクレオシド内結合を修飾することもできる。ヌクレオシド内結合の実例にはホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロアミダートおよびアミド結合が挙げられる。

R₁ は OH でよい。

R₁ および R₂ は一緒に 1 から 24 個の C 原子、1 から 12 個の C 原子、2 から 10 個の C 原子、1 から 8 個または 2 から 6 個の C 原子を含み得る。別の実施態様では、R₁ および R₂ は独立して OH、低級アルキル、低級アリール、低級アルキル - アリール、低級アリール - アルキルであり、ここで低級アルキル、低級アリール、低級アルキル - アリール、低級アリール - アルキルを前記で定義されるようなさらなるヘテロ原子および官能基により置換することができる。別の実施態様では、R₁ および R₂ は双方とも OH ではない。

【 0 0 2 7 】

有機ラジカルまたは化合物に関連する「低級」なる用語は 7 個以下の炭素原子、好ましくは 1 - 4 個の炭素原子を含む分岐しているかまたは分岐していなくてよい化合物またはラジカルを意味する。低級アルキルは、例えばメチル、エチル、n - プロピル、イソプロピル、n - ブチル、sec - ブチル、tert - ブチル、n - ペンチルおよび分岐したペンチル、n - ヘキシルおよび分岐したヘキシルを表す。

アルコキシの実例には O - Met、O - Eth、O - prop、O - but、O - pent、O - hex が挙げられる。

【 0 0 2 8 】

少なくとも 1 個の修飾されたまたは非天然リボヌクレオチドを含有する siRNA を含む siRNA の合成のための方法は周知であり、そして当業者に容易に利用可能である。例えば種々の合成化学が公開 PCT 特許出願第 WO 2005021749 号および第 WO 200370918 号 (双方共に出典明示により本明細書の一部とする) に示されている。反応を溶液中または好ましくは固相でポリマーに支持された試薬を使用することにより実施でき、続いて RNAi を媒介することができる siRNA 分子が形成される条件下で

10

20

30

40

50

合成されたRNA鎖を組み合わせる。

【0029】

本発明は経口送達に相当である少なくとも1個の修飾されたヌクレオチドを含有するsiRNAを提供する。機能的な表現ではこれは、siRNAは経口投与時に適当な薬物動態および体内分布を有し、関連する標的組織への送達を達成するであろうということを意味する。とりわけこれには血清安定性、免疫応答の欠如、および薬物様の挙動が必要とされる。本明細書の別の部分で開示される標準的な胃酸アッセイおよび標準的な血清アッセイに基づいてsiRNAのこれらの様相の多くを予想することができる。

【0030】

別の態様では、本発明は、RNAiにより少なくとも1個の標的遺伝子を阻害することができる本発明によるsiRNAを細胞に導入することを含む標的遺伝子の阻害のための方法を提供する。また、各々別の標的領域に特異的である1を超える種のsiRNAを同時にまたは逐次的に細胞に導入することができる。

10

【0031】

本発明は任意の型の標的遺伝子またはヌクレオチド配列に限定されるものではない。例えば標的遺伝子は細胞遺伝子、内因性遺伝子、病原体関連遺伝子、ウイルス遺伝子または発癌遺伝子でよい。実施例のいくつかは、経口送達された本発明のsiRNAが脈管形成、血管新生または血管形成の部位に蓄積され得ることを強調しているので、血管形成遺伝子は本発明に特に重要である。本発明に特に興味深いこれらの部位での血管形成遺伝子の最新のリストはAngioDB：血管形成および血管形成関連分子Tae - Kwon Sohn、Eun - Joung Moon¹、Seok - Ki Lee¹、Hwan - Gue Cho²およびKyu - Won Kim³のデータベース、Nucleic Acids Research, 30(1):369-371(2002)およびオンライン<http://angiodb.snu.ac.kr/>に列挙される。特に重要な遺伝子は詳細に分析されており、そして本明細書の別の部分に示されている。

20

【0032】

別の態様では、本発明はまた細胞における標的遺伝子の発現を阻害するための試薬を含むキットを提供し、ここで該キットは本発明によるdsRNAを含む。キットはインビトロまたはインビボで本発明によるdsRNAの導入を実施して、試料または対象を試験するのに必要な少なくとも一つの試薬を含む。好ましい実施態様では、かかるキットはまたキットの構成成分が使用される手順を詳記する説明書をも含む。

30

【0033】

「血管形成障害の処置」とはこの開示で使用される際には、血管新生、脈管形成および/または血管形成の生理学および病理学的過程を伴う疾患の処置のための医薬組成物における本発明の修飾されたsiRNAの使用を意味する。このようにこれらの医薬組成物は、限定するものではないが癌腫瘍成長および転移、新生物、眼血管新生（黄斑変性症、糖尿病性網膜症、虚血性網膜症、未熟児網膜症、脈絡膜血管新生を含む）、関節リウマチ、骨関節炎、慢性喘息、敗血症性ショック、炎症性疾患、滑膜炎、骨および軟骨破壊、パルス成長、骨棘形成、骨髓炎、乾癬、肥満、血管腫、カボジ肉腫、アテローム性動脈硬化症（アテローム性動脈硬化巣断裂を含む）、子宮内膜症、疣贅、多毛症、ケロイド瘢痕、アレルギー性浮腫、機能不全性子宮出血、卵胞嚢胞、卵巣過剰刺激、子宮内膜症、骨髓炎、炎症性および感染性過程（肝炎、肺炎、糸球体腎炎）、喘息、鼻ポリープ、移植、肝臓再生、白質軟化症、甲状腺炎、甲状腺肥大、リンパ球増殖性障害、血液学的悪性腫瘍、血管奇形および子癲前症を含む血管新生、脈管形成または血管形成の阻害を必要とする疾患、症状および障害を処置するために有用である。

40

【0034】

本明細書で使用される際には、「処置」とは、疾患、障害もしくは症状の過程を阻害もしくは低減させるため、疾患、障害もしくは症状の病徴を阻害もしくは低減させるため、または疾患、障害もしくは症状の発症もしくはさらなる発達を予防的に防御するために取る行動を意味する。「処置する」とはその認識動詞である。

【0035】

50

本発明の治療薬の有効用量は疾患状態を処置するために必要とされるその用量である。有効用量は疾患の型、使用される組成物、投与の経路、処置されている哺乳動物の型、考慮される具体的な哺乳動物の身体的特徴、併用薬、および医学の分野において当業者に認識されるその他の因子に依存する。一般的に効力に依存して0.1mg/kgと100mg/kg体重/日の間の量のsiRNAが投与される。本発明の核酸分子およびその処方を経口的、局所的、非経口的に、吸入もしくはスプレーにより、または直腸に従来の無毒性の薬学的に許容される担体、アジュバントおよび/またはベヒクルを含有する投薬単位処方で投与できる。非経口的なる用語は、本明細書で使用される際には、経皮、皮下、血管内（例えば静脈内）、筋肉内、腹腔内もしくはくも膜下腔内注射、または注入技術等を含む。加えて、本発明の核酸分子および薬学的に許容される担体を含む医薬用処方が提供される。一つまたはそれより多い本発明の核酸分子は、一つまたはそれより多い無毒性の薬学的に許容される担体および/または希釈剤および/またはアジュバント、ならびに所望によりその他の活性成分を伴って存在できる。本発明の核酸分子を含有する医薬組成物を経口使用に適当な形態、例えば錠剤、トローチ、ロゼンジ、水性もしくは油性懸濁液、分散性粉末もしくは顆粒、エマルジョン、硬質もしくは軟質カプセル、またはシロップもしくはエリキシルにできる。

10

20

30

40

50

【0036】

経口使用を意図される組成物を、医薬組成物の製造に関して当分野において公知の任意の方法にしたがって調製することができ、そしてかかる組成物は医薬的に洗練され、そして口当たりのよい調製物を提供するために一つまたはそれより多いかかる甘味剤、着色剤、着色剤または保存剤を含有できる。錠剤は錠剤の製造に適当である無毒性の薬学的に許容される賦形剤と混合された活性成分を含有する。これらの賦形剤は例えば炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウムまたはリン酸ナトリウムのような不活性希釈剤；顆粒化および崩壊剤、例えばトウモロコシデンプンまたはアルギン酸；結合剤、例えばデンプン、ゼラチンまたはアラビアゴム；および滑沢剤、例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルクでよい。錠剤はコーティングされていなくてよい、またはそれらを公知の技術によりコーティングすることができる。経口使用のための処方を、活性成分が不活性固体希釈剤、例えば炭酸カルシウム、リン酸カルシウムもしくはカオリンと混合される硬質ゼラチンカプセルとして、または活性成分が水もしくは油性溶媒、例えば落花生油、液体パフィンもしくはオリーブ油と混合される軟質ゼラチンカプセルとして提示することもできる。水性懸濁液は水性懸濁液の製造に適当な賦形剤との混合物中に活性成分を含有する。

【0037】

本発明の組成物の経口投与は胃または腸に直接的に、最も重要には患者による嚥下制御投薬形態によるが、またかかる送達のその他の機械的および補助的手段による物質を投与するための全ての標準的な技術を含む。

【0038】

約0.1mgから約140mg/kg体重/日のオーダーの投薬量レベルが前記で指示された症状の処置において有用である（約0.5mgから約7g/対象/日）。単回投薬形態を生成するための担体材料と組み合わせることができる活性成分の量は、処置される宿主および投与の特定の様式に依存して異なる。一般的に投薬単位形態は約1mgから約500mgの間の活性成分を含有する。任意の特定の対象に関する具体的な用量レベルは用いられる具体的な化合物の活性、年齢、体重、一般健康状態、性別、食事、投与の時間、投与の経路、ならびに排出の速度、薬物の組み合わせおよび治療を行っている特定の疾患の重篤度を含む種々の因子に依存することは理解される。

【0039】

本発明の治療薬の治療効果をその他の薬剤との組み合わせにより強化することができる。典型的にはかかるその他の薬剤には血管形成障害のような類似の疾患の処置に使用されることが知られている薬剤が含まれよう。これに代えて、かかる薬剤を使用して本発明の治療薬により引き起こされる副作用または望ましくない影響を低減させることができる。

【 0 0 4 0 】

本発明の s i R N A はまた重要な調査用途をも有する。かかる研究の一つにはインビトロでの血管形成過程への調査が含まれる。「インビトロでの血管形成過程」とは動物全身を用いない血管形成または脈管形成を研究するための任意の過程を意味する。このように血管形成のマーカーまたは指標を使用して血管形成過程の工程を研究するインビトロまたはエキソビボ方法およびアッセイはここに含まれる。

【 0 0 4 1 】

R N A 鎖ヌクレオチド配列

表 1 で同定される s i R N A 鎖配列は以下の標的に対する適当な s i R N A 配列として同定されている： V E G F R - 1 (GenBank 受入番号 A F 0 6 3 6 5) ; V E G F R - 2 (GenBank 受入番号 A F 0 6 3 6 5 8) ; V E G F R - 3 (GenBank 受入番号 (N M _ 0 0 2 0 2 0)) ; T i e 2 (T E K) (GenBank 受入番号 N M _ 0 0 0 4 5 9) ; b F G F R (GenBank 受入番号 M 6 0 4 8 5) ; I L 8 R A (GenBank 受入番号 L 1 9 5 9 1) ; I L 8 R B (GenBank 受入番号 L 1 9 5 9 3) ; F a s (GenBank 受入番号 X 8 9 1 0 1) ; I G F 2 R (GenBank 受入番号 N M _ 0 0 0 8 7 6) 。

10

【 0 0 4 2 】

表 1 : ヒト V E G F R - 1 、 V E G F R - 2 、 V E G F R - 3 、 T i e 2 、 b F G F R 、 I L 8 R A 、 I L 8 R B 、 F a s 、 I G F 2 R に対する s i R N A

【表 1】

標の名	位置	siRNA ^a 配列	配列	siRNA相補体	配列
			番号		番号
VEGFR-1	1731	UAUAAGAACUUGUUAACUGTG	1	CAGUUAACAAGUUCUUAUATT	451
VEGFR-1	1021	UACGGUUUCAAGCACCUGCTG	2	GCAGGUGCUUGAAACCGUATT	452
VEGFR-1	1209	UUUAUGCUCAGCAAGAUUGTA	3	CAAUCUUGCUGAGCAUAAATT	453
VEGFR-1	2904	UUAUCUUCUGAAAGCCGGAG	4	CCGGCUUCAGGAAGUAATT	454
VEGFR-1	1363	UUGAGGGAUACCAUAUGCGGT	5	CGCAUAUGGUAUCCCUCAATT	455
VEGFR-1	1158	UUGAUAAUUAACGAGUAGCCA	6	GCUACUCGUUAAUUAUCAATT	456
VEGFR-1	1091	UUAACCAUACAACUCCGGCG	7	CCGGAAGUUGU AUGGUUATT	457
VEGFR-1	471	UUAGGUGACGUAA CCCGGCAG	8	GCCGGGUUACGUCACCUAATT	458
VEGFR-1	2751	UUGCUCUUGAGGUAGUUGGAG	9	CCAACUACCUCAAGAGCAATT	459
VEGFR-1	636	UUUGUCUUAUACAA AUGCCCA	10	GGCAUUUGUAU AAGACAAATT	460
VEGFR-1	1254	UUGACAAUAGAGUGGCAGTG	11	CUGCCACUCUA AUUGUCAATT	461
VEGFR-1	2375	UUAUAAUUGAUAGGUAGUCAG	12	GACUACCUAUCAAUUAUATT	462
VEGFR-1	3536	UUGAGUAUGUAAA CCCACUAT	13	AGUGGGUUACAUACUCAATT	463
VEGFR-1	2971	UUCCAUAUGAUGGGCUCCTT	14	GGAGCCCAUCAUAUGGAATT	464
VEGFR-1	1774	UCUGUUAUUAACUGUCCGCAG	15	GCGGACAGUUAUAACAGATT	465
VEGFR-1	3494	UUGGGAUGUAGUCUUUACCAT	16	GGUAAAGACUACA UCCCAATT	466
VEGFR-1	2269	UGUUAGAGUGAUCAGCUC CAG	17	GGAGCUGAUCA CUCUAACATT	467
VEGFR-1	525	UUUCCAUCAGGGAUCAAAGTG	18	CUUUGAUCCCUGAUGGAAATT	468
VEGFR-1	769	UUGAACUCUCGUGUUAAGGG	19	CUUGAACACGAGAGUUAATT	469
VEGFR-1	2246	UAGACUUGUCCGAGGUUCCTT	20	GGAACCUCGGACAAGUCUATT	470
VEGFR-1	732	UUGAGGACAAGAGUAUGGCCT	21	GCCAUACUCUUGUCCUCAATT	471
VEGFR-1	3813	UUACUGGUUACUCUCAAGUCA	22	ACUUGAGAGUA ACCAGUAATT	472
VEGFR-1	3925	UUCCAGCUCAGCGUGGUCGTA	23	CGACCACGCUGAGCUGGAATT	473
VEGFR-1	1414	UGCUCGGAUGAUUAUGGTT	24	CCAUAUUAUCCGAAGCATT	474
VEGFR-1	615	UUGACUGUUGCUUCACAGGTC	25	CCUGUGAAGCAACAGUCAATT	475
VEGFR-1	3300	UCAUCCAUUUGUACUCCUGGG	26	CAGGAGUACAA AUGGAUGATT	476
VEGFR-1	2845	UGGUUUCUUGCCUUGUUC CAG	27	GGAACAAGGCAAGAAACCATT	477
VEGFR-1	2802	UUAGGCUCCAUGUGUAGUGCT	28	CACUACACAUGGAGCCUAATT	478
VEGFR-1	1564	UCUAGAGUCAGCCACAACCAA	29	GGUUGUGGCUGACUCUAGATT	479
VEGFR-1	1154	UAAUUAACGAGUAGCCACGAG	30	CGUGGCUACUCGUAAUUAATT	480

10

20

30

【表 2】

VEGFR-1	1090	UAACCAUACAACUCCGGCGA	31	GCCGGAAGUUGUAUGGUUATT	481
VEGFR-1	1260	UUCACAUUGACAAUAGAGTG	32	CUCUAAUUGUCAUGUGAATT	482
VEGFR-1	3530	AUGUAAACCCACUAAUUCCTG	33	GGAAAUAGUGGGUUACAUTT	483
VEGFR-1	1177	AUCCUCUUCAGUACGUCCTT	34	GGACGUAACUGAAGAGGAUTT	484
VEGFR-1	1193	UUGUAUAAUCCCUGCAUCCT	35	GAUGCAGGGAAUUAUACAATT	485
VEGFR-1	1092	UUUAACCAUACAACUCCGGC	36	CGGAAGUUGUAUGGUUAAATT	486
VEGFR-1	627	UACAAAUAGCCCAUUGACUGTT	37	CAGUCAAUGGGCAUUUGUATT	487
VEGFR-1	474	AUGUUAGGUGACGUAACCCGG	38	GGGUUACGUCACCUAACAUUTT	488
VEGFR-1	2761	UAAGUCACGUUUGCUCUUGAG	39	CAAGAGCAAAAGUGACUUATT	489
VEGFR-1	2752	UUUGCUCUUGAGGUAGUUGGA	40	CAACUACCUCAGAGCAAATT	490
VEGFR-1	3516	UUUCCUGUCAGUAUGGCAUTG	41	AUGCCAUAUCGACAGGAAATT	491
VEGFR-1	1790	UACUGUAGUGCAUUGUUCUGT	42	AGAACAAUGCACUACAGUATT	492
VEGFR-1	1155	AUAAUUAACGAGUAGCCACGA	43	GUGGCUACUCGUUAAUUAUTT	493
VEGFR-1	1370	UUGUAGGUUGAGGGAUACCAT	44	GGUAUCCCUCAACCUACAATT	494
VEGFR-1	2227	UUGAACAGUGAGGUAUGCUGA	45	AGCAUACCUCACUGUUCAATT	495
VEGFR-1	3481	UUUACCAUCCUGUUGUACATT	46	UGUACAACAGGAUGGUAAATT	496
VEGFR-1	1261	UUUCACAUUGACAAUAGAGT	47	UCUAAUUGUCAUUGUGAAATT	497
VEGFR-1	1791	AUACUGUAGUGCAUUGUUCTG	48	GAACAAUGCAUACAGUAUTT	498
VEGFR-1	3805	UACUCUCAAGUCAAUUCUUGAG	49	CAAGAUUGACUUGAGAGUATT	499
VEGFR-1	2764	AAAUAGUCACGUUUGCUCTT	50	GAGCAAACGUGACUUAUUUTT	500
VEGFR-2	617	UAAUAGACUGGUAACUUCAT	51	GAAAGUUACCAGUCUAUUATT	501
VEGFR-2	2686	UAGAAGGUUGACCACAUUGAG	52	CAAUGUGGUAACCUUCUATT	502
VEGFR-2	561	UAGCUGAUCAUGUAGCUGGGA	53	CCAGCUACAUGAUCAGCUATT	503
VEGFR-2	525	UUGCUGUCCCAGGAAAUUCTG	54	GAAUUUCCUGGGACAGCAATT	504
VEGFR-2	2277	AUGAUUCCAAGUUCGUCUTT	55	AGACGAACUUGGAAUUAUTT	505
VEGFR-2	395	UAAUGUACACGACUCCAUGTT	56	CAUGGAGUCGUGUACAUAUTT	506
VEGFR-2	2410	UUCAUCUGGAUCCAUGACGAT	57	CGUCAUGGAUCCAGAUGAATT	507
VEGFR-2	2007	UGAUUCUCCAGGUUCCUGTG	58	CAGGAAACUGGAGAAUUAUTT	508
VEGFR-2	1323	UAGACCGUACAUGUCAGCGTT	59	CGCUGACAUGUACGGUCUATT	509
VEGFR-2	3382	UUCUGGUGUAGUAUAUCAGG	60	UGAUUAUACUACACCAGAATT	510

10

20

30

【表 3】

VEGFR-2	3078	UUUCGUGCCGCCAGGUCCCTG	61	GGGACCUGGCGGCACGAAATT	511
VEGFR-2	1432	UUCUUCACAAAGGGUAUGGGTT	62	CCCAUACCCUUGUGAAGAATT	512
VEGFR-2	1817	UCAAUUUCCAAAGAGUAUCCA	63	GAUACUCUUUGGAAAUUGATT	513
VEGFR-2	688	UAGUCAAUCCAUGAGACGG	64	GUCUCAUGGAAUUGAACUATT	514
VEGFR-2	2310	AACAUGGCAAUACCCGCCGTG	65	CGGCGGUGAUUGCCAUGUUTT	515
VEGFR-2	2130	UCCUCAAUACAAUGCCUGAG	66	CAGGCAUUGUAUUGAAGGATT	516
VEGFR-2	799	UACAAGUUUCUUAUGCUGATG	67	UCAGCAUAAGAAACUUGUATT	517
VEGFR-2	3523	UGAU AUCGGAAGAACAUGTA	68	CAUUGUUCUCCGAUUCATT	518
VEGFR-2	1843	UGUGCUAUUAGAGAACAUGGT	69	CAUGUUCUCUAAUAGCACATT	519
VEGFR-2	2941	UUCUACAUCACUGAGGGACTT	70	GUCCUCAGUGAUGUAGAATT	520
VEGFR-2	2088	UCUUUAAACCAUGAUCUGT	71	AGAUCAUGUGGUUAAAGATT	521
VEGFR-2	472	UCUUGCACAAAGUGACACGTT	72	CGUGUCACUUUGUGCAAGATT	522
VEGFR-2	180	UGAUUAUUGGCCAAAGCCAG	73	GGCUUUGGCCCAAUAAUCATT	523
VEGFR-2	1568	AUUUGUACAAAGCUGACACAT	74	GUGUCAGCUUUGUACAAAUTT	524
VEGFR-2	3141	UAAAUUACCCGGGCCAAGCCA	75	GCUUGGCCCGGGAUUAUUATT	525
VEGFR-2	3769	AACCAUACCAUGUCCGUCTG	76	GACGGACAGUGGUAUGGUUTT	526
VEGFR-2	3920	UGUCAUCGGAGUGAUUCCGG	77	GGAUUACACUCCGAUGACATT	527
VEGFR-2	1718	UCUCAACGUAGAUCUGUCTG	78	GACAGAUCUACGUUUGAGATT	528
VEGFR-2	2919	UCCUCCACAAAUCCAGAGCTG	79	GCUCUGGAUUUGUGGAGGATT	529
VEGFR-2	324	UAAAUGACCGAGGCCAAGUCA	80	ACUUGGCCUCGGUCAUUUATT	530
VEGFR-2	1050	UAACCAAGGUACUUCGCAGGG	81	CUGCGAAGUACCUUGGUUATT	531
VEGFR-2	56	UAGGCAAACCCACAGAGGCGG	82	GCCUCUGUGGUUUGCCUATT	532
VEGFR-2	2453	UGGCAUCAUAAGGCAGUCGTT	83	CGACUGCCUUAUGAUGCCATT	533
VEGFR-2	1303	UUGAGUGGUGCCGUACUGGTA	84	CCAGUACGGCACCACUCAATT	534
VEGFR-2	1813	UUUCCAAAGAGUAUCCAAGTT	85	CUUGGAUACUUCUUGGAAATT	535
VEGFR-2	2015	UUGUCGUCUGAUUCUCCAGGT	86	CUGGAGAAUCAGACGACAATT	536
VEGFR-2	3088	UAAGAGGAUAUUUCGUGCCGC	87	GGCACGAAAUAUCCUCUUATT	537
VEGFR-2	625	UAUGUACAUAUAGACUGGTA	88	CCAGUCUAUUAUGUACAUATT	538
VEGFR-2	800	UUACAAGUUUCUUAUGCUGAT	89	CAGCAUAAGAAACUUGUAATT	539
VEGFR-2	811	UAGGUCUCGGUUACAAGUTT	90	ACUUGUAAACCGAGACCUATT	540

10

20

30

【表 4】

VEGFR-2	812	UUAGGUCUCGGUUACAAGTT	91	CUUGUAAACCGAGACCUAATT	541
VEGFR-2	3093	UCCGAUAAGAGGAUUAUUCGT	92	GAAUAUCCUCUUAUCGGATT	542
VEGFR-2	801	UUUACAAGUUUCUUAUGCUGA	93	AGCAUAAGAAACUUGUAAATT	543
VEGFR-2	2009	UCUGAUUCUCCAGGUUUCCTG	94	GGAAACCUGGAGAAUCAGATT	544
VEGFR-2	2127	UUCAAUACAAUGCCUGAGUCT	95	ACUCAGGCAUUGUAUUGAATT	545
VEGFR-2	1585	UUUGUUGACCGCUUCACAUTT	96	AUGUGAAGCGGUCAACAAATT	546
VEGFR-2	562	AUAGCUGAUCUAGUCUGGG	97	CAGCUACAUGAUCAGCUAUTT	547
VEGFR-2	3906	UAUCCGGACUGGUAGCCGCTT	98	GCGGCUACCAGUCCGGAUATT	548
VEGFR-2	1316	UACAUGUCAGCGUUUGAGUGG	99	ACUCAAACGCUGACAUGUATT	549
VEGFR-2	3520	UAUCGGAAGAACAUGUAGTC	100	CUACAUUGUUCUCCGAUATT	550
VEGFR-3	453	UUCUGUUGACCAAGAGCGTG	101	CGCUCUUGGUCAACAGGAATT	551
VEGFR-3	2694	UUGAGCUCCGACAUCAGCGCG	102	CGCUGAUGUCGGAGCUAATT	552
VEGFR-3	1689	UUGGAUUCGAUGGUGAAGCCG	103	GCUUCACCAUCGAAUCCAATT	553
VEGFR-3	988	UUCAUGCACAAUGACCUCGGT	104	CGAGGUCAUUGUGCAUGAATT	554
VEGFR-3	4374	UUACCAAGGAAUAUCCGGCGG	105	GCCGAUUAUCCUUGGUAATT	555
VEGFR-3	2142	UCUUUGUACCACGAUGCTG	106	GCAUCGUGUGGUACAAAGATT	556
VEGFR-3	1833	UUGCAGUCGAGCAGAAGCGGG	107	CGCUUCUGCUCGACUGCAATT	557
VEGFR-3	3903	UUCAGCUACCUGAAGCCGCTT	108	GCGGCUUCAGGUAGCUGAATT	558
VEGFR-3	3273	UACACCUUGUCGAAGAUGCTT	109	GCAUCUUCGACAAGGUGUATT	559
VEGFR-3	1107	UACCACUGGAACUCGGGCGGG	110	CGCCCGAGUCCAGUGGUATT	560
VEGFR-3	336	UAGCAGACGUAGCUGCCUGTG	111	CAGGCAGCUACGUCUGCUATT	561
VEGFR-3	2607	UUGUGGAUGCCGAAAGCGGAG	112	CCGCUUUCGGCAUCCACAATT	562
VEGFR-3	1556	UCACAGUCUUAUUCUUCCT	113	GGAAAGAAUAAGACUGUGATT	563
VEGFR-3	108	UCCGUGAUGUUAAGGUCGGG	114	CGACCUUGAACAUCACGGATT	564
VEGFR-3	1954	AUAGUGGCCUCGUGCUCGGG	115	CGAGCACGAGGGCCACUAUTT	565
VEGFR-3	2100	AAGCACUGCAUCUCCAGCGAG	116	CGCUGGAGAUGCAGUGCUUTT	566
VEGFR-3	693	UCAUAGAGCUCGUUGCCUGTG	117	CAGGCAACGAGCUCUAUGATT	567
VEGFR-3	2337	AGGAUCACGAUCUCAUGCTG	118	GCAUGGAGAUCGUGAUCCUTT	568
VEGFR-3	2054	UCAAGUUCUGCGUGAGCCGAG	119	CGGCUCACGCAGAACUUGATT	569
VEGFR-3	860	UCUGUUGGGAGCGUCGCUCGG	120	GAGCGACGCUCCCAACAGATT	570

10

20

30

【表 5】

VEGFR-3	2436	UAGCCCGUCUUGAUGUCUGCG	121	CAGACAUCAAGACGGGCUATT	571
VEGFR-3	3759	UUCAUCCUGGAGGAACACCGG	122	GUGGUUCCUCCAGGAUGAATT	572
VEGFR-3	288	AACACCUUGCAGUAGGGCCTG	123	GGCCCUACUGCAAGGUGUUTT	573
VEGFR-3	1485	UGCGUGGUCACCGCCUCCAG	124	GGAGGGCGGUGACCACGCATT	574
VEGFR-3	2502	UCGUAGGACAGGUAUUCGCAT	125	GCGAAUACCUGUCCUACGATT	575
VEGFR-3	925	AUACGAGCCCAGGUCGUGCTG	126	GCACGACCUGGGCUCGUAUTT	576
VEGFR-3	426	UUGUUGAUGAAUGGCUGCUCA	127	AGCAGCCAUUCAUCAACAATT	577
VEGFR-3	3189	UAGAUGUCCCGGGCAAGGCCA	128	GCCUUGCCCGGGACAUCUATT	578
VEGFR-3	2274	UUGACGCAGCCCUUGGGUCTG	129	GACCCAAGGGCUGCGUCAATT	579
VEGFR-3	2196	UUCUGGUUGGAGUCCGCCAAG	130	UGGCGGACUCCAACCAGAATT	580
VEGFR-3	2019	UGCACCGACAGGUACUUCUTG	131	AGAAGUACCUGUCGGUGCATT	581
VEGFR-3	360	AUGCGUGCCUUGAUGUACUTG	132	AGUACAUCAAGGCACGCAUTT	582
VEGFR-3	1755	UACUUGUAGCUGUCGGCUUGG	133	AAGCCGACAGCUACAAGUATT	583
VEGFR-3	3037	UUCCAUGGUCAGCGGGCUCAG	134	GAGCCCGCUGACCAUGGAATT	584
VEGFR-3	1018	UUUGAGCCACUCGACGCUGAT	135	CAGCGUCGAGUGGCUCAAATT	585
VEGFR-3	1684	UUCGAUGGUGAAGCCGUCGGG	136	CGACGGCUUCACCAUCGAATT	586
VEGFR-3	4373	UACCAAGGAAUAAUCGGCGGG	137	CGCCGAUUAUCCUUGGUATT	587
VEGFR-3	987	UCAUGCACAAUGACCUCGGTG	138	CCGAGGUCAUUGUGCAUGATT	588
VEGFR-3	3267	UUGUCGAAGAUGC UUACGGG	139	CUGAAAGCAUCUUCGACAATT	589
VEGFR-3	4387	UGUAUUACUCAUAUUACCAAG	140	UGGUAAUAUGAGUAAUACATT	590
VEGFR-3	3883	UUCUUGUCUAUGCCUGCUCTC	141	GAGCAGGCAUAGACAAGAATT	591
VEGFR-3	4376	UAUUACCAAGGAAUAAUCGGC	142	CGAUUAUCCUUGGUAAUATT	592
VEGFR-3	2140	UUUGUACCACACGAUGCUGGG	143	CAGCAUCGUGUGGUACAAATT	593
VEGFR-3	978	AUGACCUCCGUGCUCUCCCGA	144	GGGAGAGCACCGAGGUCAUTT	594
VEGFR-3	2427	UUGAUGUCUGCGUGGGCCGGC	145	CGGCCCACGCAGACAUCAATT	595
VEGFR-3	1109	UGUACCA CUGGAACUCGGGCG	146	CCCGAGUCCAGUGGUACATT	596
VEGFR-3	319	UGUGUCGUUGGCAUGUACCTC	147	GGUACAUGCCAACGACACATT	597
VEGFR-3	1843	AUGCACGUUCUUGCAGUCGAG	148	CGACUGCAAGAACGUGCAUTT	598
VEGFR-3	317	UGUCGUUGGCAUGUACCUCGT	149	GAGGUACAUGCCAACGACATT	599
VEGFR-3	700	CUGGAUGUCAUAGAGCUCGTT	150	CGAGCUCUAUGACAUCAGTT	600

10

20

30

【表 6】

Tie-2 (TEK)	1223	UAAGCUUACAAUCUGGCCCGT	151	GGGCCAGAUUGUAAGCUUATT	601
Tie-2 (TEK)	2350	UAUCUUCACAUCAACGUGCTG	152	GCACGUUGAUGUGAAGAUATT	602
Tie-2 (TEK)	706	UAUGUUCACGUUAUCUCCCTT	153	GGGAGAUAAACGUGAACAUATT	603
Tie-2 (TEK)	3561	UUUAAGGACACCAAUAUCUGG	154	AGAUUAUGGUGUCCUUAATT	604
Tie-2 (TEK)	2763	UGAAAUUUGAUGUCAUCCAG	155	GGAAUGACAUCAAAUUUATT	605
Tie-2 (TEK)	174	UUGUUUACAAGUUAGAGGCAA	156	GCCUCUAACUUGUAAACAATT	606
Tie-2 (TEK)	1183	UUCAUUGCAGUGCAGACCCTT	157	GGGUCUGCAGUGCAAUGAATT	607
Tie-2 (TEK)	805	UAGAAUAUCAGGUACUUCATG	158	UGAAGUACCUGAUUUCUATT	608
Tie-2 (TEK)	2601	UUCAAUUGCAAUAUGAUCAGA	159	UGAUCAUUUGCAAUUGAATT	609
Tie-2 (TEK)	2277	UAGCCAUCCAAUUGUCCAA	160	GGACAAUAUUGGAUGGCUATT	610
Tie-2 (TEK)	1366	UACUUCUAUAUGAUCUGGCAA	161	GCCAGAUCAUAUGAAGUATT	611
Tie-2 (TEK)	32	UUUGGUUACAGCAGGGCUGGG	162	CAGCCCUGCUGAUACCAAATT	612
Tie-2 (TEK)	4085	UGUACUAUCAGGGUCAUUGTT	163	CAAUGACCCUGAUAGUACATT	613
Tie-2 (TEK)	3881	UUCUGAUUUAGCCCAUUCTT	164	GAAUGGGCUGAAAUCAGAATT	614
Tie-2 (TEK)	646	UUGUUGACGCAUCUUC AUGGT	165	CAUGAAGAU GCGUCAACAATT	615
Tie-2 (TEK)	4021	AUAGCAUUAACAUAAGGTA	166	CCUUUAUGUUGAAUGCUAATT	616
Tie-2 (TEK)	209	UUUGUGACUUAUCCAUAGCAT	167	GCUAAUGGAAAGUCACAAATT	617
Tie-2 (TEK)	4223	UAAAUUGAAACGGGACUGGCTG	168	GCCAGUCCGUUUAUUUATT	618
Tie-2 (TEK)	3961	UACUAAUUGUACUCACGCCTT	169	GGCGUGAGUACAAUUGAATT	619
Tie-2 (TEK)	1771	UUGAAUAUGUUGCCAAAGCCTC	170	GGCUUGGCAACAUAUUC AATT	620
Tie-2 (TEK)	3909	UUAUUGCAUAUGAAACCACAA	171	GUGGUUUAUUGCAAUAATT	621
Tie-2 (TEK)	3606	UAAAGCGUGUAUUCACGUAG	172	ACGUGAAUACCACGCUUATT	622
Tie-2 (TEK)	477	AUUAAGGCUUCAAAGUCCCTT	173	GGGACUUUGAAGCCUUAATT	623
Tie-2 (TEK)	3421	UUCUGCACAAGUCAUCCGCA	174	CGGGAUGACUUGUGCAGAATT	624
Tie-2 (TEK)	2730	UAAAUUGUAGGAUCUGGGUTG	175	ACCCAGAUCCUACAAUUUATT	625
Tie-2 (TEK)	1800	UAGUUGAGUGUAACAAUCUCA	176	AGAUUGUACACUCAACUATT	626
Tie-2 (TEK)	3385	UAAGCUAACAUCUCCCAUAG	177	AUGGGAGAUUGUUAAGCUUATT	627
Tie-2 (TEK)	1692	UAAGGCUCAGAGCUGAUGUTG	178	ACAUCAGCUCUGAGCCUATT	628
Tie-2 (TEK)	1657	AUGUCCAGUGUCAAUCACGTT	179	CGUGAUUGACACUGGACAATT	629
Tie-2 (TEK)	3665	UUCUGUCCUAGGCCGCUUCTT	180	GAAGCGGCCUAGGACAGAATT	630

10

20

30

【表 7】

Tie-2 (TEK)	2091	UUAAGUAGCACCGAAGUCAAG	181	UGACUUCGGUGCUACUUAATT	631
Tie-2 (TEK)	2827	UAACCAUCCUUCUUGAUGCG	182	CAUCAAGAAGGAUGGGUUAATT	632
Tie-2 (TEK)	1979	UUGGUUGCCAGGUCAAAUUTA	183	AAUUUGACCUGGCAACCAATT	633
Tie-2 (TEK)	67	UAGAUUAGGAUGGGAAAGGCT	184	CCUUUCCAUCCUAAUCUATT	634
Tie-2 (TEK)	3459	UUCUCCAGUCUGUAGCCUGG	185	AGGGCUACAGACUGGAGAATT	635
Tie-2 (TEK)	2764	UUGAAAUUGAUGUCAUCCA	186	GAAUGACAUCAAAUUCAATT	636
Tie-2 (TEK)	3560	UUAAGGACACCAUAUCUGGG	187	CAGAUUUUGGUGUCCUUAATT	637
Tie-2 (TEK)	715	UUUGAAAGAUAGUUCACGTT	188	CGUGAACAUUCUUUCAATT	638
Tie-2 (TEK)	1368	UUUACUUCUAUAUGAUCUGGC	189	CAGAUCAUAAGAAGUAAATT	639
Tie-2 (TEK)	2351	UUAUCUUCACAUCAACGUGCT	190	CACGUUGAUGUGAAGAUAAATT	640
Tie-2 (TEK)	205	UGACUUCCAUAUAGCAUCGTC	191	CGAUGCUAUGGAAAGUCATT	641
Tie-2 (TEK)	3957	AAUUGUACUCACGCCUUCCTA	192	GGAAGGCGUGAGUACAAUUTT	642
Tie-2 (TEK)	3962	AUACUAAUUGUACUCACGCT	193	GCGUGAGUACAAUUAUUAUTT	643
Tie-2 (TEK)	2352	UUUACUUCACAUCAACGUGC	194	ACGUUGAUGUGAAGAUAAATT	644
Tie-2 (TEK)	3963	UAUACUAAUUGUACUCACGCC	195	CGUGAGUACAAUUAUUAUTT	645
Tie-2 (TEK)	1777	UGUCACUUGAAUAUGUUGCCA	196	GCAACAUUAUCAAGUGACATT	646
Tie-2 (TEK)	3388	UCCUAAGCUAACAUCUCCCA	197	GGAGAUUGUAGCUUAGGATT	647
Tie-2 (TEK)	636	AUCUUC AUGGUUCGUUCCTG	198	GGAUACGAACCAUGAAGUATT	648
Tie-2 (TEK)	74	UCCUUUGUAGAUUAGGAUGGG	199	CAUCCUAAUCUCAAAGGATT	649
Tie-2 (TEK)	707	AUAUGUUCACGUUAUCUCCT	200	GGAGAUAAACGUGAACAUUATT	650
bFGFR	3814	UAAAUUCUCUGGUAACGACCT	201	GGUCGUUACCAGAGAUUUATT	651
bFGFR	1478	UUAACAUGAACUCCACGUTG	202	ACGUGGAGUUC AUGUGUAATT	652
bFGFR	3773	UAUACUCAGAUUAUCAACTT	203	GUUGAUAAAUUCUGAGUAUATT	653
bFGFR	715	UAGCGGUGCAGAGUGUGGCTG	204	GCCACACUCUGCACCUCUATT	654
bFGFR	575	UUCAAACUGACCCUCGUCGG	205	GAGCGAGGUCAGUUUGAATT	655
bFGFR	646	UUCUGCAGUAGAGGUUGGTG	206	CCAACCUCUAAUCGAGAATT	656
bFGFR	3625	AUCGGAAUUAUAAGCCACTG	207	GUGGCUUAUAAUUCGUAUTT	657
bFGFR	2318	UACAAGGGACCAUCCUGCGTG	208	CGCAGGAUGGUCCCUUGUATT	658
bFGFR	1439	UUGUUGGCGGGCAACCUGCT	209	CAGGGUUGCCCGCCAACAATT	659
bFGFR	3860	AUAGCAACUGAUGCCUCCAG	210	GGGAGGCAUCAGUUGCUAUTT	660

10

20

30

【表 8】

bFGFR	3163	UGAGGGUACAGCUGACGGTG	211	CCGUCAGCUGUAACCCUCATT	661
bFGFR	2600	UCGAUGUGGUGAAUGUCCCGT	212	GGGACAUUCACCACAUCGATT	662
bFGFR	2513	UCUCGGUGUAUGCACUUCUTG	213	AGAAGUGCAUACACCGAGATT	663
bFGFR	2214	UUUCUCUGUUGCGUCCGACTT	214	GUCGGACGCAACAGAGAAATT	664
bFGFR	1346	UUCUCCACAAUGCAGGUGUAG	215	ACACCUGCAUUGUGGAGAATT	665
bFGFR	1556	UUGUCUGGGCCAAUCUUGCTC	216	GCAAGAUUGGCCAGACAATT	666
bFGFR	2671	UCCGGUCAAUAAUGCCUCGG	217	GAGGCAUUAUUUGACCGGATT	667
bFGFR	3105	UUUGAGUCCGCCAUUGGCAAG	218	UGCCAAUGGCGGACUCAAAATT	668
bFGFR	2091	UUUGCCUAAAGACCAGUCUGTC	219	CAGACUGGUCUUAAGGCAAATT	669
bFGFR	1590	UCCAGCAGUCUUAAGAUCTG	220	GAUCUUGAAGACUGCUGGATT	670
bFGFR	1689	UCCGAUAGAGUUACCGCCAA	221	GGCGGGUAAACUCUAUCGGATT	671
bFGFR	1319	UUGUCAGAGGGCACCACAGAG	222	CUGUGGUGCCCUCUGACAATT	672
bFGFR	2342	UUGGAGGCAUACUCCACGATG	223	UCGUGGAGUAUGCCUCCAATT	673
bFGFR	107	UCUCGGUCCCGACCGACGTG	224	CGUCCGGUCGGGACCGAGATT	674
bFGFR	3662	UCUGGUACCAGGCAUUGGTC	225	CCAAAUGCCUGGUACCAGATT	675
bFGFR	2150	UUGUCCAGCCCGAUAGCCUCT	226	AGGCUAUCGGGCUGGACAATT	676
bFGFR	1517	UUUAGCCACUGGAUGUGCGGC	227	CGCACAUCCAGUGGCUAAATT	677
bFGFR	1264	UGUAGCCUCCAAUUCUGUGGT	228	CACAGAAUUGGAGGCUACATT	678
bFGFR	3576	UUCAAUCGUGGCUCGAAGCAC	229	GCUUCGAGCCACGAUUGAATT	679
bFGFR	613	AUCUCCAUGGAUACUCCACAG	230	GUGGAGUAUCCAUGGAGAUTT	680
bFGFR	1221	UUUCAACCAGCGCAGUGUGGG	231	CACACUGCGCUGGUUGAAATT	681
bFGFR	3004	UAGAGCUCCGGGUGUCGGGAA	232	CCCGACACCCGAGCUCUATT	682
bFGFR	3825	UUACCGAUGGGUAAAUCUCTG	233	GAGAUUUACCAUCGGUAATT	683
bFGFR	3813	AAAUCUCUGGUAAACGACCCTT	234	GGGUCGUUACCAGAGAUUUTT	684
bFGFR	3861	UAUAGCAACUGAUGCCUCCCA	235	GGAGGCAUCAGUUGCUAUATT	685
bFGFR	576	UUUCAACUGACCCUCGCUCG	236	AGCGAGGGUCAUUUGAAATT	686
bFGFR	3772	AUACUCAGAUUUUAUCAACUTT	237	AGUUGAUAAAUCUGAGUAUTT	687
bFGFR	3824	UACCGAUGGGUAAAUCUCUGG	238	AGAGAUUUACCAUCGGUAATT	688
bFGFR	2319	AUACAAGGGACCAUCCUGCGT	239	GCAGGAUGGUCCUUGUAUTT	689
bFGFR	3771	UACUCAGAUUUUAUCAACUUTG	240	AAGUUGAUAAAUCUGAGUAATT	690

10

20

30

【表 9】

bFGFR	2511	UCGGUGUAUGCACUUCUUGGA	241	CAAGAAGUGCAUACACCGATT	691
bFGFR	2333	UACUCCACGAUGACAUACAAG	242	UGUAUGUCAUCGUGGAGUATT	692
bFGFR	3624	UCGGAAUAAUAAAGCCACUGG	243	AGUGGCUUAUAAUCCGATT	693
bFGFR	1304	ACAGAGUCCAUUAUGAUGCTC	244	GCAUCAUAAUGGACUCUGUTT	694
bFGFR	1608	UUUGUCGGUGGUAAUACUCC	245	AGUUAUACCAACGACAAATT	695
bFGFR	1301	GAGUCCAUUAUGAUGCUCAG	246	GGAGCAUCAUAAUGGACUCTT	696
bFGFR	3626	UAUCGGAUAAUAAAGCCACT	247	UGGCUUAUAAUCCGAUATT	697
bFGFR	2672	AUCCGGUCAAUAAUGCCUCG	248	AGGCAUAAUUUGACCGGAUTT	698
bFGFR	2213	UUCUCUGUUGCGUCCGACUTC	249	AGUCGACGCAACAGAGAATT	699
bFGFR	2597	AUGUGGUGAAUGUCCGUGCG	250	CACGGGACAUUACCACAUTT	700
IL8RA	1971	UUUAUUAGGAACAUCUGCCTG	251	GGCAGAUUCCUAAUAAATT	701
IL8RA	75	UUGAUCUAAACUGAAGCACCGG	252	GGUGCUUCAGUAGAUAUATT	702
IL8RA	645	AUUGUUUGGAUGGUAAGCCTG	253	GGCUUACCAUCCAAACAATT	703
IL8RA	1431	UAAUUAGCCAGUUAGUGGGTT	254	CCCACUAAUCUGGCUAUUAATT	704
IL8RA	1378	UUCGUUCCAUGGAGGUGCAA	255	GCACCUCCAUGGAAACGAATT	705
IL8RA	1470	UCAUCUAAUGUCAGAUUCGGG	256	CGAAUCUGACAUUAGAUGATT	706
IL8RA	218	UACUUGUUGAGUGUCUAGTT	257	CUGAGACACUCAACAAGUATT	707
IL8RA	1101	AUGACGUGCCAAGAACUCCTT	258	GGAGUUCUUGGCACGUCAUTT	708
IL8RA	677	UUUCCCAGGACCUCAUAGCAA	259	GCUAUGAGGUCCUGGGAAATT	709
IL8RA	1178	AAGAGAUUUCCUUAUCGAT	260	CGAUGAAGGAAUUCUCUUTT	710
IL8RA	1543	UUGAGGAGAUGCUCUGUGAG	261	CACAGGAGCAUCUCCUAATT	711
IL8RA	1783	UCUUGUGGCAUAGAUUGGCT	262	CCAGAUCAUAGCCACAAGATT	712
IL8RA	1249	AUAGUGCCUGUCCAGAGCCAG	263	GGCUCUGGACAGGCACUAUTT	713
IL8RA	1520	UCAACGAGAGCAUCCAGCCCT	264	GGCUGGAUGCUUCGUUGATT	714
IL8RA	1068	AUGCAUAGCCAGGAUCUUGAG	265	CAAGAUCCUGGCUAUGCAUTT	715
IL8RA	1347	UUGGAGGUACCUCACAGCTC	266	GCUGUUGAGGUACCUCAATT	716
IL8RA	1208	UCAGGGUGUUGGUUAUUCUTT	267	AGAAUAACCAACACCCUGATT	717
IL8RA	117	AUCUGUAAUUAUUGACAUGC	268	CAUGUCAAUUAUACAGAUTT	718
IL8RA	1862	UGCUGUCUCGUUCCACUUGG	269	AAGUGGAACGAGACAAGCATT	719
IL8RA	1153	UUCAGAGGUUGGAAGAGACAT	270	GUCUCUCCAACCUUGAATT	720

10

20

30

【表 10】

IL8RA	640	UUGGAUGGUAAGCCUGGCGGA	271	CGCCAGGCUUACCAUCCAATT	721
IL8RA	1411	UAAAGAUGUGACGUUCAACGG	272	GUUGAACGUACAUCUUUATT	722
IL8RA	71	UCUAACUGAAGCACC GGCCAG	273	GGCCGGUGCUUCAGUUAGATT	723
IL8RA	1397	UCAACGGGAAUGAUGGUGCTT	274	GCACCAUCAUCCCGUUGATT	724
IL8RA	644	UUGUUUGGAUGGUAAGCCUGG	275	AGGCUUACCAUCCAAACAATT	725
IL8RA	641	UUUGGAUGGUAAGCCUGGCGG	276	GCCAGGCUUACCAUCCAAATT	726
IL8RA	76	UUUGAUCUAACUGAAGCACC	277	GUGCUUCAGUUAGAUCAAATT	727
IL8RA	1398	UUCAACGGGAAUGAUGGUGCT	278	CACCAUCAUCCCGUUGAATT	728
IL8RA	1381	UGCUCGUUUCCAUGGAGGTG	279	CCUCCAUGGAAACGAAGCATT	729
IL8RA	1769	UCUGGCUUCCAAACCCUCUTT	280	AGAGGGUUUGGAAGCCAGATT	730
IL8RA	1435	AUGCUAUUAGCCAGUUAGTG	281	CUAACUGGCUAAUUAGCAUTT	731
IL8RA	1175	AGAUUUUCCUUCAGUUGGT	282	CAUCGAUGAAGGAAUAUCUTT	732
IL8RA	1970	UUUUUAGGAACAUCUGCCUGC	283	AGGCAGAUUUCCUAAUAATT	733
IL8RA	1432	CUAAUUAGCCAGUUAGUGGGT	284	CCACUACUGGCUAAUUAGTT	734
IL8RA	74	UGAUCUAACUGAAGCACC GGC	285	CGGUGCUUCAGUUAGAUCATT	735
IL8RA	646	AAUUGUUUGGAUGGUAAGCCT	286	GCUUACCAUCCAAACAAUUTT	736
IL8RA	639	UGGAUGGUAAGCCUGGCGGAA	287	CCGCCAGGCUUACCAUCCATT	737
IL8RA	1082	UUGCUGACCAGGCCAUGCATA	288	UGCAUGGCCUGGUCAGCAATT	738
IL8RA	1770	AUCUGGCUUCCAAACCCUCTT	289	GAGGGUUUGGAAGCCAGAUUTT	739
IL8RA	81	AAUGGUUUGAUCUAA CUGAAG	290	UCAGUUAGAUCAAACCAUUTT	740
IL8RA	1372	UCCAUGGAGGUGCAAAGGCCG	291	GCCUUUGCACCUCCAUGGATT	741
IL8RA	1388	AUGAUGGUGCUUCGUUCCAT	292	GGAAACGAAGCACCAUCAUTT	742
IL8RA	643	UGUUUGGAUGGUAAGCCUGGC	293	CAGGCUUACCAUCCAAACATT	743
IL8RA	1784	UUCUUGUGGCAUAGAUUGGC	294	CAGAUCAUGCCACAAGAATT	744
IL8RA	1524	AGGGUACAAGAGAGCAUCCAG	295	GGAUGCUCUCGUUGACCCUTT	745
IL8RA	237	AUAGGCGAUGAUCACAACATA	296	UGUUGUGAUCUAGCCUAUTT	746
IL8RA	219	AUACUUGUUGAGUGUCUCAGT	297	UGAGACACUCAACAAGUAUTT	747
IL8RA	1389	AAUGAUGGUGCUUCGUUCCA	298	GAAACGAAGCACCAUCAUUTT	748
IL8RA	1972	CUUUUUUAGGAACAUCUGCCT	299	GCAGAUUUCCUAAUAAAATT	749
IL8RA	1115	UAGGAGGUAACACGAUGACGT	300	GUCAUCGUGUUACCUCCUATT	750

10

20

30

【表 1 1】

IL8RB	2648	UUAAGUGUCAUUUAGUGGCA	301	CCACUAAAUGACACUUAATT	751
IL8RB	2184	UUUCUUGUGGGUCAAUUCCTA	302	GGAAUUGACCCACAAGAAATT	752
IL8RB	2250	UUGGGUCUUGUGAAUAAGCTG	303	GCUUAUUCACAAGACCCAATT	753
IL8RB	1746	UUCACUUCUUAGAACAUAAGAG	304	CUAUGUUCUAAAGAGUGAATT	754
IL8RB	960	UUGGAUGAGUAGACGGUCCTT	305	GGACCGUCUACUCAUCCAATT	755
IL8RB	454	AUUACUAAGAUCUUCACCUTT	306	AGGUGAAGAUCUAGUAAUTT	756
IL8RB	2750	UUGGUUUAAUCAGCCUUGGTG	307	CCAAGGCUGAUUAAACCAATT	757
IL8RB	2604	AUCACUACUGUUUAUCUGCAG	308	GCAGUAAACAGUAGUGAUTT	758
IL8RB	1026	AUCCGUAAACAGCAUCCGCCAG	309	GGCGGAUGCUGUUACGGAUTT	759
IL8RB	1384	AUGUAUAGCUAGAAUCUUGAG	310	CAAGAUUCUAGCUAUACAUTT	760
IL8RB	1149	AAGAUGACCCGCAUGGCCCGG	311	GGGCCAUGCGGGUCAUCUUTT	761
IL8RB	2464	UCUCAGUACCUCUAGUAGGTG	312	CCUACAUGAGGUACUGAGATT	762
IL8RB	877	UUUGACCAAGUAGCGCUUCTG	313	GAAGCGCUACUUGGUCAAATT	763
IL8RB	2324	UUCGUUAGGUACAUAUCACAT	314	GUGAUUUGUACCUAACGAATT	764
IL8RB	2360	AUGAGUACUUAUCCUCUTT	315	AGAGGAAUGAAGUACUCAUTT	765
IL8RB	265	UUGGGUGGUAGUCAGAGCUGT	316	AGCUCUGACUACCACCCAATT	766
IL8RB	1642	UUUCUAAACCAUGCAAGGGAA	317	CCCUGCAUGGUUUAGAAATT	767
IL8RB	2146	UCAUGUGUUAUUCUAUGUCT	318	ACAUAGAAUUAACACAUGATT	768
IL8RB	2627	UUAAGUCACAUUGCGGUACAA	319	GUACCGCAAUGUGACUUAATT	769
IL8RB	1000	UGUAUUGUUGCCCAUGUCCTC	320	GGACAUGGGCAACAAUACATT	770
IL8RB	315	UGACCUGCUGUUAUUGGAGTG	321	CUCCAAUACAGCAGGUCATT	771
IL8RB	2774	AAAUUAAGGCAGGUGGUUCTA	322	GAACCACCUGCCUAUUAUUTT	772
IL8RB	219	ACCUUGACGAUGAAACUUCTG	323	GAAGUUUCAUCGUCAAGGUTT	773
IL8RB	2389	UUUCAAGGUUCGUCCGUGUTG	324	ACACGGACGAACCUUGAAATT	774
IL8RB	385	UGAGGUAAACUAAAAUCCUGA	325	AGGAUUUAAGUUUACCUCATT	775
IL8RB	1347	UUCUGGCCAAUGAAGGCGUAG	326	ACGCCUUCAUUGGCCAGAATT	776
IL8RB	2649	UUUAAGUGUCAUUUAGUGGC	327	CACUAAAUGACACUUAATT	777
IL8RB	1737	UAGAACAUAAGAGUGCCAUGGG	328	CAUGGCACUCUAUGUUCUATT	778
IL8RB	455	AAUUACUAAGAUCUUCACCTT	329	GGUGAAGAUCUAGUAAUUTT	779
IL8RB	965	UAACAUGGAUGAGUAGACGG	330	GUCUACUCAUCCAAUGUUATT	780

10

20

30

【表 1 2】

IL8RB	1740	UCUUAGAACAUAAGAGUGCCAT	331	GGCACUCUAUGUUCUAAGATT	781
IL8RB	2632	UGGCAUUAAGUCACAUUGCGG	332	GCAAUGUGACUUAUUGCCATT	782
IL8RB	2755	UAGCCUUGGUUUAUACGCCT	333	GCUGAUUAAACCAAGGCUATT	783
IL8RB	2183	UUCUUGUGGGUCAAUUCCUAT	334	AGGAAUUGACCCACAAGAATT	784
IL8RB	2605	UAUCACUACUGUUUAUCUGCA	335	CAGAUAAACAGUAGUGAUATT	785
IL8RB	2340	UCAGGCUGAAGGAUACUUCGT	336	GAAGUAUCCUUCAGCCUGATT	786
IL8RB	2143	UGUGUUAUUCUAUGUCUGAA	337	CAGACAUAGAAUUAACACATT	787
IL8RB	998	UAUUGUUGCCCAUGUCCUCAT	338	GAGGACAUUGGGCAACAUATT	788
IL8RB	2180	UUGUGGGUCAAUUCCUAUAAG	339	UAUAGGAAUUGACCCACAATT	789
IL8RB	2185	AUUUCUUGUGGGUCAAUUCCT	340	GAAUUGACCCCAAGAAAUTT	790
IL8RB	307	UGUUAUUGGAGUGGCCACCGA	341	GGUGGCCACUCCAUAACATT	791
IL8RB	2481	UCUGUAAAUUUGUUCACUCTC	342	GAGUGAACAAAUUACAGATT	792
IL8RB	2617	UUGCGGUACAACUAUCACUAC	343	AGUGAUAGUUGUACCGCAATT	793
IL8RB	956	AUGAGUAGACGGUCCUUCGGA	344	CGAAGGACCGUCUACUCAUTT	794
IL8RB	456	UAAUUAUAAGAUCUUCACCT	345	GUGAAGAUUUAGUAAUUATT	795
IL8RB	226	UGAAACAACCUUGACGAUGAA	346	CAUCGUCAAGGUUGUUUCATT	796
IL8RB	1394	UGAUCAAGCCAUGUAUAGCTA	347	GCUAUACAUGGCUUGAUCATT	797
IL8RB	458	UGUAAUUAUAAGAUCUUCAC	348	GAAGAUUUAGUAAUUACATT	798
IL8RB	881	UGAAUUUGACCAAGUAGCGCT	349	CGCUACUUGGUCAAUUCATT	799
IL8RB	2327	UACUUCGUUAGGUACAUUCA	350	AUAUGUACCUAACGAAGUATT	800
Fas	109	UGUAGUAACAGUCUCCUCAA	351	GAGGAAGACUGUACUACATT	801
Fas	41	UGGACGAUAAUCUAGCAACAG	352	GUUGCUGAUUAUCGUCCATT	802
Fas	161	UAUGGCAGAAUUGGCCAUCAT	353	GAUGGCCAAUUCUGCCAUATT	803
Fas	182	UUUCACCUGGAGGACAGGGCT	354	CCCUGUCCUCCAGGUGAAATT	804
Fas	62	UCACUUGGGCAUUAACACUTT	355	AGUGUUAUUGCCCAAGUGATT	805
Fas	377	ACUUCCUCUUUGCACUUGGTG	356	CCAAGUGCAAAAGGAAGUTT	806
Fas	349	UGAGUGUGCAUUCUUGAUGA	357	AUCAAGGAAUGCACACUCATT	807
Fas	245	UCCCUUCUUGGCAGGGCACGC	358	GUGCCUGCCAAGAAGGGATT	808
Fas	205	GACUGUGCAGUCCCUAGCUTT	359	AGCUAGGGACUGCACAGUCTT	809
Fas	145	AUCAUGAGCAGGCCUCCAA	360	GGAAGGCCUGCAUCAUGAUTT	810

10

20

30

【表 1 3】

Fas	123	UUCUGAGUCUACUGUAGTA	361	CUACAGUUGAGACUCAGAATT	811
Fas	34	UAAUCUAGCAACAGACGUAAG	362	UACGUCUGUUGCUAGAUUATT	812
Fas	114	UCAACUGUAGUAAACAGUCUTC	363	AGACUGUUACUACAGUUGATT	813
Fas	115	CUCAACUGUAGUAAACAGUCTT	364	GACUGUUACUACAGUUGAGTT	814
Fas	28	AGCAACAGACGUAAAGAACCAG	365	GGUUCUUACGUCUGUUGCUTT	815
Fas	122	UCUGAGUCUACUGUAGUAA	366	ACUACAGUUGAGACUCAGATT	816
Fas	186	UUCUUUACACUGGAGGACAG	367	GUCCUCCAGGUGAAAGGAATT	817
Fas	42	UUGGACGAUAAUCUAGCAACA	368	UUGCUGAUUAUCGUCCAATT	818
Fas	111	ACUGUAGUAAACAGUCUUCCTC	369	GGAAGACUGUUACUACAGUTT	819
Fas	144	UCAUGAUGCAGGCCUCCAAG	370	UGGAAGGCCUGCAUCAUGATT	820
Fas	92	UCAAUCCAAUCCCUUGGAGT	371	UCCAAGGGAUUGGAAUUGATT	821
Fas	201	GUGCAGUCCUAGCUUUCCTT	372	GGAAAGCUAGGGACUGCACTT	822
Fas	128	CCAAGUUCUGAGUCUAACTG	373	GUUGAGACUCAGAACUUGGTT	823
Fas	36	GAUAAUCUAGCAACAGACGTA	374	CGUCUGUUGCUAGAUUAUCTT	824
Fas	162	UUAUGGCAGAAUUGGCCAUCA	375	AUGGCCAAUUCUGCCAUAATT	825
Fas	127	CAAGUUCUGAGUCUACUGT	376	AGUUGAGACUCAGAACUUGTT	826
Fas	202	UGUGCAGUCCUAGCUUUCCT	377	GAAAGCUAGGGACUGCACATT	827
Fas	82	UCCCUUGGAGUUGAUGUCAGT	378	UGACAUCAACUCCAAGGGATT	828
Fas	160	AUGGCAGAAUUGGCCAUCATG	379	UGAUGGCCAAUUCUGCCAUTT	829
Fas	150	UGGCCAUCAUGAUGCAGGCCT	380	GCCUGCAUCAUGAUGGCCATT	830
Fas	63	GUCACUUGGGCAUUAACACTT	381	GUGUUAUGCCCAAGUGACTT	831
Fas	164	GCUUAUGGCAGAAUUGGCCAT	382	GGCCAAUUCUGCCAUAAGCTT	832
Fas	37	CGAUAAUCUAGCAACAGACGT	383	GUCUGUUGCUAGAUUAUCGTT	833
Fas	116	UCUCAACUGUAGUAAACAGUCT	384	ACUGUUACUACAGUUGAGATT	834
Fas	32	AUCUAGCAACAGACGUAAGAA	385	CUUACGUCUGUUGCUAGAUTT	835
Fas	64	AGUCACUUGGGCAUUAACACT	386	UGUUAUGCCCAAGUGACUTT	836
Fas	167	AGGGCUUAUGGCAGAAUUGGC	387	CAAUUCUGCCAUAAGCCCTT	837
Fas	120	UGAGUCUACUGUAGUAAACA	388	UUACUACAGUUGAGACUCATT	838
Fas	125	AGUUCUGAGUCUACUGUAG	389	ACAGUUGAGACUCAGAACUTT	839
Fas	43	UUUGGACGAUAUCUAGCAAC	390	UGCUGAUUAUCGUCCAATT	840

10

20

30

【表 1 4】

Fas	94	CCUCAAUCCAAUCCCUUGGA	391	CAAGGGAUUGGAAUUGAGGTT	841
Fas	159	UGGCAGAAUUGGCCAUCAUGA	392	AUGAUGGCCAAUUCUGCCATT	842
Fas	110	CUGUAGUAAACAGUCUCCUCA	393	AGGAAGACUGUUACUACAGTT	843
Fas	31	UCUAGCAACAGACGUAAGAAC	394	UCUUACGUCUGUUGCUAGATT	844
Fas	38	ACGAUAAUCUAGCAACAGACG	395	UCUGUUGCUAGAUUAUCGUTT	845
Fas	118	AGUCUCAAUCUGUAGUAACAGT	396	UGUUAACUACAGUUGAGACUTT	846
Fas	169	ACAGGGCUUAUGGCAGAAUTG	397	AUUCUGCCAUAAAGCCUGUTT	847
Fas	33	AAUCUAGCAACAGACGUAAGA	398	UUACGUCUGUUGCUAGAUUTT	848
Fas	163	CUUAUGGCAGAAUUGGCCATC	399	UGGCCAAUUCUGCCAUAAAGTT	849
Fas	233	AGGGCACGCAGUCUGGUUCAT	400	GAACCAGACUGCGUGCCCTT	850
IGF2R	6340	UUUGUACCUAUGACACCCAG	401	GGGUGUCAUAGGUGACAAATT	851
IGF2R	2936	UUAUAGAGCAAGCCUGGUCTG	402	GACCAGGCUUGCUCUAUAATT	852
IGF2R	1331	UCUGAUUGUGGUAUCUUCCTG	403	GGAAGAUACCAAAUCAGATT	853
IGF2R	4491	UAUUUCAGGACAAUAUGCCA	404	GCAUAAUUGUCUGAAAUATT	854
IGF2R	2562	UUAAUGUAGUAUUCCUCCAC	405	GGAGGAAUACUACAUUAATT	855
IGF2R	1456	UUUCCCAUCGUUACCUGCGGT	406	CGCAGGUAACGAUGGGAAATT	856
IGF2R	2253	UAGUUCAGUUGGAUCAUCCA	407	GGAUGAUCCAACUGAACUATT	857
IGF2R	3570	UUGCCUUCUGACACUAAGCAA	408	GCUUAGUGUCAAGAGCAATT	858
IGF2R	2274	UUAUAGGGUGUGCCGCCUCTG	409	GAGGCGGCACACCCUAUAATT	859
IGF2R	1197	UUUCCAUCUGAAAUAUAGGAT	410	CCUAUAAUUCAGAUGGAAATT	860
IGF2R	897	UUGCGCACAGCUUCAGUCCG	411	GACUGAAGCUGGUGCGCAATT	861
IGF2R	5205	UUGAUGUAGAAUACAGGGUTG	412	ACCCUGAUUUCUACAUCAATT	862
IGF2R	8904	UUCUCAGCAAUAGAACACCAG	413	GGUGUUCUAUUGCUGAGAATT	863
IGF2R	8604	UAAGGCUUCUUAAGGUCGAA	414	CGACCUAUAAGAAGCCUATT	864
IGF2R	3629	UCAAGAUAUCCAUUCGCCGCGG	415	GCGGCAGAAUGGAUCUUUGATT	865
IGF2R	4344	UUGAUGAGGUAGUGUCCGGG	416	CGGAGCACUACCUCAUCAATT	866
IGF2R	1419	UUUAUGACGCUAUCGCGUGA	417	AGCGGAUGAGCGUCAUAAATT	867
IGF2R	7185	UAUUUGUAGGACACGUUGGAA	418	CCAACGUGUCCUACAAUATT	868
IGF2R	4447	UACCCUGCCGAGGUUCACGGG	419	CGUGAACCUCCGAGGGUATT	869
IGF2R	3706	UAUCUGAGCACACUAAACGT	420	GUUUGAGUGUGCUCAGAUATT	870

10

20

30

【表 1 5】

IGF2R	6422	UCUUUGUACAGGUCAAUUCTA	421	GAAUUGACCUGUACAAAGATT	871
IGF2R	1306	UUUGACUUGAGAGGUUUCGCT	422	CGAUACCUCUCAAGUCAAAATT	872
IGF2R	6129	UUGUGUUUCUGGACGAAUUTG	423	AAUUCGUCCAGAAACACAATT	873
IGF2R	5105	UAGAGCUUCCAUCCUCACGG	424	GUGAGGAAUGGAAGCUCUATT	874
IGF2R	4572	UUCACUUGGCUCUCGCUGCAG	425	GCAGCGAGAGCCAAGUGAATT	875
IGF2R	5308	UACCCGGCCGAUAUCUAUGGG	426	CAUAGAUUUCGCCGGGUATT	876
IGF2R	3153	UUCUCAAUUCCGACUGGCCTT	427	GGCCAGUCGGAAUUGAGAATT	877
IGF2R	9029	UAUUACAGUAAAAGUUGAUUGA	428	AAUCAACUUUACUGUAAUATT	878
IGF2R	1530	UUAACACAGGCGUAUUCCTG	429	CGGAAUACGCCUGUGUAAATT	879
IGF2R	8364	AAAUGUGCUCUGUACGCCAG	430	GGGCGUACAGAGCACAUUUTT	880
IGF2R	5400	UAGUUGAAAUGCUUGCCGCT	431	CGGACAAGCAUUUCAACUATT	881
IGF2R	6702	UUGGCUCACAGACACGCCGG	432	CGGCGUGCUCUGGAGCCAATT	882
IGF2R	8479	UUCUCUGACACCUCAACUCCA	433	GAGUUGAGGUGUCAGAGAATT	883
IGF2R	4723	UAAGGAGCUCAGAUCAAACAG	434	GUUUGAUCUGAGCUCCUATT	884
IGF2R	4237	UGAACAUUCAGUCAGAUCGAA	435	CGAUCUGACUGAAUGUUCATT	885
IGF2R	6203	UAUAGUACGAGACUCCGUUGT	436	AACGGAGUCUCGUACUUAATT	886
IGF2R	753	AUGAAUAGAGAAGUGUCCGGA	437	CGGACACUUCUCUAUUAUUTT	887
IGF2R	8554	AUAAGCACAGUAAAGGUGGTA	438	CCACCUUUACUGUGCUUAUTT	888
IGF2R	5462	UUAACAGCUUAGGCGUCCCA	439	GGAACGCCUAAAGCUGUAAATT	889
IGF2R	1460	UUCUUUCCCAUCGUUACCTG	440	GGUAAACGAUGGAAAGGAATT	890
IGF2R	5206	AUUGAUGUAGAAAUCAGGGTT	441	CCCUGAUUUCUACAUCUAAUTT	891
IGF2R	2559	AUGUAGUAUUUCCUCCACGTG	442	CGUGGAGGAAAUACUACAUTT	892
IGF2R	8605	UUAAGGCUUCUUAUAGGUCGA	443	GACCUAUAAGAAGCCUUAATT	893
IGF2R	4345	AUUGAUGAGGUAGUGCUCCGG	444	GGAGCACUACCUCUACUAAUTT	894
IGF2R	1187	AAAUUAAGGAUGAACCUCCGC	445	GGAGGUUCAUCCUUAUUUUTT	895
IGF2R	1184	UAUAGGAUGAACCUCCGCUCT	446	AGCGGAGGUUCAUCCUUAUATT	896
IGF2R	7190	UUGAGUAUUUGUAGGACACGT	447	GUGUCCUACAAUACUCAATT	897
IGF2R	7182	UUGUAGGACACGUUGGAATT	448	GUUCCAACGUGUCCUACAATT	898
IGF2R	2941	AUCCCUUAUAGAGCAAGCCTG	449	GGCUUGCUCUAUAAGGGAUTT	899
IGF2R	3693	UCAAACGUGAUCCUGGUGGAG	450	CCACCAGGAUCACGUUGATT	900

10

20

30

40

【0043】

RNA鎖ヌクレオチドの化学的修飾

本発明による s i RNA は少なくとも 1 本の RNA 鎖に少なくとも 1 個の修飾されたヌクレオチドを含み得る。様々な可能性のある修飾されたヌクレオチドを本明細書の別の部分で開示する。本発明による使用のための有用な修飾および修飾の組み合わせを表 2 に示す：

【0044】

表 2：化学的修飾および配列構造

0

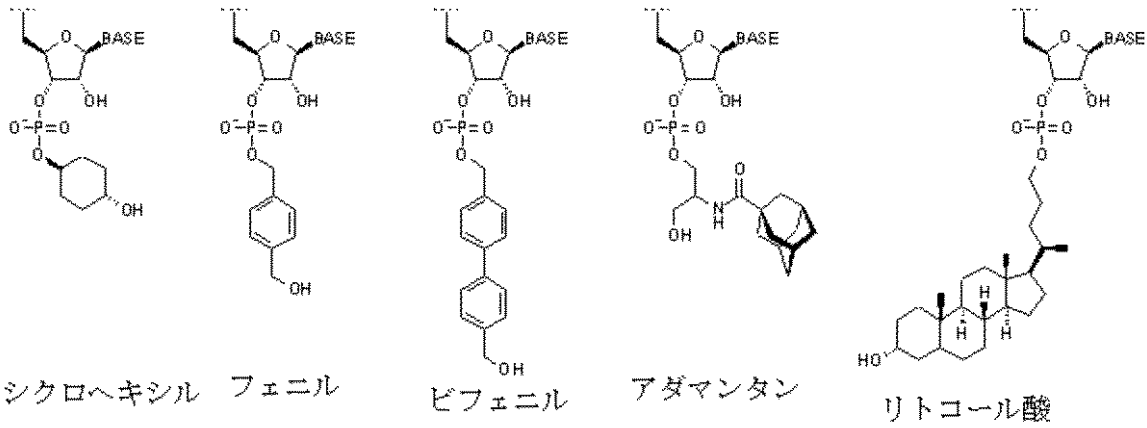
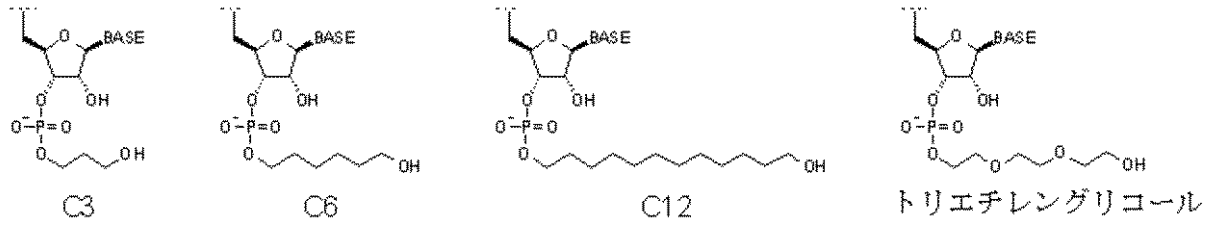
20

30

siRNA鎖の3'末端の3'位置に付加された以下の修飾は時に「3'末端キャップ」と称され、本発明の有用な実施態様としても認識され、そして本発明によるいずれかのsiRNAと共に使用され得る：

【 0 0 4 6 】

【化 3】



10

20

【 0 0 4 7 】

本発明による活性を有する具体的な化合物には以下の表 3 に示されるものが含まれる：

表 3：実施例で使用される s i R N A の配列および化学

【表 17】

名	鎖	配列 (N: RNA; dN: DNA; n: 2'-moe RNA; s: ホスホロチオエート)	配列番号
pGL3-siRNA	ガイド鎖	UCG AAG UAC UCA GCG UAA GdTdT	901
	相補鎖	CUU ACG CUG AGU ACU UCG AdTdT	902
pGL3 MOE o/h siRNA	ガイド鎖	CUU ACG CUG AGU ACU UCG Atst	903
	相補鎖	UCG AAG UAC UCA GCG UAA Gtst	904
pGL3-C3-siRNA	ガイド鎖	UCG AAG UAC UCA GCG UAA G-C3	905
	相補鎖	CUU ACG CUG AGU ACU UCG A-C3	906
pGL3-C3-MOE-siRNA	ガイド鎖	UCG AAG UAC UCA GCG UAa g-C3	907
	相補鎖	CUU ACG CUG AGU ACU UCg a-C3	908

10

20

30

【表 18】

VEGFR2-siRNA1	ガイド鎖	UUG AGG UUU GAA AUC GAC CdCdT	909
	相補鎖	GGU CGA UUU CAA ACC UCA AdTdT	910
VEGFR2-siRNA2	ガイド鎖	UAA UUU GUU CCU GUC UUC CdAdG	911
	相補鎖	GGA AGA CAG GAA CAA AUU AdTdT	912
siRNA control	ガイド鎖	ACG UGA CAC GUU CGG AGA AdTdT	913
	相補鎖	UUC UCC GAA CGU GUC ACG UdTdT	914
VEGFR2-C3-siRNA1	ガイド鎖	UUG AGG UUU GAA AUC GAC C-C3	915
	相補鎖	GGU CGA UUU CAA ACC UCA A-C3	916
VEGFR2-C3-siRNA2	ガイド鎖	UAA UUU GUU CCU GUC UUC C-C3	917
	相補鎖	GGA AGA CAG GAA CAA AUU A-C3	918
C3-siRNA control	ガイド鎖	ACG UGA CAC GUU CGG AGA A-C3	919
	相補鎖	UUC UCC GAA CGU GUC ACG U-C3	920

10

20

30

40

【表 19】

VEGFR2-C3-MOE-siRNA1	ガイド鎖	UUG AGG UUU GAA AUC GAc c-C3	921
	相補鎖	GGU CGA UUU CAA ACC UCa a-C3	922
VEGFR2-C3-MOE-siRNA2	ガイド鎖	UAA UUU GUU CCU GUC UUc c-C3	923
	相補鎖	GGA AGA CAG GAA CAA AUu a-C3	924
Tie2-C3-MOE-siRNA1	ガイド鎖	UUC UUC UUU AAU UAA CAc c-C3	925
	相補鎖	GGU GUU AAU UAA AGA AGa a-C3	926
Tie2-C3-MOE-siRNA2	ガイド鎖	UCU GAG UUU GUA AAU AUc g-C3	927
	相補鎖	CGA UAU UUA CAA ACU CAg a-C3	928
C3-MOE-siRNA control	ガイド鎖	ACG UGA CAC GUU CGG AGa a-C3	929
	相補鎖	UUC UCC GAA CGU GUC ACg t-C3	930

10

20

30

【実施例】

【0048】

実施例

以下の実施例は本発明の態様を説明し、そして以下に列挙される請求の範囲に含まれる実施態様を限定することを意図されるものではない。さらに下の結果および考察のセクションは、以下のプロトコールにしたがって行われ、そして以下の材料を用いる実験に言及する。具体的に記載されていない材料およびプロトコールは当業者に日常的に利用可能であると考えられる。

40

【0049】

実施例 1

s i R N A の調製

標準的な 2' - O - T O M ホスホアミダイトテクノロジーにより一本鎖 s i R N A 誘導体を合成し、そして Oasis (登録商標) H L B 抽出プレート (Waters) により精製した。センス - およびアンチセンス鎖 s i R N A をハイブリダイゼーションバッファー (100 mM 酢酸カリウム、2 mM 酢酸マグネシウム、30 mM Hepes、pH 7.6) 中で混合し、90°C で 3 分間熱変性し、そして 30°C で 60 分間アニーリングした。s i R N A 二重鎖の 100 μM 原液を -20°C で保存した。

50

【0050】

実施例 2血清中でのインキュベーションおよび I E - H P L C (L C - M S) による分析

標準的な血清アッセイでは、 $20\mu\text{M}$ の各 *s i R N A* $6\mu\text{l}$ を血清または C S F $54\mu\text{l}$ と混合し、そしてインキュベーター中 37°C で加熱した、冷却した混合物 $50\mu\text{l}$ を分析用 D N A - p a c P A - 100 カラム (Dionex) に負荷し、そして 1 : 10 アセトニトリル : バッファー (20mM 酢酸ナトリウム、 1mM 酢酸マグネシウム、 $\text{pH}6.5$) 溶液中 N a C l グラジエント (30 分で $0 - 0.6\text{M}$) で分析した。

L C - M S 分析用に各 *s i R N A* $100\mu\text{l}$ ($20\mu\text{M}$ または $50\mu\text{M}$) を滅菌ウシ胎仔血清 (GIBCO) $900\mu\text{l}$ と混合し、 37°C でインキュベートし、そして以前に指示されたように (N a C l グラジエントを除く : 9 分で $0\text{M} - 0.36\text{M}$ / 12 分で $0.36\text{M} - 0.6\text{M}$) H P L C により分離した。分解生成物を N A P カラムで脱塩し、そして L C - E S I - M S により分析した。

10

【0051】

実施例 3胃酸中でのインキュベーション

標準的な胃酸アッセイを準備するために、体重 18 から 20g (6 から 8 週齢) の F V B および C 5 7 B L 6 マウスを Charles River Laboratories (Les Oncins, France) から入手した。C O ₂ を用いて動物を屠殺し、そして次に胃を即座に回収した。胃液および胃の内容物を収集し、そしてプールし、次いで遠心ろ過装置 (Ultrafree MC, Millipores) に負荷した。製造者の推奨にしたがってフィルターユニットを 10 分間回転させた。マウス胃液に相当するろ液を回収し、等分し、そしてさらなる実験の前に凍結した。

20

各アッセイ用に、 $20\mu\text{M}$ *s i R N A* 溶液を 9 倍容量の前記されたような胃酸で希釈し、そして 37°C で 0 、 5 、 10 、 15 、 30 、 60 および 120 分間インキュベートした。

【0052】

実施例 4腸洗浄液中でのインキュベーション

標準的な腸洗浄液アッセイを準備するために、雄 Wistar ラットを絶食させ、イソフルランで麻酔した。 10ml 生理食塩水 ($0.5\text{ml} / \text{分}$)、続いて水 20ml ($1\text{ml} / \text{分}$) で小腸 (十二指腸、空腸、回腸) を原位置で灌流することにより腸洗浄液を入手した。収集された流出液を遠心し ($3000\times g$ 、 15 分、 22°C)、そして上澄を $1.2\mu\text{m}$ フィルターに通し、そして -20°C で保存した。

30

各アッセイ用に、 $20\mu\text{M}$ *s i R N A* 溶液を 9 倍容量の腸洗浄液で希釈し、そして 37°C で 0 、 15 、 30 、 60 、 180 および 360 分間インキュベートした。

【0053】

実施例 5マウス肝ミクロソーム中のインキュベーション

標準的な肝ミクロソームアッセイでは、 $250\mu\text{M}$ *s i R N A* 溶液 $10\mu\text{l}$ に、タンパク質 $20\text{mg} / \text{ml}$ のマウス肝ミクロソーム (GEntest 452701 Charge 11) $25\mu\text{l}$ 、 100mM リン酸バッファー ($\text{pH}7.4$) $365\mu\text{l}$ 、U D P G A コファクター (水中 24mM) $50\mu\text{l}$ 、N A D P H $50\mu\text{l}$ を加えた。 $t = 0$ 分および $t = 60$ 分に凍結することによりインキュベーションをクエンチした。

40

【0054】

実施例 6ラット S 1 2 上澄中のインキュベーション

標準的なラット S 1 2 上澄アッセイ用に $250\mu\text{M}$ *s i R N A* 溶液 $10\mu\text{l}$ をタンパク質 $29.9\text{mg} / \text{ml}$ のラット肝臓 S 1 2 $17\mu\text{l}$ 、 100mM リン酸バッファー ($\text{pH}7.4$) $373\mu\text{l}$ 、U D P G A コファクター (水中 24mM) $50\mu\text{l}$ 、N A D P H $50\mu\text{l}$ に加えた。 $t = 0$ 分および $t = 60$ 分に凍結することによりインキュベ

50

ジョンをクエンチした。

【 0 0 5 5 】

実施例 7

マウス血清中のインキュベーション

標準的なマウス血清中インキュベーション用に 2 0 μ M s i R N A 溶液を 9 倍容量のネズミ血清 (Harlanヌードマウス) で希釈し、そして 3 7 ° C で 0、1 5、3 0、6 0、1 8 0 および 3 6 0 分間インキュベートした。

【 0 0 5 6 】

実施例 8

ゲル電気泳動安定性アッセイ

振盪およびドライアイス上で衝撃凍結 (shock-frozen) の直後にインキュベーション溶液の 1 0 μ l アリコートを取り、混合物を 3 7 ° C でインキュベートし、そしてアリコートを種々の時点で衝撃凍結した。負荷バッファー (Elchrom Sc., Cham, Switzerland) 3 0 μ l (各々 1 5 μ l) 中でアリコートを解凍し、そして S F 5 0 ゲル (Elchrom Sc., Cham, Switzerland) 上、1 2 0 V、8 ° C で 2 4 0 分間分離した。バンドを SYBR Gold (Molecular Probes) で染色し、そして BIORAD ChemiDoc (商標) X R S システムで写真を撮った。

【 0 0 5 7 】

実施例 9

細胞培養

1. 5 % ゼラチンコートした培養皿で L - グルタミンおよび 1 0 % 熱不活化 F C S (AMIMED, Switzerland) を補充した D M E M 高グルコース (4. 5 g / l) 中でマウス不死化内皮細胞系 M S 1 (A T C C C R L - 2 2 7 9) を成長させた。HiPerfect (QIAGEN) を用いて製造者の手順にしたがって 2 4 ウェル型式で M S 1 細胞を s i R N A でトランスフェクトした (4 検体ずつ、s i R N A 最終濃度は 1 0 n M または指示されたとおりであった)。

【 0 0 5 8 】

実施例 1 0

F A C S 分析

トランスフェクトされていない、および s i R N A トランスフェクトされた M S 1 細胞を F A C S により V E G F R 2 レベルに関して分析した。簡単には、2 検体ずつまたは 3 検体ずつのウェルからの細胞をトリプシン処理し、各条件に関してプールし、次いで P B S + 1 0 % F C S で 2 回洗浄し、そして氷上で 1 0 分間インキュベートした後に R P E 抱合抗 V E G F R 2 A b (1 μ g / 1 0 ⁶ セル; Avas 1 2 1、BD Pharmingen) を添加した。R P E 標識したアイソタイプ I g G 2 を F A C S 対照 (BD Pharmingen) として使用した。Cell Quest Software (Becton - Dickinson) を用いて FACScalibur で F A C S 獲得および分析を実施した。

【 0 0 5 9 】

実施例 1 1

動物研究

雌 F V B マウス (6 から 8 週齢) を Charles River Laboratories (Les Oncins, France) から入手した。耳のマーキングによりマウスを識別し、そして通常の条件下で群を維持し (ケージあたり動物 6 匹)、そして毎日観察した。処置群あたり 6 匹のマウスを使用し、そして動物保護のためのスイス動物保護法を厳密に順守して全ての動物実験を実施した。

【 0 0 6 0 】

参照チャンパーモデルは出版物に記載されている (例えば Wood J, Bold G, Buchdunger E, et al. P T K 7 8 7 / Z K 2 2 2 5 8 4、血管内皮成長因子受容体チロシンキナーゼの新規のおよび強力な阻害剤は経口投与後に血管内皮成長因子誘起応答および腫瘍成長を損なう。Cancer Res 6 0 : 2 1 7 8 - 8 9 (2 0 0 0))。簡単には、ペルフルオロ

10

20

30

40

50

- アルコキシ - Teflon (Teflon (登録商標) - P F A、直径 2 1 m m × 8 m m、5 5 0 μ l 容量) から作られた多孔性組織チャンパーを、3 μ g / m l 組換えヒト V E G F および指示されたような s i R N A を補充したまたは補充していない 0 . 8 % 寒天 (B B L (登録商標) N r . 1 1 8 4 9、Becton Dickinson, Meylan, France) および 2 0 U / m l ヘパリン (Novo Nordisk A / S, Bagsvaerd, Denmark) で充填した。充填手順の前に溶液を 4 2 で維持した。3 % イソフルラン (Forene (登録商標)、Abbott AG, Cham, Switzerland) 吸入を用いてマウスを麻酔した。皮下移植用に、尾の付け根に皮膚の小切開を作成して移植用外套針の挿入を可能にした。動物の背の小切開を通して無菌条件下でチャンパーを移植した。創傷クリップ (Autoclip 9 m m Clay Adams) により皮膚切開を閉じた。必要とされる用量に依存して、s i R N A を「注射用の品質等級」の 0 . 9 % 生理食塩水で希釈し、次いで動物に i . p . (2 0 0 μ l / 用量) または経管による p . o . (1 0 0 μ l / 用量) のいずれかで送達した。チャンパー移植の 2 から 4 時間前にマウスに最初の投与を行い；次いで毎日 2 日間処置した。特記しない場合、移植後 3 日にマウスを屠殺し、チャンパーを切除し、そして各移植片の周囲に形成された血管新生化された線維性組織を注意深く除去した。マウスの一般状態をモニタリングするために体重を用いた。一元配置分散分析、続いてダネット検定を用いて統計分析を行った。

【 0 0 6 1 】

実施例 1 2

B 1 6 メラノーマ異種移植片モデル

抗血管形成治療に应答することが以前に同定されている同系 B 1 6 / B L 6 ネズミメラノーマモデル (例えば LaMontagne K, Littlewood - Evans A, Schnell C, O ' Reilly T, Wyder L, Sanchez T, Probst B, Butler J, Wood A, Liau G, Billy E, Theuer A, Hla T, Wood J.、F T Y 7 2 0 によるスフィンゴシン - 1 - リン酸受容体の拮抗作用が血管形成および腫瘍脈管化を阻害する。Cancer Res. 6 6 (1) : 2 2 1 - 3 1 (2 0 0 6 Jan 1)) を使用して標準的なまたは修飾された s i R N A の抗腫瘍活性を評価した。腫瘍細胞 (1 μ l、5 × 1 0 ⁴ / μ l) を同系雌 C 5 7 B L / 6 マウスの両耳の背側耳介に皮内注射した。原発腫瘍面積 (m m ²) の測定を腫瘍細胞接種後 7、1 4 および 2 1 日にコンピューター支援画像分析ソフトウェア (K S - 4 0 0 3 . 0 撮像システム、Zeiss) および具体的に設計されたマクロを用いて実施した。7 日から 2 1 日まで「注射用の品質等級」の 0 . 9 % 生理食塩水で希釈した s i R N A を、i . p . (2 0 0 μ l / 用量) または経管による p . o . (1 0 0 μ l / 用量) のいずれかでマウスに 1 日 1 回投与した。2 1 日にマウスを屠殺し、そして頭部リンパ節転移を重量測定し、そして次に凍結した。

これらの結果では、用いる実際の s i R N A 配列および化学は表 3 を参照して決定できる。

【 0 0 6 2 】

マウス血清中野生型 s i R N A を双方の 3 ' 末端から分解する

ヌクレアーゼによるオリゴヌクレオチド分解は大部分が 3 ' エキソヌクレオチド分解性である。その終端での芳香族または親油性残基の導入によるアンチセンスオリゴヌクレオチドの修飾はそのヌクレオチド分解を遅延させる¹⁷。この代謝経路もまた s i R N A に優勢であるかどうかを検証するために、未修飾 s i R N A (野生型 s i R N A) をマウス血清中 3 7 ° C で 3 時間までインキュベートした。

用いられた未修飾 s i R N A 配列は p G l 3 - s i R N A であった (表 3 参照)。

混合物を強陰イオン交換 H P L C で、t = 0 分、t = 3 0 分、t = 1 8 0 分で分析した。

【 0 0 6 3 】

図 1 a、1 b および 1 c で示されるように、t = 3 0 分でプラント末端化 s i R N A に相当する明確なピークが観察された。t = 3 時間までに実質的な分解が観察された。図 1 d および 1 e は H P L C - E S I - M S 分析により同定された代謝物を説明する。この分析により双方の鎖の 3 ' オーバーハングおよび 3 ' 末端の最初に塩基対形成するリボヌクレオチドの喪失に相当するいくつかの代謝物の存在が明らかにされる。ガイド鎖の 5 ' 末

端リボヌクレオチドの消化もまた観察された。

【0064】

図1は血清中の未修飾 *siRNA* の分解経路を示唆する。DNAオーバーハングがもしかすると3'エキソヌクレアーゼにより最初に消化される。LC-MSでは、双方の鎖の最初に塩基対形成する3'リボヌクレオチドおよびまたガイド鎖の最初に5'塩基対形成するリボヌクレオチドの喪失に相当するさらなる代謝物もまた検出された。

【0065】

3'修飾 *siRNA* は胃腸管を通して安定である

2'-メトキシエチルリボヌクレオチドオーバーハング(MOE o/h *siRNA*)を有する *siRNA*、ヒドロキシプロボキシホスホジエステル部分でキャップされたプラント末端化 *siRNA* (C3-*siRNA*) および各鎖の3'末端で2個の最初に塩基対形成するヌクレオチドが2'-メトキシエチルリボヌクレオチド残基により修飾されたヒドロキシプロボキシホスホジエステル3'キャップ *siRNA* (C3-MOE *siRNA*) を合成した。これらの化合物を図2で図式的に説明する。

最初に *siRNA* をマウス胃酸中2時間インキュベートした(図3)。C3-*siRNA* およびC3-MOE *siRNA* 場合、分解は観察されなかったが、野生型 *siRNA* の分解は30分後に観察された。

【0066】

ラットの腸洗浄液から得られた腸液中の安定性により15分後にほぼ完了する野生型 *siRNA* の分解が明らかにされたが、MOE o/h *siRNA*、C3-*siRNA* およびC3-MOE *siRNA* の親化合物は60分間観察された(図4)。

肝臓中の安定性を肝ミクロソームアッセイおよびS12アッセイ(代表的な肝臓細胞質酵素活性)を用いて評価した。結果を図5に示す。双方の場合で、インキュベーションの60分後に分解は観察されなかった。

【0067】

最後に、*siRNA* をマウス血清中2 μ Mで、37°Cで6時間までインキュベートすることにより試験した(図6の結果)。親化合物の安定性をゲル電気泳動により追跡した。修飾された *siRNA* (C3-*siRNA*、MOE o/h *siRNA* のC3-MOE *siRNA*) の場合、有意な分解は観察されなかったが、野生型 *siRNA* では観察された。

この研究は野生型(未修飾) *siRNA* がマウス胃酸中およびマウス血清中で代謝されることを示している。3'末端修飾された *siRNA* の場合、胃腸管で分解は観察されなかった。したがって3'修飾された *siRNA* は野生型 *siRNA* よりも高い経口バイオアベイラビリティを有している可能性がある。

【0068】

全身送達された3'修飾された *siRNA* はインビボ成長因子誘起血管形成モデルにおいてさらに活性である¹⁸

最初に、修飾された *siRNA* (C3-*siRNA* およびC3-MOE *siRNA*) が標的遺伝子を下方調節する能力を、細胞内(in cellulo)で抗VEGFR2 *siRNA* でトランスフェクトされたMS1細胞のVEGFR2表面レベルを測定することにより検査した。

野生型 *siRNA* として二つの抗VEGFR2 *siRNA*、C3-*siRNA* およびC3-MOE *siRNA* のプールを腹腔内投与した。結果を図7に示す。プールされた野生型 *siRNA* は25 μ g/マウス/日の高用量でVEGF誘起の脈管化を有意に低減させた。C3-*siRNA* では5倍低い用量で同一レベルの阻害が観察された。C3-MOE *siRNA* プールの場合、脈管化された組織重量の有意な低下が最低の0.2 μ g/マウス/日を含む全被験用量で観察された。

【0069】

図8aおよび8bは、腹腔内に与えられた場合、VEGFR2-C3およびC3-MOE *siRNA* の双方がマ1 μ g/マウス/日の用量を下回って活性であった。

B 1 6 同種移植片メラノーマ腫瘍マウスモデルに腹腔内に与えられた (i . p .) 抗 V E G F R 2 - C 3 - M O E - s i R N A のインビボ試験。図 9 a は、修飾された V E G F R 2 - C 3 - M O E - s i R N A で i . p . 処置が腫瘍発達を有意に低減させることを示している。図 9 b もまた V E G F R 2 - C 3 - M O E - s i R N A の 2 0 μ g / マウスの i . p . 注射の結果、腫瘍成長の有意な阻害に至ることを示している。

【 0 0 7 0 】

血管形成障害の処置のための s i R N A の経口送達

図 1 0 は 2 0 μ g / マウス / 日の用量で経口的に与えられた V E G F R 2 - C 3 - M O E - s i R N A は脈管化重量を基底レベル (例えば成長因子誘導を伴わない重量) まで低下させたことを示している。用いられた実際の s i R N A 配列は表 3 で言及される。

抗 T i e 2 - C 3 - M O E - s i R N A もまた成長因子誘起血管形成モデルにおいて腹腔内および経口送達の双方で試験した。図 1 1 a および 1 1 b は経口的に与えられた、T i e 2 で志向される双方の C 3 - M O E - s i R N A は 2 0 μ g / マウス / 日で活性であったことを示している。用いられた実際の s i R N A 配列は表 3 を参照して決定できる。

データにより、さらなる内部修飾を伴うかまたは伴わない 3 ' 末端修飾された s i R N A は経口投与時に妥当な用量で治療効果を実証できることが示される。

【 0 0 7 1 】

参考文献

- 1 . a) Y. Tomari et al. Genes and Development 1 9 (2 0 0 5) , 5 1 7 ; b) P . Shankar et al. JAMA 1 1 (2 0 0 5) , 1 3 6 7 ; c) Y. Dorsett et al. Nature Reviews 3 (2 0 0 4) , 3 1 8
- 2 . a) P.D. Zamore et al. Cell 1 0 1 , (2 0 0 0) , 2 5 ; b) S.M. Hammond et al. Nature 4 0 4 (2 0 0 0) , 2 9 3
- 3 . a) G. Meister et al. Molecular Cell 1 5 (2 0 0 4) , 1 8 5 .
- 4 . S.M. Elbashir et al. Genes Dev. 1 5 (2 0 0 1) , 1 8 8 .
- 5 . S.J. Reich et al. Molecular Vision 9 (2 0 0 3) , 2 1 0 .
- 6 . a) Dorn et al. Nucleic Acids Research 3 2 (2 0 0 4) , e 4 9 ; b) D. R.T hakker et al. PNAS 1 0 1 (2 0 0 4) , 1 7 2 7 0 ; c) D.R. Thakker et al. Molecular Psychiatry 1 0 (2 0 0 5) , 7 1 4
- 7 . V. Bitko et al. Nature Medicine 1 1 (2 0 0 5) , 5 0 .
- 8 . E. Song et al. Nature Medicine 9 (2 0 0 3) , 3 4 7 .
- 9 . D.A.Braasch et al. Biochemistry 4 2 (2 0 0 3) , 7 9 6 7 .
- 1 0 . Harborth, Antisense Nucleic Acid Drug Devt, 2 0 0 3
- 1 1 . A.H.S. Hall et al. Nucleic Acids Research 3 2 (2 0 0 4) , 5 9 9 1 .
- 1 2 . M. Amarguoui et al. Nucleic Acids Research 3 1 (2 0 0 3) , 5 8 9 .
- 1 3 . F. Czauderna et al. Nucleic Acids Research 3 1 (2 0 0 3) , 2 7 0 5 .
- 1 4 . T. Prakash et al. Journal of Medicinal Chemistry 4 8 (2 0 0 5) , 4 2 4 7 .
- 1 5 . J. Elmen et al. Nucleic Acids Research 3 3 (2 0 0 5) , 4 3 9 .
- 1 6 . A.S. Boutorin, L.V. Guskova, E.M. Ivanova, N.D. Kobetz, V.F. Zafytova, A .S. RYTE, L.V. Yurchenko and V.V. Vlassov FEBS Lett. 2 5 4 (1 9 8 9) , p. 1 2 9
- 1 7 . J. Wood et al. Cancer Research 6 0 (2 0 0 0) , 2 1 7 8 .
- 1 8 . K. LaMontagne et al. Cancer Res. 6 6 (2 0 0 6) , 2 2 1 .

【図面の簡単な説明】

【 0 0 7 2 】

【図 1 a】未修飾 s i R N A p G l 3 - s i R N A (マウス血清中の野生型 s i R N A) の代謝分解；マウス血清中 0 分インキュベートした後の未修飾 s i R N A のイオン交換 - H P L C 分析；3 7 ° C で 3 0 分インキュベートした後のイオン交換 H P L C における主要なピークを単離し、そして L C - M S に再注入した。

【図1b】未修飾 *siRNA* pG13-*siRNA* (マウス血清中の野生型 *siRNA*) の代謝分解; マウス血清中30分インキュベートした後の未修飾 *siRNA* のイオン交換-HPLC分析; 37°Cで30分インキュベートした後のイオン交換HPLCにおける主要なピークを単離し、そしてLC-MSに再注入した。

【図1c】未修飾 *siRNA* pG13-*siRNA* (マウス血清中の野生型 *siRNA*) の代謝分解; a-c) マウス血清中180分インキュベートした後の未修飾 *siRNA* のイオン交換-HPLC分析; 37°Cで30分インキュベートした後のイオン交換HPLCにおける主要なピークを単離し、そしてLC-MSに再注入した。

【図1d】検出された分子量およびその割り当ての表。

【図1e】ESI-MSスペクトル。

10

【図2】四つの二本鎖二本鎖RNA型式の説明: 野生型 (または未修飾) *siRNA*、MOE o/h *siRNA*、C3-*siRNA* および C3-MOE *siRNA*。

【図3】マウス胃酸中三つの異なる型式での *siRNA* の安定性。試料をマウス胃酸中37°Cで2 μMの濃度でインキュベートした。親化合物のバンドを定量することにより親化合物の消失を2-6時間にわたって追跡した。レーン1-7: 胃酸中 $t = 0$ 、5、10、15、30、60および120分の野生型 *siRNA*。レーン8: dsRNAラダー (30、21、19、16、13、10塩基対)。レーン9-15: 胃酸中 $t = 0$ 、5、10、15、30、60および120分のC3 *siRNA*。レーン16: dsRNAラダー (30、21、19、16、13、10塩基対)。レーン17-24: 胃酸中 $t = 0$ 、5、10、15、30、60および120分のC3-MOE *siRNA*。

20

【図4】腸洗浄液中四つの異なる型式での *siRNA* の安定性。試料を肝ミクロソーム中37°Cで5 μMの濃度でインキュベートした。(左から右に) レーン1: dsRNAラダー (30、21、19、16、13、10塩基対)。レーン2-7: 腸洗浄液中 $t = 0$ 、15、30、60、180および360分の野生型 *siRNA*。レーン8-13: 腸洗浄液中 $t = 0$ 、15、30、60、180および360分のmo e o/h *siRNA*。レーン14-19: 腸洗浄液中 $t = 0$ 、15、30、60、180および360分のC3 *siRNA*。レーン20-25: 腸洗浄液中 $t = 0$ 、15、30、60、180および360分のC3-MOE *siRNA*。

【図5】肝ミクロソーム中四つの異なる型式での *siRNA* の安定性。試料をラット腸洗浄液からの腸液中37°Cで2 μMの濃度でインキュベートした。(左から右に) レーン1: ds。

30

【図6】マウス血清中四つの異なる型式での *siRNA* の安定性。試料をマウス血清中37°Cで2 μMの濃度でインキュベートした。親化合物のバンドを定量することにより親化合物の消失を6時間にわたって追跡した。(左から右に) レーン1: dsRNAラダー (30、21、19、16、13、10塩基対) RNAラダー (30、21、19、16、13、10塩基対)。レーン2: 野生型 *siRNA* 未処理。レーン3: mo e o/h *siRNA* 未処理。レーン4: C3 *siRNA* 未処理。レーン5: C3-MOE *siRNA* 未処理。レーン6-9: 肝ミクロソーム中2-5と同一、 $t = 0$ 。レーン10-13: 肝ミクロソーム中2-5と同一、 $t = 60$ 分。レーン14-17: 上澄S12中2-5と同一、 $t = 0$ 。レーン18-21: 上澄S12中2-5と同一、 $t = 60$ 分。レーン2-7: マウス血清中 $t = 0$ 、15、30、60、180および360分の野生型 *siRNA*。レーン8-13: マウス血清中 $t = 0$ 、15、30、60、180および360分のmo e o/h *siRNA*。レーン14-19: マウス血清中 $t = 0$ 、15、30、60、180および360分のC3 *siRNA*。レーン20-25: マウス血清中 $t = 0$ 、15、30、60、180および360分のC3-MOE *siRNA*。

40

【図7】抗VEGFR2 *siRNA* (2個の独立した配列) の三つの型式の細胞内 (in cellulo) での特徴付け。野生型 *siRNA*、C3-*siRNA* および C3-MOE *siRNA* を3濃度 (1、5、10 nM) でMS1細胞にトランスフェクトした。FACSによりVEGFR2細胞表面レベルを測定することによりサイレンシング効力を評価した。

50

【図 8 a】成長因子誘起血管形成「寒天チャンバー (Agar Chamber)」マウスモデルにおける野生型 *siRNA*、C3-*siRNA* および C3-MOE *siRNA* のインビボ試験。1、5 および 25 μg / マウス / 日の対照、未修飾 VEGFR2 *siRNA* および C3 修飾 VEGFR2 *siRNA* の結果を示す。

【図 8 b】成長因子誘起血管形成「寒天チャンバー (Agar Chamber)」マウスモデルにおける野生型 *siRNA*、C3-*siRNA* および C3-MOE *siRNA* のインビボ試験。0.2、1 および 5 μg / マウス / 日での対照、C3 修飾 VEGFR2 *siRNA* および C3-MOE VEGFR2 *siRNA* を示す。各例で 2 つの抗 VEGFR2 *siRNA* のプールを毎日 3 日間腹腔内に与えた。

【図 9】B16 同種移植片メラノーマ腫瘍マウスモデルに 5 および 20 μg / マウス / 日で腹腔内 (i.p.) に与えられた抗 VEGFR2 C3-MOE *siRNA* のインビボ試験。図 9 a は、修飾された VEGFR2 *siRNA* での i.p. 処置が腫瘍発達を有意に低下させることを示す。図 9 b もまた VEGFR2 *siRNA* の 20 μg / マウスの i.p. 注射が有意な腫瘍成長の阻害を招くことを示す。

【図 10】成長因子誘起血管形成マウスモデルにおける C3-MOE *siRNA* のインビボ試験。抗 VEGFR2 *siRNA* を 20 μg / マウス / 日を毎日 3 日間経口的に与えた。

【図 11 a】：成長因子誘起血管形成マウスモデルにおける C3-MOE *siRNA* のインビボ試験。抗 Tie2 *siRNA* を毎日腹腔内 (1 および 0.2 μg / マウス / 日) または経口的に (20 および 5 μg / マウス / 日) 3 日間経口与えた。切除組織の重量

【図 11 b】：成長因子誘起血管形成マウスモデルにおける C3-MOE *siRNA* のインビボ試験。抗 Tie2 *siRNA* を毎日腹腔内 (1 および 0.2 μg / マウス / 日) または経口的に (20 および 5 μg / マウス / 日) 3 日間経口与えた。Tie2 タンパク質ノックダウン。

【図 1 a】

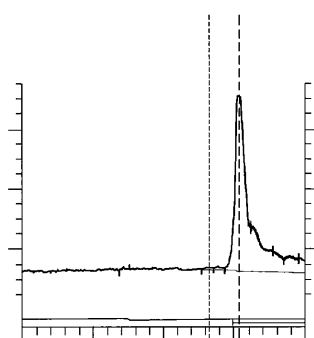


FIG.1a

【図 1 b】

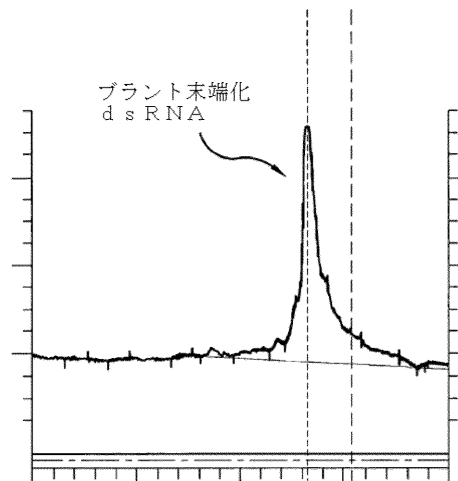
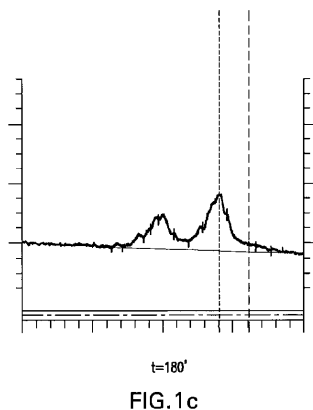


FIG.1b

【 図 1 c 】

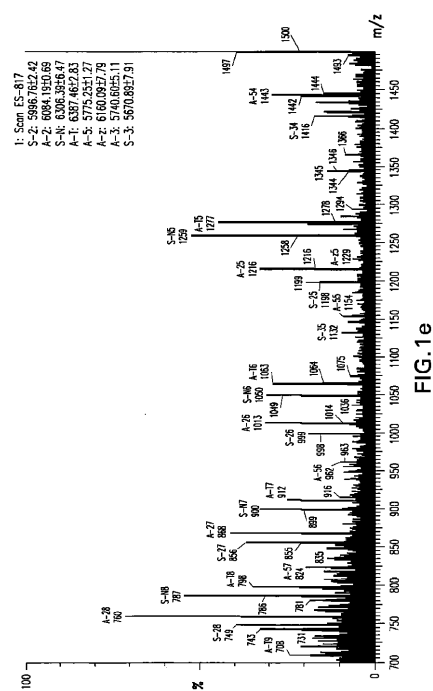


【 図 1 d 】

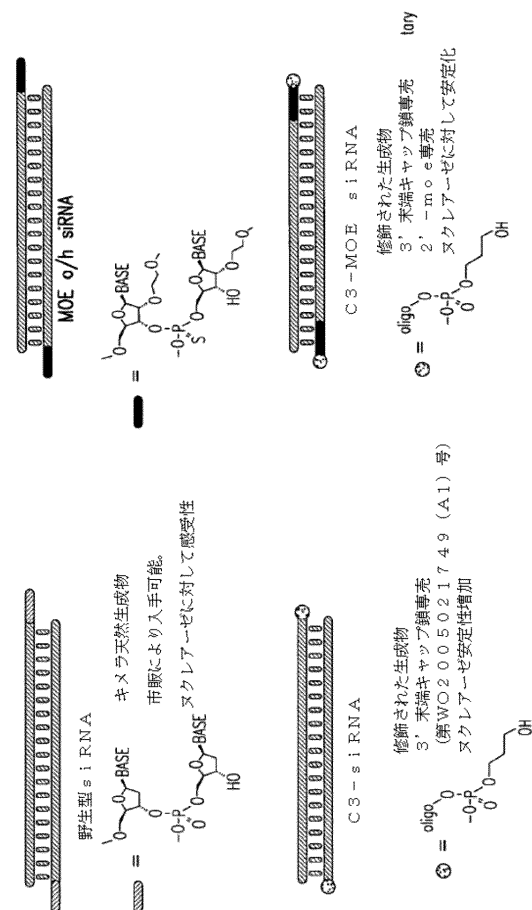
LC-MS分析			化合物	配列	計算値	実測値
親	-	相補体	CUUACGGUGAGUACUUGCATTT	6607.32		
相補体	-	1p	CUUACGGUGAGUACUUGCAT_	6302.9		6306.4
相補体	-	1p1p	CUUACGGUGAGUACUUGCA__	5998.7		5996.8
相補体	-	1p1p-3'Ap	CUUACGGUGAGUACUUGC__	5669.5		5670.9
親	-	ガイド	UCGAAGUACUACGGUAGCTTT	6693.37		
ガイド	-	1p	UCGAAGUACUACGGUAGCT_	6389.1		6387.5
ガイド	-	1p1p	CGAAGUACUACGGUAGC__	6084.8		6084.2
ガイド	-	1p1p-3'Gp	UCGAAGUACUACGGUAA__	5739.6		5740.6
ガイド	-	1p1p-5'1p	_CGAAGUACUACGGUAGC__	5778.7		5775.2

FIG. 1d

【 図 1 e 】



【 図 2 】



【図 3】

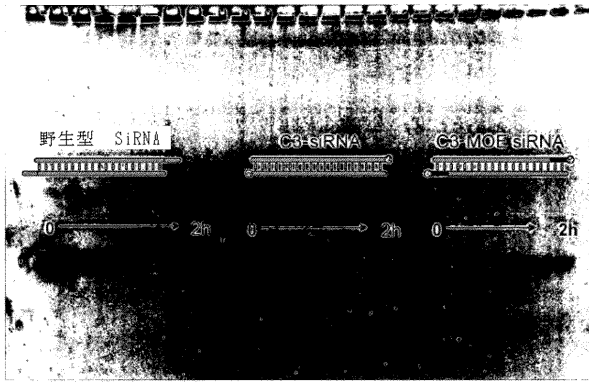


FIG.3

【図 4】

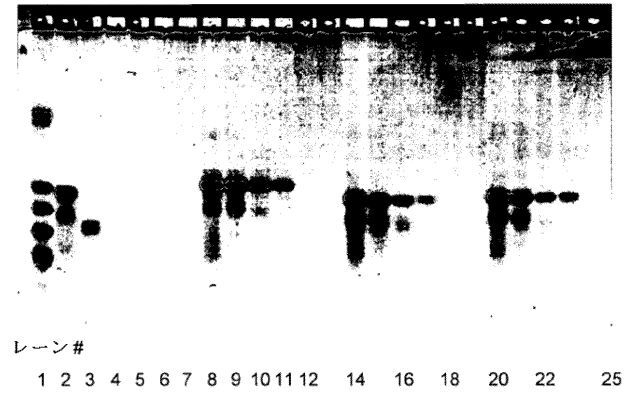


FIG.4

【図 5】

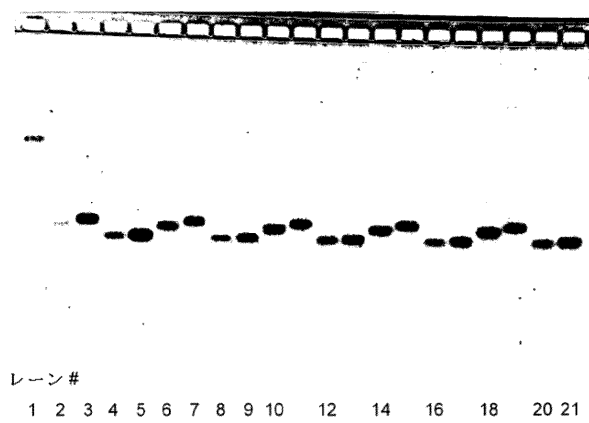


FIG.5

【図 6】

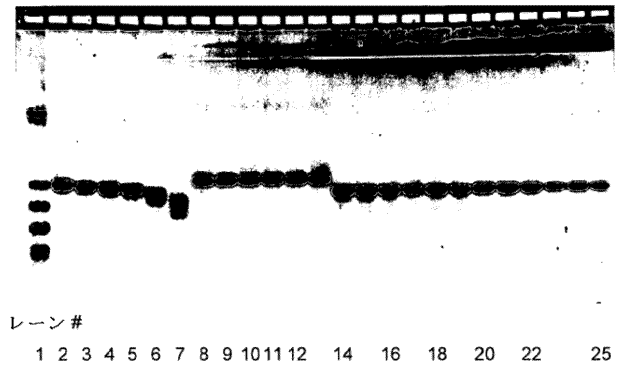


FIG.6

【 図 8 a 】

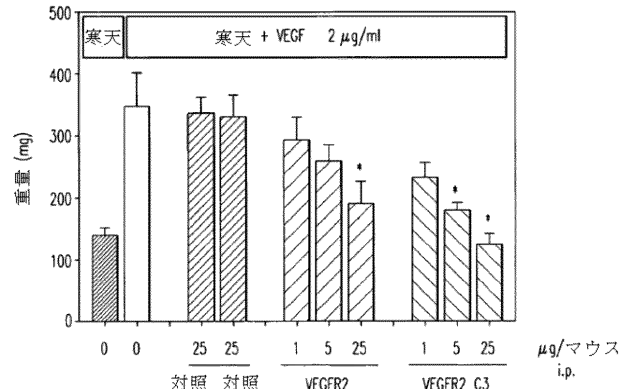


FIG.8a

【 図 9 a 】

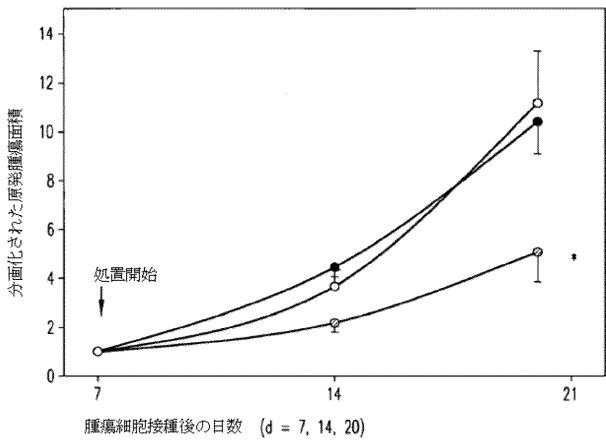


FIG.8b

FIG. 9a

	T/C 原発腫瘍
● 1) siRNA 対照 20 μ g/マウス/日 i.p. (n=6)	
○ 2) siRNA VEGFR2 5 μ g/マウス/日 i.p. (n=6)	1.00
○ 3) siRNA VEGFR2 20 μ g/マウス/日 i.p. (n=6)	0.41 *p<0.05

【図 9 b】

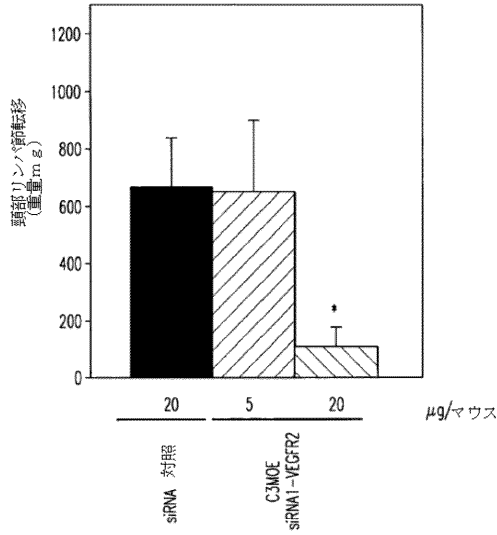


FIG.9b

【図 10】

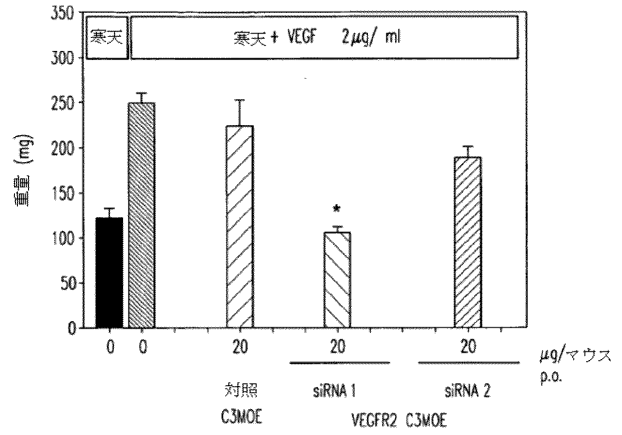


FIG.10

【図 11 a】

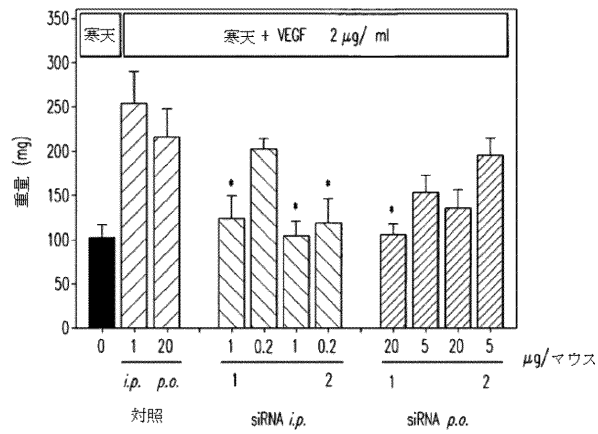


FIG.11a

【図 11 b】

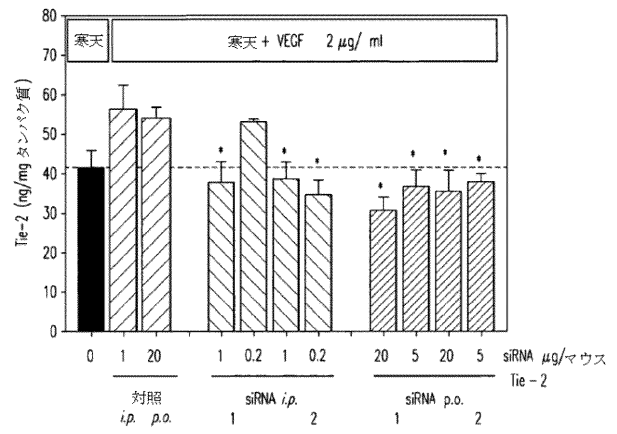


FIG.11b

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2007/003867

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N15/11 A61K31/712 A61K31/713

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)

C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/019453 A (SIRNA THERAPEUTICS INC [US]; MCSWIGGEN JAMES [US]; MORRISSEY DAVID [US] 3 March 2005 (2005-03-03) figures 2,3,23,76; examples 2,12	1-23
X	US 2005/233329 A1 (MCSWIGGEN JAMES [US] ET AL) 20 October 2005 (2005-10-20) paragraphs [0187] - [0189], [0302], [0313], [0314], [0319] - [0322], [0328]; claims 1-22; figure 6; tables 1,3; sequences 15,16,19,20,23,24	1-23
X	US 2005/261212 A1 (MCSWIGGEN JAMES A [US]) 24 November 2005 (2005-11-24) paragraphs [0030] - [0064], [0172] - [0174], [0197] - [0199]; claims 37-68	1-8,18
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ 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 document 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.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 December 2007

Date of mailing of the international search report

04/04/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Romano, Alper

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2007/003867

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHEN J ET AL: "Suppression of ocular neovascularization with siRNA targeting VEGF receptor 1" GENE THERAPY, MACMILLAN PRESS LTD., BASINGSTOKE, GB, vol. 13, no. 3, 29 September 2005 (2005-09-29), pages 225-234, XP002441146 ISSN: 0969-7128 the whole document	1-3,5,7, 9,18-23
X	KIM B ET AL: "INHIBITION OF OCULAR ANGIOGENESIS BY SIRNA TARGETING VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR PATHWAY GENES THERAPEUTIC STRATEGY FOR HERPETIC STROMAL KERATITIS" AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 165, no. 6, December 2004 (2004-12), pages 2177-2185, XP009042137 ISSN: 0002-9440 the whole document	1-3,5,7, 9,18-23
X	WO 2005/115481 A (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]; VORNLOCHER HANS-PETER [DE]; HADWIGER) 8 December 2005 (2005-12-08) page 58; sequences 10,11	1,2,4-7, 11,14, 15,18,19
X	US 2006/063731 A1 (LEWIS DAVID L [US] ET AL) 23 March 2006 (2006-03-23) examples 1-4; sequences 4,5	1,2,7,11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2007/003867

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 12-17
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

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:

see additional sheet

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 an additional fee, 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.:

Invention 1: claims: 1-23 (all partially)

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.

International Application No. PCT/EP2007/003867

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 12-17

Present claims 12-17 relate to a compound which has a given desired property or effect, namely having greater stability in gastric assay or serum assay or having enhanced oral availability. However, the description provides support and disclosure in the sense of Articles 6 and 5 PCT for only a limited number of such compounds having the said property or effect and there is no common general knowledge of this kind available to the person skilled in the art. This non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search of the claim (PCT Guidelines 9.19 and 9.20).

The search of claims 12-17 was consequently restricted to the specifically disclosed compounds having the desired property or effect, see description pages 31-39, and to the broad concept of a compound having the desired property or effect.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

International Application No. PCT/EP2007/003867

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: claims:1-23 (all partially)

siRNA against VEGFR1 having guide sequence SEQ ID NO:1 with at least one chemical modification and medical uses related thereto

Inventions 2-50: claims:1-23 (all partially)

siRNAs against VEGFR1 having guide sequences SEQ ID NO:2-50 with at least one chemical modification and medical uses related thereto

Invention 51: claims 1-23 (all partially)

siRNA with at least one chemical modification raised against VEGFR2 and medical uses related thereto

Invention 52: claims 1-10,12-23 (all partially)

siRNA with at least one chemical modification raised against VEGFR3 and medical uses related thereto

Invention 53: claims 1-23 (all partially)

siRNA with at least one chemical modification raised against Tie2 and medical uses related thereto

Invention 54: claims: 1-10,12-23 (all partially)

siRNA with at least one chemical modification raised against bFGFR and medical uses related thereto

Invention 55: claims 1-10,12-23 (all partially)

siRNA with at least one chemical modification raised against IL8R and medical uses related thereto

Invention 56: claims 1-10,12-23 (all partially)

siRNA with at least one chemical modification raised against Fas and medical uses related thereto

Invention 57: claim 1-10,12-23 (all partially)

International Application No. PCT/EP2007/003867

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

siRNA with at least one chemical modification raised against
IGFR2 and medical uses related thereto

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2007/003867

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005019453	A	03-03-2005	AU 2004266311 A1	03-03-2005
			CA 2526831 A1	03-03-2005
			EP 1627061 A2	22-02-2006
			US 2005239731 A1	27-10-2005
			US 2005233998 A1	20-10-2005
US 2005233329	A1	20-10-2005	NONE	
US 2005261212	A1	24-11-2005	EP 1386004 A2	04-02-2004
			WO 02081628 A2	17-10-2002
			US 2003119017 A1	26-06-2003
			US 2003143732 A1	31-07-2003
			US 2003148507 A1	07-08-2003
			US 2003191077 A1	09-10-2003
			US 2006154271 A1	13-07-2006
WO 2005115481	A	08-12-2005	AU 2005247509 A1	08-12-2005
			CA 2568013 A1	08-12-2005
			EP 1765847 A2	28-03-2007
			US 2006094678 A1	04-05-2006
US 2006063731	A1	23-03-2006	NONE	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 フランソワ・ジャン - シャルル・ナット

フランス、エフ - 6 8 2 2 0 エサング、リュ・デ・ロリオ 1 3 番

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA11 DA03 GA11 HA17

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA36 ZB26